

Instituto Nacional dos Recursos Biológicos (INRB)

Instituto Nacional de Investigação Agrária (INIA)

## Laboratório de Metabolismo Lipídico

### Métodos Laboratoriais

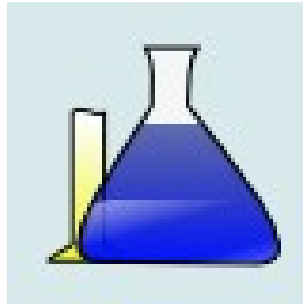


**Rui Bessa, Susana Alves, Paula Portugal, Eliana Jerónimo**

**2006**

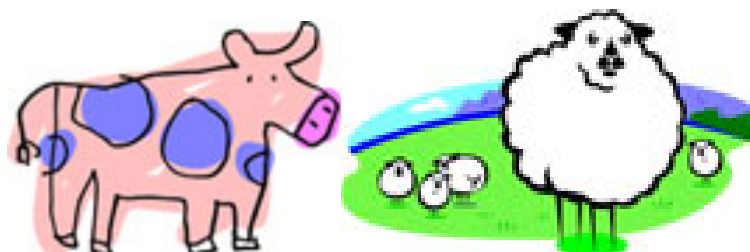
# Laboratório de Metabolismo Lipídico

## Métodos Laboratoriais



- I. [Métodos de análise de ácidos gordos em carne](#)
- II. [Métodos de análise de ácidos gordos em leite e seus derivados](#)
- III. [Métodos de análise de ácidos gordos em alimentos](#)
- IV. [Métodos de análise de ácidos gordos em conteúdo e bactérias ruminais](#)
- V. [Métodos de análise de ácidos gordos voláteis](#)
- VI. [Métodos de separação de fracções lipídicas e ácidos gordos](#)
- VII. [Métodos de derivatização de ácidos gordos](#)
- VIII. [Procedimentos no Laboratório de Metabolismo Lípidico](#)
- IX. [Cromatografia e Espectrometria de Massa](#)

## I – Métodos de análise de ácidos gordos em carne



---

Nº	Descrição
LML-M0.1	<a href="#">Procedimento geral em amostras de carne</a>
LML-M1.1	<a href="#">Transesterificação directa em músculo liofilizado</a>
LML-M2.1	<a href="#">Extracção e transesterificação de ácidos gordos em músculo liofilizado</a>

---



## Procedimento Geral Para Análise de Amostras de Músculo

1. Após a recolha, moer a amostra;
2. Acondicionar a Vácuo e Congelar a  $-80^{\circ}\text{C}$ ;

### Determinação da Matéria Seca

3. Pesar a amostra antes de liofilizar;
4. Colocar no liofilizador durante 72 horas;
5. Após a liofilização pesar de novo a amostra;

$$\text{MS (Matéria Seca)} = m_1 / m_0$$

ou expresso em %

$$\text{MS} = (m_1 / m_0) \times 100$$

$m_1$  = massa da amostra depois de liofilizar (g)

$m_0$  = massa da amostra antes de liofilizar (g)

6. Moer a amostra;
7. Determinar a matéria seca no analisador de matéria seca – Sartorius MA 30 a  $120^{\circ}\text{C}$ ;

### Análise de ácidos gordos

- Transesterificação directa em carne – Rule (1997) – **Método LML-M1.1**
- Extracção e Transesterificação de ácidos gordos em músculo – Folch et. al. (1957)  
– **Método LML-M2.1**



## Transesterificação directa de músculo liofilizado

Daniel C. Rule (1997)

### Reagentes e soluções:

- Padrão interno: Ácido nonadecanóico C19:0 (2 mg/mL em *n*-Hexano);
- Metanol anidro;
- *n*-Hexano;
- Trifluoreto de boro em metanol (solução 14%);
- Água ultrapura;
- Sulfato de Sódio Anidro.

Nota: O *n*-Hexano deve conter BHT (25 mg/L).

### Procedimento:

1. Pesar **100 mg de amostra liofilizada** para tubo de ensaio (de 23 mL que vede bem).
2. Adicionar **1 mL de padrão interno C19:0** (2 mg/mL).
3. Adicionar **2 mL de trifluoreto de boro em metanol e 2 mL de metanol**, e agitar em vortex.
4. Colocar os tubos durante 2h em banho de água a 80°C.
5. Agitar os tubos em vortex de 5 em 5 minutos.
6. Após as 2h arrefecer os tubos e adicionar **3 mL de água e 3 mL de *n*-Hexano**.
7. Homogeneizar os reagentes em vortex.
8. Centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.
9. Remover a fase de *n*-Hexano para tubos de ensaio (de 16 mL) aos quais se adicionou **1 g de sulfato de sódio anidro**.
10. Agitar em vortex e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.
11. Retirar o *n*-Hexano para outros tubos (de 16 mL).
12. Evaporar o *n*-Hexano em evaporador de corrente de azoto.
13. Adicionar **1,5 mL de *n*-Hexano para GC** e transferir para viais de GC.
14. Conservar a 4°C.



## Extracção e Transesterificação de ácidos gordos em carne

### 1º Passo: Extracção de lípidos - Folch et al. (1957)

(Para uma extracção de 97% dos lípidos – efectuar 3 lavagens)

Este procedimento é feito em triplicado para cada amostra:

- 2 para gordura total – análise ponderal
- 1 para metilação – análise de ácidos gordos

Os solventes devem conter cerca de 25 mg/L de BHT

### Reagentes e soluções:

- Metanol;
- Diclorometano;
- Diclorometano:Metanol (2:1);
- Cloreto de potássio ou Cloreto de sódio (solução 0,8 %);
- Diclorometano:Metanol:Solução salina (0,8%) na proporção de 86:14:1.

### Preparativos:

#### Na véspera:

- Colocar os erlenmeyers sem tampa na estufa a 70 °C (para tarar) com uma pinça;
- Pesar a amostra para os tubos de 16 mL que se guarda no frio;
- Dobrar os filtros separadores de fases e os filtros normais;
- Preparar o Diclorometano:Metanol (2:1);
- Preparar o Cloreto de potássio ou Cloreto de sódio (0,8 %);
- Preparar o Diclorometano:Metanol:Solução salina (0,8%) na proporção de 86:14:1.

#### No dia:

- Retirar os erlenmeyers para o excicador. Colocar os erlenmeyers no excicador com as tampas. Após 1 hora pesar os erlenmeyers sem tampa. Não tocar nos erlenmeyers com os dedos não escrever. Colocar de novo os erlenmeyers com as tampas no excicador até serem utilizados.



Procedimento:

1. Pesar **0,250 g de músculo liofilizado** para os tubos de vidro de 16 mL;
2. Adicionar **2,5 mL de metanol** e deixar humedecer durante 5 minutos;
3. Agitar no vortex (10 seg) e colocar no ultra-sons a agitar durante 5 minutos a 30 °C;
4. Adicionar **5 mL de diclorometano**, agitar no vortex (10 seg) e levar novamente ao ultra-sons durante 10 minutos a 30 °C;
5. Centrifugar para separar a fase sólida (10 minutos a 2500 rpm) e retirar o máximo de solvente para outro tubo (de 23 mL), passando por um filtro normal;
6. Adicionar a fase sólida **7,5 mL de diclorometano:metanol (2:1)**;
7. Agitar no vortex (10 seg) e levar à agitação no ultra-sons durante 10 minutos a 30 °C;
8. Centrifugar para separar a fase sólida (5 min. a 2500 rpm) e retirar o máximo de solvente para o tubo do passo 5, passando pelo filtro normal;
9. Adicionar a fase sólida **5 mL de diclorometano:metanol (2:1)**;
10. Agitar no vortex (10 seg) e levar à agitação no ultra-sons durante 5 minutos a 30 °C;
11. Centrifugar para separar a fase sólida (10 min. a 2500 rpm) e retirar o máximo de solvente para o tubo do passo 5, passando pelo filtro normal;
12. Adicionar ao filtrado (tubo do passo 5) **3 mL de solução de Cloreto de potássio ou cloreto de sódio 0,8%**, agitar no vortex (10s) e centrifugar (5 min. a 2500 rpm);
13. Retirar a parte inferior (com pipeta de Pasteur ou com pipeta normal com pompete) passando por um filtro separador de fases (que de humedece com diclorometano) para:
  - i. **Tubo de 23 mL** – análise de perfil de ácidos gordos
  - ii. **Erlenmeyers de 50 mL previamente tarados** – análise ponderal
14. Adicionar **4 mL de diclorometano:metanol:solução salina 0,8% (86:14:1)** à fracção aquosa ( fase superior) que ficou no tubo do passo 5;



15. Agitar no vortex (10 seg), centrifugar (5 min. a 2500 rpm) e retirar a parte inferior que se adiciona ao tubo ou erlenmeyer do passo 13;
16. Levar os erlenmeyers ao evaporador rotativo a 40 °C e o tubo ao evaporador de corrente de azoto a 37°C;
17. Colocar os erlenmeyers na estufa de vácuo a 70 °C durante 2 horas. Retirar os erlenmeyers da estufa e colocar no excicador com as tampas e após 1 hora pesar.

## **2º Passo: Transesterificação Combinada – Raes et al. (2001)**

### Reagentes e Soluções :

- Água ultrapura;
- Tolueno Seco;
- *n*-Hexano – com a adição de 25 mg/L de BHT;
- *n*-Hexano para GC;
- Metóxido de sódio 0,5M – Solução de NaOMe 0,5 mol/L em metanol anidro;
- Ácido clorídrico:metanol 1:1 (v/v) – Mistura de HCl 37% e metanol.
- Sulfato de sódio anidro.

### Procedimento :

(Evitar a água e usar reagentes desidratados e tubos bem fechados com tampas de teflon)

1. Adicionar ao resíduo lipídico resultante da extração **1 mL de tolueno seco** (lípidos totais <50 mg) ou um volume X de solvente de modo a ajustar a concentração final de 40 mg/mL;
2. Adicionar **1mL de padrão interno** (C19:0 éster metílico a 1 mg/mL em *n*-hexano);
3. Adicionar **3 mL de metóxido de sódio 0,5M**, agitar no vortex (10 s) e colocar no banho a 50 °C durante 30 minutos. Retirar e deixar arrefecer à temperatura ambiente;
4. Adicionar **2 mL de HCl/metanol** (1:1, v/v), agitar no vortex (10 s) e colocar no banho a 50 °C durante 10 minutos. Deixar arrefecer à temperatura ambiente.



5. No fim da reacção adicionar **2 mL de água ultrapura**;
6. Adicionar **3 mL de *n*-hexano**, agitar no vortex (10 s) e centrifugar (durante 5 min. a 2500 rpm), recolhendo o sobrenadante para tubos de 16 mL;
7. Repetir o passo anterior colocando o sobrenadante no mesmo tubo de 16 mL;
8. Adicionar **0,5 g de sulfato de sódio anidro** à fase orgânica (tubo do passo 6) e agitar no vortex;
9. Centrifugar (durante 5 minutos a 2500 rpm) e transferir o solvente para outro tubo de 16 mL.
10. Evaporar o solvente em corrente de azoto a 37°C até secar;
11. Adicionar cerca de **2 mL de *n*-hexano para GC** e dividir em duas alíquotas (1 vial para GC e 1 vial para HPLC).

## II - Métodos de análise de ácidos gordos em leite e seus derivados



Nº	Descrição
LML-M3.1	<a href="#">Análise de ácidos gordos em leite fresco</a>
LML-M4.1	<a href="#">Análise de ácidos gordos em gordura de leite</a>
LML-M5.1	<a href="#">Análise de ácidos gordos em manteiga</a>
LML-M6.1	<a href="#">Análise de ácidos gordos em queijo</a>



## **Análise de ácidos gordos em leite fresco**

(adaptado de Shingfield e al. 2006, J. Dairy Science 89:714-732)

### 1º Passo: Extracção de lípidos

#### Reagentes:

- Éter etílico;
- Etanol;
- n-Hexano;
- Mistura de éter etílico:n-hexano (5:4, v/v);

#### Procedimento:

1. Colocar 1 mL de amostra de leite num tubo de ensaio (de 16 mL).
2. Adicionar 1 mL de etanol.
3. Adicionar 4,5 mL de mistura éter etílico:n-hexano (5:4).
4. Agitar em vortex (10 seg.), centrifugar durante 15 min. a 2500 rpm e retirar a fase superior para um novo tubo (de 16 mL).
5. Adicionar 0,5 mL de etanol.
6. Adicionar 4,5 mL de mistura éter etílico:n-hexano (5:4).
7. Agitar em vortex (10 seg.), centrifugar durante 15 min. a 2500 rpm e retirar a fase superior para o mesmo tubo do passo 4.
8. Adicionar novamente 4,5 mL de mistura éter etílico:n-hexano (5:4).
9. Agitar em vortex (10 seg.), centrifugar durante 5 min. a 2500 rpm e retirar a fase superior para o mesmo tubo do passo 4.
10. Evaporar o extracto lípidico em corrente de azoto a 37°C.



## 2º Passo: Metilação básica

### Reagentes e soluções:

- Metanol;
- Hidróxido de potássio (KOH);
- n-Hexano;
- Preparar solução de KOH 2M em metanol, **por adição muito lenta e com agitação** do metanol ao KOH (reacção exotérmica);

### Procedimento:

1. Dissolver o extracto lipídico resultante do 1º Passo em 1 mL de n-Hexano.
2. Adicionar 0,2 mL de solução KOH em Metanol.
3. Agitar em vortex durante 3 min. e deixar repousar durante 1 hora.
4. Adicionar com uma pipeta de pasteur 2 gotas de ácido acético glacial e agitar em vortex (10 seg.).
5. Transferir a fase líquida para um novo tubo (de 16 mL), o qual já contém aprox. 500 mg de sulfato de sódio anidro.
6. Agitar em vortex durante 2 min. e centrifugar durante 5 min. a 2500 rpm.
7. Retirar a fase de n-Hexano com uma pipeta de pasteur (com bastante cuidado para não ressuspender o sulfato de sódio) para um vial de GC.
8. Fechar bem o vial de GC para não ocorrer evaporação dos ácidos gordos de cadeia curta e guardar no frigorífico ou congelador.



## Análise de ácidos gordos em gordura de leite

(adaptado de Molquentin and Precht, 2000)

Método de transesterificação directa em meio básico

### Reagentes e soluções:

- Metanol;
- Hidróxido de potássio (KOH);
- n-Hexano;
- Preparar solução de KOH 2M em metanol, **por adição muito lenta e com agitação** do metanol ao KOH (reacção exotérmica);

### Procedimento:

1. Pesar 50 mg de gordura de leite para um tubo de ensaio (de 16 mL).
2. Adicionar 1 mL de n-Hexano e 0,2 mL de solução KOH em Metanol.
3. Agitar em vortex durante 3 min. e deixar repousar durante 1 hora.
4. Adicionar com uma pipeta de pasteur 2 gotas de ácido acético glacial e agitar em vortex (10 seg.).
5. Transferir a fase líquida para um novo tubo (de 16 mL), o qual já contém aprox. 500 mg de sulfato de sódio anidro.
6. Agitar em vortex durante 2 min. e centrifugar durante 5 min. a 2500 rpm.
7. Retirar a fase de n-Hexano com uma pipeta de pasteur (com bastante cuidado para não ressuspender o sulfato de sódio) para um vial de GC.
8. Fechar bem o vial para não ocorrer evaporação dos ácidos gordos de cadeia curta e guardar no frigorífico ou congelador.



## **Análise de ácidos gordos em manteiga**

(adaptado de Molquentin and Precht, 2000)

Método de transesterificação directa em meio básico

### Reagentes e soluções:

- Metanol;
- Hidróxido de potássio (KOH);
- n-Hexano;
- Preparar solução de KOH 2M em metanol, **por adição muito lenta e com agitação** do metanol ao KOH (reação exotérmica);

### Procedimento:

1. Pesar 50 mg de manteiga para um tubo de ensaio (de 16 mL).
2. Adicionar 1 mL de n-Hexano e 0,2 mL de solução KOH em Metanol.
3. Agitar em vortex durante 3 min. e deixar repousar durante 1 hora.
4. Adicionar com uma pipeta de pasteur 2 gotas de ácido acético glacial e agitar em vortex (10 seg.).
5. Transferir a fase líquida para um novo tubo (de 16 mL), o qual já contém aprox. 500 mg de sulfato de sódio anidro.
6. Agitar em vortex durante 2 min. e centrifugar durante 5 min. a 2500 rpm.
7. Retirar a fase de n-Hexano com uma pipeta de pasteur (com bastante cuidado para não ressuspender o sulfato de sódio) para um vial de GC.
8. Fechar bem o vial para não ocorrer evaporação dos ácidos gordos de cadeia curta e guardar no frigorífico ou congelador.



## Análise de ácidos gordos em queijo

### 1º Passo: Extracção de lípidos do queijo

#### Reagentes e soluções:

- Etanol;
- Éter etílico;
- Éter de petróleo;
- Ácido clorídrico (25%);

#### Procedimento:

1. Pesar 100 mg de queijo (homogeneizado) para tubo de ensaio (de 16 mL).
2. Adicionar 0,5 mL de ácido clorídrico 25% e 1 mL de etanol.
3. Agitar vigorosamente em vortex durante 1 minuto.
4. Adicionar 2,5 mL de éter etílico e 2,5 mL de éter de petróleo e agitar vigorosamente em vortex (1 min.), se necessário homogeneizar a amostra com uma vareta de vidro.
5. Centrifugar durante 5 min. a 2500 rpm e transferir a fase superior para um novo tubo (de 23 mL).
6. Repetir os passos 4 e 5 mais duas vezes colocando a fase superior sempre no mesmo tubo do passo 5.
7. Evaporar o extracto lipídico em corrente de azoto a 30°C.



## 2º Passo: Metilação Combinada

### Reagentes e soluções:

- Metóxido de sódio 0,5M (Solução 0,5 mol/L em metanol anidro);
- Solução de ácido clorídrico 37%:metanol (1:1, v/v);
- n-Hexano com adição de 25 mg/mL de BHT;
- Sulfato de sódio anidro;
- Água ultrapura;
- Padrão interno, éster metílico C19:0 (1 mg/mL em n-Hexano);

NOTA: após a reacção de metilação fechar sempre os tubos e vials para evitar a evaporação dos ácidos gordos de cadeia curta.

### Procedimento:

1. Diluir a amostra resultante do passo de extracção em 1 mL de n-Hexano.
2. Adicionar 1 mL de padrão interno (1mg/mL) - **opcional**
3. Adicionar 3 mL de solução metóxido de sódio em metanol anidro (0,5 M) e agitar em vortex (10 seg.).
4. Colocar em banho de água a 50 °C, durante 30 minutos, e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
5. Adicionar 2 mL de HCl/metanol (1:1) e agitar em vortex (10 seg.).
6. Colocar novamente em banho de água a 50 °C, durante 10 minutos, e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
7. No final da reacção adicionar 2 mL de água ultrapura.
8. Adicionar 2 mL de n-Hexano, agitar em vortex (10 seg.) e centrifugar durante 5 minutos (2500 rpm).
9. Recolher o sobrenadante para um novo tubo, o qual já contém 0,5 g de sulfato de sódio anidro.
10. Agitar em vortex (10 seg.) e centrifugar (5 min) a 2500 rpm.
11. Retirar a fase de hexano para um vial de GC.
12. Fechar bem o vial para não ocorrer evaporação dos ácidos gordos de cadeia curta e guardar no frigorífico ou congelador.

### III – Métodos de análise de ácidos gordos em alimentos



Nº	Descrição
LML-M7.1	<a href="#">Transesterificação directa em alimentos</a>
LML-M8.1	Extracção e derivatização de ácidos gordos em alimentos



## Transesterificação directa em alimentos

(adaptado de Sukhija e Palmquist, 1988)

### Reagentes e soluções:

- Preparar solução 5% HCl em metanol, **adicionando muito lentamente e com cuidado** (reacção exotérmica) 10 mL de cloreto de acetilo em 100 mL de metanol seco, sob agitação;
- Padrão interno: C19:0 ou C17:0 ácido (1 mg/mL) em tolueno seco;
- Solução aquosa 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>;
- Tolueno;
- Sulfato de sódio anidro;
- Carvão activado (para amostras muito pigmentadas);

### Procedimento:

1. Pesar amostras para tubos (de 23 mL) com rolhas de teflon (certificar que vedam bem)
  - 50 a 500 mg de forragens ou grãos
  - 100 mg de sementes de oleaginosas

Nota: A quantidade de amostra deve ser tal de modo a conter 10 a 50 mg de ácidos gordos.

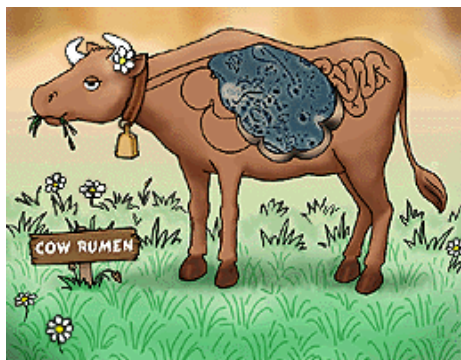
2. Adicionar com cuidado (sem tocar nas paredes) 1 mL de padrão interno, 1 mL de tolueno e 3 mL de solução metanólica 5% HCl.
3. Rolhar bem os tubos e agitar em vortex (1 min.) a baixa velocidade.
4. Colocar em banho de água, durante 2 horas, a 70°C (ou a 90°C no caso de sabões).
5. Deixar arrefecer à temperatura ambiente.
6. Adicionar 5 mL de solução aquosa 6% K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> e 2 mL de tolueno.
7. Agitar em vortex durante 30 segundos a velocidade média, e centrifugar durante 5 minutos.

## Método LML-M7.1



8. Transferir a fase orgânica para um novo tubo (de 16 mL), ao qual se adicionou aproximadamente 1 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .
9. Em amostras bastante pigmentadas adicionar 1 g de carvão activado, agitar em vortex (10 seg.) e deixar repousar durante 1 hora.
10. Centrifugar durante 5 minutos e transferir o sobrenadante para outro tubo.
11. Evaporar o solvente em corrente de azoto a  $37^\circ\text{C}$ .
12. Adicionar 1,5 mL de n-Hexano para GC e colocar em viais para levar ao cromatógrafo.

## IV – Métodos de análise de ácidos gordos em conteúdo e bactérias ruminais



---

Nº	Descrição
LML-M9.1	<a href="#">Recolha de Amostras de Protozoários, Conteúdo e Bactérias Ruminais</a>
LML-M10.1	<a href="#">Extracção de lípidos de Conteúdo e Bactérias Ruminais</a>

---



**Método para recolha de Protozoários, Conteúdo e Bactérias Ruminais  
(SAB e LAB)**

**Material:**

- ⇒ Balão de 4 litros (para recolha do conteúdo ruminal)
- ⇒ Kitasato de 2 litros
- ⇒ 2 x 8 camadas de gazes
- ⇒ Frasco de tampa vermelha – de plástico
- ⇒ Frasco de 1 litro de Schott
- ⇒ Funil de boca larga – de plástico
- ⇒ Funil de porcelana
- ⇒ Vareta

**Equipamentos :**

- ⇒ Balança
- ⇒ Ultracentrifuga
- ⇒ Blender

**Soluções :**

- ⇒ Solução salina (0,85% NaCl) a 39°C
- ⇒ Solução salina com 0,1% carboximetilcelulose a 39°C
- ⇒ Solução salina à temperatura ambiente



Procedimentos:

Dia 1

1. Recolher o conteúdo ruminal para um balão de vidro. Homogeneizar e verter conteúdo ruminal total para 2 recipientes – 1 para análise do **Conteúdo Ruminal – (CR-T)** e o outro para **Contagem de Protozoários**. O recipiente que contém o conteúdo ruminal para contagem de protozoários coloca-se no frio até filtração. Filtrar com 4 camadas de gaze. Adicionar aos protozoários Formol.
2. O restante conteúdo ruminal é utilizado para o isolamento das bactérias ruminais;
3. Filtrar o conteúdo ruminal por 8 camadas de gaze, com auxílio de funil de porcelana para kitsatos de 2 litros;
4. Pesar o resíduo sólido numa cápsula de porcelana;
5. Colocar o resíduo sólido num frasco de tampa vermelha, desfeito previamente com as mãos e ressuspender o resíduo sólido em **2 vezes** o seu peso com **solução salina (0,85% NaCl a 39°C)** e agitar vigorosamente;
6. Filtrar novamente por 8 camadas de gaze, com o auxílio de um funil de porcelana, e adicionar o líquido de lavagem ao frasco de recolha anterior (ponto 3 – Kitasato de 2 litros).  
**A fracção líquida total obtida designa-se por Fase Líquida – FL (esta fase passa de imediato para o passo 11).**  
**A fracção sólida designa-se por Partículas Ruminais Filtradas – PRF.**
7. Retirar uma amostra das **PRF** para posterior análise;
8. Pesar as **PRF**;
9. Com a ajuda de um funil de boca larga e vareta colocar a totalidade das **PRF** num frasco de 1L de Schott. Ressuspender as **PRF** em **3 vezes** o seu peso de **solução salina com 0,1% carboximetilcelulose a 39°C**, agitar durante 2 minutos e incubar a 39°C durante 15 minutos; → os frascos só têm capacidade para cerca de 300 g. de **PRF**.
10. Colocar as **PRF** ressuspensas em câmara frigorífica por 24 horas;
11. Centrifugar de imediato a **FL** a 500g durante 5 minutos, sendo obtido um resíduo rico em resíduos de plantas e protozoários;



12. Separar o resíduo do sobrenadante;  
Eliminar o resíduo rico em resíduos de plantas e em Protozoários  
O Sobrenadante coloca-se num recipiente  
Para centrifugar a totalidade da **FL** são necessárias várias centrifugações pelo que é melhor ir colocando o sobrenadante num frasco de Schott/balão até ter tudo filtrado. É melhor fazer para todos os animais a 1ª centrifugação e só depois passar para a centrifugação do sobrenadante.
13. Centrifugar o sobrenadante a 20000g durante 20 minutos;
14. O resíduo é aproveitado e o sobrenadante destas centrifugações é eliminado.
15. Quando tivermos a totalidade do resíduo ressuspender o resíduo com solução salina à temperatura ambiente e recentrifugar a 20000g durante 20 minutos;
16. Eliminar o sobrenadante e repetir o passo anterior, sendo o resíduo obtido designado de **bactérias associadas à fase líquida (LAB)**.

## Dia 2

1. Transferir o conteúdo do frasco de Schott para o copo da blender e homogeneizar a suspensão numa blender durante 30 segundos por 6 vezes;
2. Filtrar a suspensão por 8 camadas de gaze, com auxílio de funil de porcelana, para um kitasato de 2 litros;
3. Colocar o resíduo sólido num frasco de litro de Schott, (com auxílio de um funil de boca larga e vareta) desfeito previamente com as mãos e ressuspender com 300 mL de solução salina à temperatura ambiente;
4. Filtrar novamente por 8 camadas de gaze e adicionar o liquido de lavagem ao frasco da recolha anterior,  
**A fracção líquida total obtida designa-se por Fase Líquida – FL.**  
**A fracção sólida designa-se por Partículas Ruminais Extraídas – PRE.**
5. Retirar uma amostra das **PRE** para posterior análise;
6. Centrifugar a **FL** a 500g durante 5 minutos;
7. Separar a resíduo do sobrenadante;

## Método LML-M9.1



- O resíduo é eliminado e o sobrenadante é armazenado num frasco de schott/balão até se terminarem todas as 1ª centrifugações;
8. Centrifugar o sobrenadante a 20000g durante 20 minutos;
  9. O resíduo é aproveitado e o sobrenadante é eliminado.
  10. Quando se tiver todo resíduo ressuspender o resíduo com solução salina à temperatura ambiente e recentrifugar a 20000g durante 20 minutos;
  11. Eliminar o sobrenadante e repetir o passo anterior, sendo o resíduo obtido designado de **bactérias associadas à fase sólida (SAB)**.



## **Determinação das fracções de lipídicas de bactérias e conteúdo ruminais**

### **Extracção de lípidos em amostras de conteúdo ruminal, bactérias ruminais e conteúdo cecal liofilizado**

Descrição do método – Extracção dos lípidos com diclorometano:metanol (2:1) em meio neutro seguida de extracção em meio ácido com hexano. A fase de extracção ácida é necessária para dissociar os ácidos gordos associados aos sabões e lipopolissacarídeos microbianos.

Referências – Adaptação do Folch como descrito para o músculo liofilizado seguida de extracção em meio ácido adaptado do procedimento de Bauchart *et al.* (1984 descrito em Ferlay (1992)).

Cada amostra é feita em triplicado: duas replicas para determinação da gordura total (análise ponderal) e uma para determinação dos ácidos gordos (metilação).

#### Reagentes e Soluções :

- Metanol
- Diclorometano
- Diclorometano:metanol (2:1) (vol/vol)
- *n*-Hexano

Estes solventes devem conter cerca de 25 mg/L de BHT

- Cloreto de potássio ou Cloreto de sódio 0,8% (p/vol)
- Diclorometano:metanol:solução salina 0,8% (86:14:1) (vol/vol/vol)
- Ácido clorídrico 12 N
- Solução ácida – Etanol (95%): água: ácido clorídrico 12 N (5:4:1) (vol/vol/vol) saturar com NaCl e filtrar.



### Preparativos:

- Colocar os erlenmeyers sem tampa na estufa de vácuo a 70 °C com uma pinça. Após duas horas retirar os erlenmeyers e coloca-los com tampa num excicador e pesar após uma hora. Após pesagem voltar a colocar os erlenmeyers com tampa no excicador. Não tocar nos Erlenmeyers com os dedos e não escrever.
- Pesar a amostra para os tubos de 26 mm de boca esmerilada e guardar no frio.
- Dobrar os filtros normais e os filtros separadores de fases.
- Preparar o Diclorometano:metanol (2:1).
- Preparar o cloreto de potássio ou Cloreto de sódio 0,8%.
- Preparar o Diclorometano:metanol:solução salina 0,8%.
- Preparar a solução ácida.

### Procedimentos:

#### *1ª Parte – Extracção em meio neutro*

1. Pesar entre 250 mg a 600 mg de amostra para os tubos de vidro de 26 mm de boca esmerilada. Cada toma deve conter entre a 20 a 40 mg de lípidos, pelo que no Quadro 1 apresentam-se alguns valores de referência, para determinação da quantidade de amostra a pesar.
2. Adicionar 2,5 mL de metanol e deixar humedecer durante 5 minutos.
3. Agitar no vortex e colocar no ultra-sons a agitar durante 5 minutos.
4. Adicionar 5 mL de diclorometano.
5. Agitar no vortex e colocar novamente no ultra-sons a agitar durante 5 minutos.
6. Centrifugar durante 2 a 3 minutos a 2500 rpm, para separar a fase sólida.
7. Retirar o máximo de solvente para um outro tubo de 26 mm de boca esmerilada, passando por um filtro normal.
8. Adicionar à fase sólida 7,5 mL de diclorometano:metanol (2:1).
9. Agitar no vortex e levar à agitação no ultra-sons durante 10 minutos.

## Método LML-M10.1



10. Centrifugar durante 2 a 3 minutos a 2500 rpm.
11. Retirar o máximo de solvente para o mesmo tubo do passo 7, usando um filtro normal.
12. Adicionar a fase sólida 7,5 mL de diclorometano:metanol (2:1).
13. Agitar no vortex e levar a agitação no ultra-sons durante 5 minutos.
14. Centrifugar durante 2 a 3 minutos a 2500 rpm.
15. Retirar o máximo solvente para o mesmo tubo do passo 7, usando um filtro. O tubo contendo o resíduo sólido será utilizado na extração em meio ácido (2º parte do método).
16. Adicionar 5,6 mL de solução de cloreto de potássio ou cloreto de sódio 0,8% ao tubo contendo o solvente (tubo do passo 7).
17. Agitar no vortex (durante 10 seg.) e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.
18. Retirar a parte inferior (com pipeta de pasteur ou com pipeta normal com pompete) passando por um filtro separador de fases (que se humedece com diclorometano) para:
  - i. **Tubo de 16 mm** – o solvente contido nos tubos destinados a determinação do perfil de ácidos gordos.
  - ii. **Erlenmeyers de 50 mL previamente tarado** – o solvente contido nos tubos destinados a análise ponderal.
19. Adicionar 4,5 mL de diclorometano:metanol:solução salina 0,8% (86:14:1) a fracção aquosa (superior) que ficou no tubo.
20. Agitar no vortex (durante 10 seg.) e centrifugar durante 5 minutos a 2500 rpm.
21. Retirar a parte inferior que se adiciona no mesmo tubo ou erlenmeyer.
22. Evaporar em evaporador rotativo a 40 °C o conteúdo dos erlenmeyers e em evaporador em corrente de azoto a 30°C o conteúdo dos tubos.
23. Colocar os erlenmeyers na estufa de vácuo a 70 °C durante 2 horas.
24. Retirar os erlenmeyers da estufa, colocar no excicador e após uma hora pesar.



*2ª Parte – Extração em meio ácido*

1. Adicionar 10 mL de solução ácida ao tubo que contem o resíduo sólido (da 1ª parte).
2. Adicionar 12,5 mL de hexano.
3. Agitar no vortex e colocar no ultra-sons durante 5 minutos.
4. Centrifugar durante 2 a 3 minutos a 2500 rpm para separar a fase sólida.
5. Retirar o máximo de solvente para uma ampola de decantação de 100 mL, usando um filtro normal.
6. Adicionar novamente 10 mL de solução ácida e 12,5 mL de hexano ao tubo contendo resíduo sólido.
7. Agitar no vortex e colocar no ultra-sons a agitar durante 5 minutos.
8. Centrifugar durante 2 a 3 minutos a 2500 rpm.
9. Transferir todo o conteúdo do tubo para a ampola de decantação de 100 mL com a ajuda de um filtro normal para reter a fase sólida.
10. Lavar a fracção sólida retida no filtro com 5 mL de hexano.
11. Agitar manualmente, mas com vigor, a ampola de decantação.
12. Deixar separar as fases.
13. Recolher a fase inferior aquosa (cerca de 20 mL) para uma ampola de decantação de 50 mL.
14. Adicionar 10 mL de hexano à fase aquosa contida na ampola de decantação de 50 mL.
15. Agitar manualmente a ampola de decantação e deixar separar as fases.
16. Eliminar a fase inferior aquosa e transferir com ajuda de funil e filtro separador de fases a fase orgânica para a ampola de decantação de 100 mL que já contém a fase hexanóica anterior.
17. Lavar a fase hexanóica com água ultra pura até à neutralidade: Adicionar 30 mL de água, agitar a ampola, deixar separar as fases e eliminar a fase aquosa controlando o pH com fita indicadora de pH. Repetir o procedimento até o pH da água ser neutro.
18. Transferir a fase hexanóica lavada para o erlenmeyer tarado para determinação ponderal ou não tarado para análise de ácidos gordos com ajuda de funil e filtro separador de fases.

## Método LML-M10.1



19. Levar os erlenmeyers ao evaporador rotativo a 40 °C. O erlenmeyer destinado à análise de ácidos gordos deve evaporar até ao volume de 5 a 10 mL e transferido para tubos de 16 mm e prosseguir a evaporação no evaporador em corrente de azoto a 30 °C.
20. Colocar os erlenmeyers na estufa de vácuo a 70 °C durante 2 horas.
21. Retirar os erlenmeyers da estufa, colocar no excicador e após uma hora pesar.

**Quadro 1** – Valores de referência, para determinação da quantidade de amostra a pesar.

Tipo de Amostra	% de lípidos
Conteúdo ruminal de animais não suplementados com lípidos	2,5 a 3,7 % (25% de sabões)
Conteúdo ruminal de animais suplementados com 3,5 % de lípidos	7% (46% de Sabões)
Conteúdo ruminal de animais suplementados com 6 % de lípidos	9,1 a 9,6% (33 a 58% de sabões)
Conteúdo ruminal de animais suplementados com 12 % de lípidos	13% (39 a 66% de sabões)
Conteúdo cecal de animais não suplementados com lípidos	3,7% (25% de sabões)
Conteúdo cecal de animais suplementados com 3,5% de lípidos	6% (44% de sabões)
Conteúdo cecal de animais suplementados com 6,5% de lípidos	8% (51% de sabões)

## V – Métodos de análise de ácidos gordos voláteis



Nº	Descrição
LML-M18.1	<a href="#">Análise de ácidos gordos voláteis em conteúdos digestivos e silagens</a>



## **Análise de ácidos gordos voláteis em conteúdos digestivos e silagens**

### Solução:

- Ácido ortofosfórico (25% v/v)

### Preparação do extracto de conteúdos digestivos:

1. Pesar 5 g de conteúdo digestivo para um tubo de ensaio plástico de 15 mL.
2. Adicionar 10 mL de água destilada.
3. Agitar em vortex a média velocidade durante 3 min. e deixar repousar de um dia para o outro a 4°C.
4. Filtrar o extracto por 4 camadas de gaze para novo tubo de ensaio.
5. Guardar no frigorífico ou congelador até processamento.

Nota: O suco de rúmen filtrado não precisa de preparação.

### Preparação do extracto de silagens:

1. Cortar a silagem em troços muito finos.
2. Pesar 20 g de amostra para erlenmeyer de 250 mL.
3. Adicionar 100 mL de água destilada a 40°C.
4. Agitar em agitador mecânico durante 20 min. e deixar macerar durante a noite a 4°C.
5. Filtrar o extracto por 4 camadas de gaze para tubo de centrífuga.
6. Centrifugar a 3000 rpm durante 10 min. ou a 1500 rpm durante 15 min..
7. Recolher o sobrenadante para tubo de ensaio de plástico.
8. Guardar no frigorífico ou congelador até processamento.

### Procedimento:

1. Pipetar 1,25 mL de extracto bem homogenizado, em duplicado, para um eppendorf.
2. Adicionar 0,25 mL de ácido ortofosfórico.



3. Agitar em vortex a baixa velocidade durante 30 seg. e deixar repousar durante 30 min..
4. Centrifugar a 15000 rcf durante 15 min. a 4°C.
5. Transferir o sobrenadante com uma pipeta de pasteur para um vial de GC.
6. Fechar bem o vial para não ocorrer evaporação dos ácidos gordos voláteis e guardar no frigorífico ou congelador.

### Cromatografia gasosa:

#### 1. Coluna:

Coluna semicapilar MN 116 (Permabond-FFAP, Macherey-Nagel) de 50 m x 0,25  $\mu\text{m}$  x 0.25 mm ID, com temperatura máxima de 240°C.

#### 2. Injector:

- 2.1. Temperatura de 230°C.
- 2.2. Pressão de 10 psi.
- 2.3. Split de 50:1.
- 2.4. Fluxo de split de 17,8 mL/min.
- 2.5. Fluxo total de 20,4 mL/min.
- 2.6. Hélio como gás de arraste.
- 2.7. Gas saver ligado, de 15,0 mL/min. após 2 min.
- 2.8. Injecção das amostras:
  - 2.8.1. Antes da injecção a seringa é lavada 3 vezes com o solvente A (metanol:H<sub>2</sub>O ultrapura 1:1), 3 vezes com o solvente B (H<sub>2</sub>O ultrapura) e 2 vezes com a amostra a injectar.
  - 2.8.2. Injecção de 1  $\mu\text{L}$  de amostra, após 3 pumps.
  - 2.8.3. Após a injecção a seringa é lavada 3 vezes com o solvente A e 5 vezes com o solvente B.

#### 3. Detector:

- 3.1. Temperatura de 280°C.
- 3.2. Fluxo de H<sub>2</sub> de 30 mL/min.
- 3.3. Fluxo de ar reconstituído de 300 mL/min.
- 3.4. Pressão constante de 10 psi + makeup flow de 30mL/min.

4. Forno:

Rampa (°C/min)	Temperatura (°C)	Duração (min)	Duração final (min)
	110	1	1
6	170	1	12
15	230	15	31
	110	2	33

5. Preparação das soluções padrão:

Preparar soluções aquosas “stock” de 50 mM para os seguintes ácidos gordos: acético (C2), propiónico (C3), isobutírico (iso-C4), butírico (C4), isovalérico (iso-C5), valérico (C5), isocapróico (iso-C6) e capróico (C6), de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1 - Densidade, peso molecular dos AGV e cálculos para obter a solução stock de 50 mM (mL/L de água).

	Densidade	Peso molecular	50 mM (mL/L)
Ácido acético (C2)	1,049	60,05	2,86
Ácido propiónico (C3)	0,992	74,08	3,73
Ácido isobutírico (iso-C4)	0,942	88,11	4,68
Ácido butírico (C4)	0,959	88,11	4,59
Ácido isovalérico (iso-C5)	0,93	102,14	5,49
Ácido valérico (C5)	0,94	102,14	5,43
Ácido isocapróico (iso-C6)	0,92	116,16	6,31
Ácido capróico (C6)	0,927	116,16	6,27

Preparar 100 mL de solução “stock” que será utilizada para obter as soluções diluídas para 40, 30, 20, 10, 5 e 1 mM em balões volumétricos de 25 mL (Tabela 2).



Tabela 2. Preparação de soluções diluídas (em balão de 25 mL) a partir da solução stock de 50 mM.

Solução alvo	mL de solução stock (50 mM)*
40 mM	20
30 mM	15
20 mM	10
10 mM	5
5 mM	2,5
1 mM	0,5

\* - completar o volume do balão com água ultrapura

*Notas:* Preparar as soluções padrão sempre na Hotte.

Manter os padrões no frio, bem rolhados e acondicionados com parafilme.

Não foi testada a durabilidade dos padrões armazenados.

## 6. Método:

O método de corrida é o "AGV\_MN.m". Este método utiliza curvas de calibração com padrões externos, sendo obtidas rectas de calibração linear para cada ácido gordo volátil.

## 7. Cálculos:

O cálculo das concentrações, expressas em mM/L, de cada ácido gordo é efectuado da seguinte forma:

6.1.  $C2 = [(Area \text{ cromatograma} - 1,3177295) \times 17,2276761] \times \text{diluição}.$

6.2.  $C3 = [(Area \text{ cromatograma} - 4,9790655) \times 30,2654256] \times \text{diluição}.$

6.3.  $iso-C4 = [(Area \text{ cromatograma} - 13,600038) \times 38,917404] \times \text{diluição}.$

6.4.  $C4 = [(Area \text{ cromatograma} - 10,253133) \times 40,6227601] \times \text{diluição}.$

6.5.  $iso-C5 = [(Area \text{ cromatograma} - 18,06208) \times 47,2588625] \times \text{diluição}.$

6.6.  $C5 = [(Area \text{ cromatograma} - 14,489013) \times 49,2585597] \times \text{diluição}.$

6.7.  $iso-C6 = [(Area \text{ cromatograma} - 17,716335) \times 47,7805178] \times \text{diluição}.$

6.8.  $C6 = [(Area \text{ cromatograma} - 4,1663277) \times 4,22719511] \times \text{diluição}.$



8. Apresentação de resultados:

As concentrações de AGV nos conteúdos digestivos são expressas em mM/L, como determinado no passo anterior.

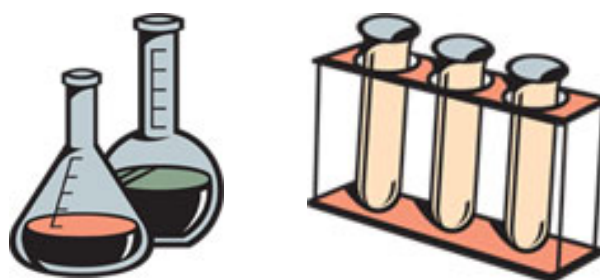
As concentrações de AGV nas silagens são expressas em g/Kg, sendo necessário multiplicar o valor obtido em mM/L pelo peso molecular do AGV e dividir por 1000.

9. Problemas mais frequentes:

O problema mais frequente é a contaminação de amostras durante a cromatografia, devido ao elevado grau de sujidade que algumas amostras apresentam, nomeadamente as amostras de conteúdos digestivos que não o ruminal.

Neste caso deve ser realizada uma filtragem, com papel de filtro, prévia à centrifugação. Devem, ainda, ser feitas corridas de limpeza (metanol e água ultrapura) em maior número entre amostras, por exemplo uma corrida de metanol e duas corridas de água ultrapura de 4 em 4 corridas de amostras.

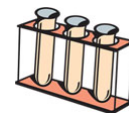
## VI – Métodos de separação de fracções lipídicas e ácidos gordos



---

Nº	Descrição
LML-M11.1	<a href="#"><u>Separação de isómeros <i>cis</i> e <i>trans</i> por SPE</u></a>
LML-M12.1	<a href="#"><u>Separação de isómeros <i>cis</i> e <i>trans</i> por TLC</u></a>
LML-M13.1	<a href="#"><u>Separação de lípidos neutros e polares por SPE</u></a>
LML-M19.1	<a href="#"><u>Separação qualitativa de ácidos gordos por TLC</u></a>

---



## Separação de Isómeros *cis* e *trans* por SPE

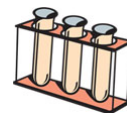
(Discovery Ag-Ion SPE tube, 750 mg/6ml – Supelco (54225-U))

### Reagentes e soluções:

- *n*-hexano;
- Acetona;
- *n*-hexano:acetona (96:4);
- *n*-hexano:acetona (90:10);

### Procedimento:

1. Adicionar 4 mL de acetona na coluna e deixar eluir gota a gota sem secar.
2. Adicionar 4 mL de *n*-hexano na coluna e deixar eluir gota a gota sem secar.
3. Colocar a amostra na coluna – 1mL de FAMES em *n*-hexano.  
As colunas têm uma capacidade máxima de 1 mg de FAMES/mL.  
Deixar eluir gota a gota até a amostra estar toda na matriz da coluna e desperdiçar estes solventes
4. Adicionar 6 mL de *n*-hexano:acetona (96:4). Deixar eluir gota a gota para um tubo. Retirar o tubo que contem a Fracção 1.  
**Fracção 1** – ácidos gordos saturados, *trans* monoenóicos; conjugados do ácido linoleico *cis/cis* e *trans/trans*.
5. Adicionar 4 mL de *n*-hexano:acetona (90:10). Deixar eluir gota a gota para um tubo. Retirar o tubo que contem a Fracção 2.  
**Fracção 2** – *cis* monoenóicos; *trans/trans* dienóicos, conjugados do ácido linoleico *cis/trans* e *trans/cis*.
6. Adicionar 4 mL de acetona. Deixar eluir gota a gota para um tubo. Retirar o tubo que contem a Fracção 3.  
**Fracção 3** – *cis/cis* dienóicos, outros dienóicos e vários trienóicos.
7. Evaporar os solventes em corrente de azoto a 40°C até secar.
8. Adicionar 1,5 mL de *n*-hexano para GC e transferir para um vial para correr no GC.



## Separação de Isómeros *cis* e *trans* por TLC

### 1º - Com placas Argentadas Manualmente

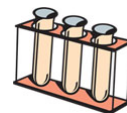
#### Reagentes e soluções:

- Nitrato de Prata 20%;
- Água Ultrapura;
- *n*-hexano;
- Éter dietílico;
- Ácido acético;
- Eluente - *n*-hexano : éter dietílico: ácido acético (90:9:1);
- Metanol;
- Cloreto de sódio 5%;

#### Procedimento:

#### Preparação das Placas de TLC e Eluição da amostra

1. Preparar a solução de nitrato de prata 20%.
2. Colocar a placa de TLC na solução durante cerca de 15 minutos.
3. Retirar e deixar seca a placa (secar com ar frio com ajuda de secador).
4. Repetir os passos 2 e 3.
5. Preparar o eluente – *n*-hexano: éter dietílico: ácido acético (90:9:1).
6. Colocar o eluente nos 2 compartimentos da tina cromatográfica e o papel de filtro. Fechar a tina e esperar pelo menos 30 min (saturação da tina).
7. Aplicar a amostra (FAMES) com o aplicador automático LINOMAT5. Entre aplicações lavar a seringa com *n*-hexano para GC.
8. Após a aplicação da amostra, secar a placa na “hotte” durante cerca de 5 min. com ar frio (usar secador) e colocar a placa na tina cromatográfica previamente saturada.
9. Deixar eluir o solvente até chegar a cerca de 1 cm da extremidade da placa.
10. Retirar a placa da tina e secar na “hotte” durante cerca de 5 min com ar frio (usar secador).
11. Polvilhar a placa com uma solução de 0,2% de 2', 7'-diclorofluoresceína em isopropanol;



12. Visualizar a placa com luz UV e assinalar as manchas com lápis.
13. Remover as manchas para tubos de ensaio – colocando os FAMES de isómeros de *cis* num tubo e os de *trans* noutro tubo.

### **Extracção:**

(adaptado de Ledoux et al., 2002)

14. Adicionar a cada tubo 1,5 mL de metanol, 2 mL *n*-hexano, 1,5 mL de cloreto de sódio 5%.
15. Agitar no vortex e centrifugar a 2500 rpm durante 5 min. para separar o solvente que contém os FAMES das partículas de sílica gel.
16. Transferir o sobrenadante para outro tubo.
17. Adicionar 2 ml de *n*-Hexano.
18. Agitar no vortex e centrifugar a 2500 rpm durante 5 min..
19. Transferir o sobrenadante para o tubo do ponto 16.
20. Evaporar o solvente em corrente de azoto a 40°C, até à secura.
21. Adicionar *n*-hexano para GC (cerca de 150 µL) aos tubos e transferir para um vial com “insert”.

### **2º - Com placas já Argentadas:**

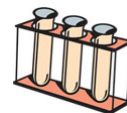
#### **Reagentes:**

- *n*-hexano;
- Éter dietílico;
- Ácido acético;
- Metanol;
- Cloreto de sódio 5%;

#### **Procedimento:**

#### **Eluição da amostra:**

1. Activar a placa de acordo com as instruções do produto.
2. Preparar o eluente – *n*-hexano: éter dietílico: ácido acético (90:9:1).

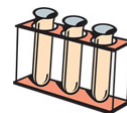


3. Colocar o eluente nos 2 compartimentos da tina cromatográfica e o papel de filtro. Fechar a tina e esperar pelo menos 30 min (saturação da tina).
4. Aplicar a amostra (FAMEs) com o aplicador automático LINOMAT5. Entre aplicações lavar a seringa com *n*-hexano para GC.
5. Após a aplicação da amostra, secar a placa na “hotte” durante cerca de 5 min com ar frio (usar secador) e colocar a placa na tina cromatográfica previamente saturada.
6. Deixar eluir o solvente até chegar a cerca de 1 cm da extremidade da placa.
7. Retirar a placa da tina e secar a placa na “hotte” durante cerca de 5 min. com ar frio (usar secador).
8. Polvilhar a placa com uma solução de 0,2% de 2', 7'-diclorofluoresceína em isopropanol;
9. Visualizar a placa com luz UV e assinalar as manchas com lápis.
10. Remover as manchas para tubos – colocando os FAMEs de isómeros de *cis* num tubo e os de *trans* noutra tubo.

### **Extracção:**

(adaptado de Ledoux et al., 2002)

11. Adicionar a cada tubo 1,5 mL de metanol, 2 mL *n*-hexano, 1,5 mL de cloreto de sódio 5%.
12. Agitar no vortex e centrifugar a 2500 rpm durante 5 min. para separar o solvente que contém os FAMEs das partículas de sílica gel.
13. Transferir o sobrenadante para outro tubo.
14. Adicionar 2 mL de *n*-Hexano.
15. Agitar no vortex e centrifugar a 2500 rpm durante 5 min..
16. Transferir o sobrenadante para o tubo do ponto 13.
17. Evaporar o solvente em corrente de azoto a 40°C, até à secura.
18. Adicionar *n*-hexano para GC (cerca de 150 µl) aos tubos e transferir para um vial com “insert”.



## **Separação/Doseamento de Lípidos Neutros e Lípidos Polares por SPE**

### Reagentes e Soluções:

- Diclorometano p.a;
- Metanol p.a.;

### Procedimento:

1. Pesar o extracto lipídico resultante da extracção, para determinação da quantidade de diclorometano a adicionar de modo a que a quantidade de amostra nunca seja inferior a 30 mg nem superior a 100 mg.

Exemplo:

$$\begin{array}{r} 180 \text{ mg gordura total} \text{ -----} 2 \text{ mL diclorometano} \\ x \qquad \qquad \qquad \text{-----} 0,5 \text{ mL diclorometano} \end{array}$$

$$x = 45 \text{ mg gordura total}$$

2. Diluir o extracto de lípidos totais contido no erlenmeyer com diclorometano
3. Molhar (activar) a coluna Sep-Pack com **2 mL de diclorometano**.
4. Colocar na coluna os lípidos totais dissolvidos em diclorometano.
5. Desprezar o excesso.

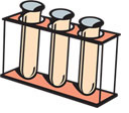
### **Separação dos Lípidos Neutros**

6. Eluir com **30 mL de diclorometano** (recolher gota-a-gota para um erlenmeyer). Proceder à evaporação do solvente no evaporador rotativo a 40°C.
7. Injectar ar na coluna para retirar o resto de diclorometano.

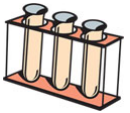
### **Separação dos Lípidos Polares**

8. Eluir (para um novo erlenmeyer) com **30 mL de metanol**. Proceder à evaporação do solvente no evaporador rotativo a 60°C.

## Método LML-M13.1



9. Lavar a coluna com **20 mL de metanol** e em seguida com **20 mL de diclorometano**. Fica pronta para o tratamento de nova amostra (cada coluna deve ser utilizada no máximo 2 vezes).
10. Após a evaporação dos solventes colocar os erlenmeyers no excicador sem tampa. Fazer vácuo durante cerca de 15 min. Deixar durante a noite.
11. Pesar os erlemneyers para a análise ponderal.
12. Dissolver o conteúdo de cada erlenmeyer em tolueno para a metilação (Transesterificação combinada) e transferir para tubos.



## Separação qualitativa de ácidos gordos por TLC

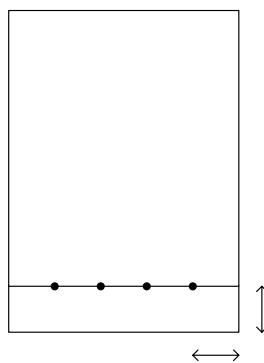
Método de cromatografia em camada fina (TLC) utilizando placas de alumínio revestidas com sílica para verificar a presença de ácidos gordos livres ou ésteres metílicos em amostras.

### Reagentes e soluções:

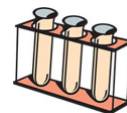
- Eluente: éter etílico:*n*-hexano (1:1, v/v);
- Solução 0,1% (p/v) de 2',7'-diclorofluoresceína em etanol;
- Placas de TLC – sílica em folha de alumínio (Merck - Ref. 1.05567.0001);

### Procedimento:

1. Colocar uma porção de eluente na câmara cromatográfica (até um volume de cerca de 1 cm do fundo).
2. Colocar papel de filtro dentro da câmara e deixar saturar (o tempo suficiente até o eluente atingir o topo do papel de filtro).
3. Cortar a placa cromatográfica, marcando primeiro com um lápis as dimensões pretendidas e posteriormente cortar com uma tesoura de mão.
4. Marcar uma linha a cerca de 1 cm da base da placa, e marcar os pontos de aplicação com intervalos de 1 cm cada.



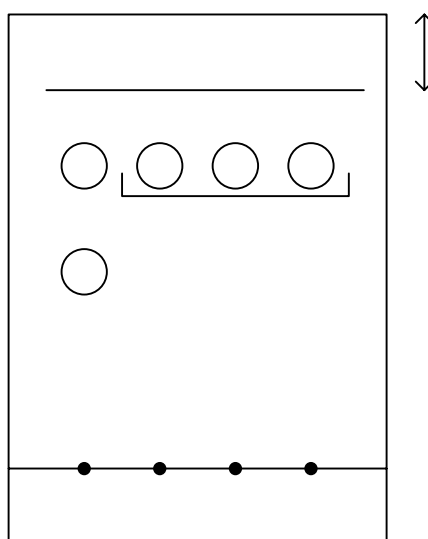
5. Aplicar no primeiro ponto um padrão de éster metílico de ácido gordo (FAME) e um padrão de ácido gordo livre (FA), para isso, colocar



várias gotas de cada solução com a ajuda de uma pipeta de Pasteur ou capilar.

2. Colocar nos restantes pontos de aplicação, cada uma das amostras a analisar.
3. Após a aplicação dos padrões e amostras, inserir a placa de TLC na câmara cromatográfica e deixar eluir até o solvente atingir cerca de 1 cm da extremidade da placa.
4. Retirar a placa da câmara cromatográfica e secar com ar frio do secador.
5. Pulverizar a placa com solução 2',7'-diclorofluoresceína em etanol (0,1%).
6. Secar novamente a placa com ar frio de secador.
7. Visualizar a placa com luz UV e assinalar as manchas com lápis.

Exemplo de placa de TLC:



## VII – Métodos de derivatização de ácidos gordos



Nº	Descrição
LML-M14.1	<a href="#">Metilação ácida</a>
LML-M15.1	<a href="#">Metilação básica</a>
LML-M16.1	<a href="#">Metilação combinada</a>
LML-M17.1	<a href="#">Esterificação em derivados DMOX (4,4-dimetiloxazolina)</a>



## Metilação ácida

(adaptado de W.W. Christie, 1994 in Gas Chromatography and Lipids – A practical guide)

Metilação ácida – esterifica ácidos gordos livres com excesso de metanol anidro na presença de um catalizador ácido e com aquecimento. Se houver água presente, a reação pode não ser completa.

### Reagentes e soluções:

- Padrão Interno C19:0 ácido (1 mg/mL em n-hexano);
- Ácido sulfúrico 1% em metanol;
- Solução aquosa de cloreto de sódio 5%;
- Solução aquosa de bicarbonato de potássio 2%;
- n-Hexano (p.a.) e n-hexano GC;

### Procedimento:

1. Adicionar à amostra (até 50 mg de lípidos) 1 mL de padrão interno C19:0 (1 mg/mL) e 2 mL de solução de ácido sulfúrico 1% em metanol.
2. Agitar em vortex (10 seg.) e levar o tubo a um banho de água a 50°C, durante 2 horas.
3. Adicionar 5 mL de solução aquosa de cloreto de sódio 5%.
4. Adicionar 5 mL de n-hexano, agitar em vortex (10 seg.) e retirar a fase orgânica, usando uma pipeta de pasteur, para um novo tubo.
5. Repetir o passo 4, colocando a fase orgânica no mesmo tubo do passo 4.
6. Lavar a fase orgânica com 4 mL de solução aquosa de bicarbonato de potássio 2%.
7. Adicionar cerca de 1g de sulfato de sódio anidro, agitar em vortex (10 seg.) e centrifugar (5 min.) a 2500 rpm.
8. Retirar o n-hexano para um novo tubo e evaporar em corrente de azoto a 37°C.
9. Adicionar 1,5 mL de n-hexano p/ GC e colocar num vial para levar ao cromatógrafo.



## Metilação básica

(adaptado de W.W. Christie, 1994 in Gas Chromatography and lipids- A practical guide)

### Notas:

- Todos os solventes devem conter cerca de **25 mg/L de BHT**.
- Deve-se ter cuidado para excluir totalmente a água do meio de reacção para prevenir a formação de ácidos gordos livres como resultado da hidrólise de lípidos, que não são metilados por este método.
- A reacção de metilação é muito rápida, os fosfolípidos e triglicéridos são esterificados rapidamente (1 hora).
- Para os ésteres de colesterol deve-se deixar a metilar de um dia para o outro.
- O tolueno que se utiliza é necessário para solubilizar os lípidos não polares (triglicéridos, ésteres de colesterol).

### Reagentes e soluções:

- Tolueno seco;
- Metóxido de sódio;
- Metanol anidro;
- Ácido acético glacial;
- n-Hexano;
- Água ultrapura;
- Sulfato de sódio anidro;
- Padrão interno, éster metílico C19:0 ou C21:0 (1 mg/mL)

### Procedimento:

1. Diluir a amostra (até 50 mg lípidos) em 1mL de tolueno (adicionado no final da extracção) e adicionar 1 mL de padrão interno (1 mg/mL).
2. Adicionar 2 mL de metóxido de sódio em metanol anidro 0,5 M e agitar em vortex (10 seg.)

## Método LML-M15.1



3. Manter a solução à temperatura ambiente (no escuro) durante 2 horas p/ fosfolípidos e triglicéridos de um dia para outro no caso de ésteres de colesterol.
4. Adicionar 0,1 mL de ácido acético glacial e 5 mL de água ultrapura.
5. Adicionar 5 mL de n-hexano, agitar em vortex (10 seg.) e centrifugar (5 min.) à velocidade de 2500 rpm.
6. Retirar a fase orgânica, usando uma pipeta de pasteur, para um novo tubo contendo cerca de 1 g de sulfato de sódio anidro.
7. Repetir o passo 5 e 6, colocando a fase orgânica no mesmo tubo.
8. Centrifugar durante 5 minutos para separar a fase de hexano do sulfato de sódio anidro.
9. Retirar a fase de hexano que contém os ésteres metílicos para um tubo e evaporar em corrente de azoto a 37°C.
10. Adicionar 1,5 mL de hexano p/ GC e colocar num vial para levar ao cromatógrafo.



## Metilação Combinada

(adaptado de Raes et al, 2001)

### Reagentes e soluções:

- Tolueno seco;
- Metóxido de sódio 0,5M (Solução 0,5 mol/L em metanol anidro);
- Solução de ácido clorídrico 37%:metanol (1:1, v/v);
- n-Hexano com adição de 25 mg/mL de BHT;
- n-Hexano para GC;
- Sulfato de sódio anidro;
- Água ultrapura;
- Padrão interno, éster metílico C19:0 (1 mg/mL em n-Hexano);

### Procedimento:

1. Diluir a amostra (até 50 mg lípidos) em 1 mL de tolueno (adicionado no final da extração).
2. Adicionar 1 mL de padrão interno (1 mg/mL) e 3 mL de solução metóxido de sódio em metanol anidro 0,5 M e levar ao vortex (10 seg.).
3. Colocar em banho de água a 50 °C, durante 30 minutos, e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
4. Adicionar 2 mL de HCl/metanol (1:1) e agitar em vortex (10 seg.).
5. Colocar novamente em banho de água a 50 °C, durante 10 minutos, e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
6. No final da reacção adicionar 2 mL de água ultrapura.
7. Adicionar 3 mL de n-Hexano, agitar em vortex (10 seg.) e centrifugar durante 5 minutos (2500 rpm).
8. Recolher o sobrenadante para um novo tubo que já contém 0,5 g de sulfato de sódio anidro.

## Método LML-M16.1



9. Repetir o passo de extracção, recolhendo o sobrenadante para o mesmo tubo do passo 8.
10. Agitar em vortex (10 seg.) e centrifugar durante 5 min. (2500 rpm) para separar a fase de hexano do sulfato de sódio anidro.
11. Retirar a fase de hexano que contém os ésteres metílicos para um novo tubo e evaporar em corrente de azoto a 37 °C.
12. Adicionar 1,5 mL de n-Hexano p/ GC e colocar num vial para levar ao cromatógrafo.



## **Esterificação em derivados DMOX (4,4-dimetiloxazolina)**

(adaptado de Luthria et al. Lipids, 1993; Dobson and Christie Trends in Analytical Chemistry, 1996)

Os derivados DMOX podem ser preparados a partir de ácidos gordos livres (AGL), de ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME), ou a partir do extracto lipídico.

### Reagentes e soluções:

- 2-amino-2-metil-1-propanol;
- Diclorometano;
- Água ultrapura;
- Sulfato de sódio anidro;

### Procedimento:

1. No caso de AGL: Colocar a amostra (mais de 2 mg) num vial de 20 mL e adicionar 500  $\mu$ L de 2-amino-2-metil-1-propanol.
2. Encapsular o vial, purgar com azoto e colocar num bloco de aquecimento a 180 °C, durante 2 horas.
3. No caso de FAME ou extracto lipídico: Colocar a amostra (até 500  $\mu$ g) num vial de 20 mL e adicionar 250  $\mu$ L de 2-amino-2-metil-1-propanol.
4. Encapsular o vial, purgar com azoto e colocar num bloco de aquecimento a 180 °C, durante 18 horas.
5. Retirar o vial do bloco de aquecimento e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
6. Dissolver a amostra com 3 mL de diclorometano e transferir para um tubo de ensaio.
7. Adicionar 1 mL de água ultrapura, para lavar o extracto orgânico, e retirar a fase aquosa superior.
8. Lavar novamente a fase orgânica com 1 mL de água ultrapura.

## Método LML-M17.1



9. Adicionar um pouco de sulfato de sódio anidro ao extracto orgânico para eliminar alguma água, agitar em vortex (10 seg.) e centrifugar durante 5 min. a 2500 rpm.
10. Remover a fase orgânica para um novo tubo e evaporar em corrente de azoto a 37°C.
11. Adicionar 1,5 mL de n-hexano para GC e colocar em vial para levar ao cromatógrafo.

## VIII – Procedimentos no Laboratório de Metabolismo Lípidico



---

Nº	Descrição
LML-P1.1	<a href="#">Procedimentos gerais</a>
LML-P2.1	<a href="#">Separação de solventes e resíduos</a>
LML-P3.1	<a href="#">Perigo dos produtos químicos</a>

---



## Procedimentos Gerais

### Regras de segurança no laboratório:

- Utilizar sempre bata e luvas;
- Trabalhar sempre que possível na “hotte”;
- Ler sempre com atenção os protocolos antes de iniciar o trabalho;
- Verificar bem o rótulo dos frascos. Verificar as indicações inscritas nos rótulos, em especial símbolos de risco (ver Procedimento LML-P3.1);

### Regras no Laboratório de Metabolismo Lipídico:

- Utilizar sempre o caderno de laboratório;
- Registrar os métodos utilizados, não esquecer de registrar o **código do método**, as tomas pesadas e alguma eventual alteração ao método;
- Preparar os reagentes e soluções, e efectuar a pesagem das amostras de véspera (sempre que possível);
- Separar sempre os solventes (clorados e não clorados nos respectivos contentores);
- Lavar o material no final do dia;
- Não esquecer de desligar tudo no final do dia (água, banhos, ultrasons, botija de gás);
- Identificar correctamente as amostras e colocar no frigorífico ou congelador;

### Lavagem de material:

- Passar o material por água quente com detergente (especial para lavagem de material de laboratório);
- Passar por água para retirar o detergente;
- Passar por água destilada;
- Passar por acetona, colocando a acetona no respectivo contentor;
- Colocar no cesto para escorrer;
- Colocar na estufa de material para secagem;



## Separação de solventes e resíduos

Separar sempre os solventes e resíduos de acordo com as recomendações seguintes:

### ✓ Solventes Orgânicos Clorados

(colocar no respectivo contentor)

- Diclorometano, Clorofórmio, Triclorometano
- Misturas de solventes orgânicos c/ algum dos anteriores

### ✓ Solventes Orgânicos não Clorados

(colocar no respectivo contentor)

- Hexano, Metanol, Etanol, Tolueno, Éter etílico, Etc...

### ✓ Soluções Aquosas

(diluir c/ bastante água e deitar no cano)

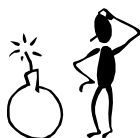
Soluções de:

- Carbonatos, Cloreto de sódio, Cloreto de pótassio, Etc...

### ✓ Ácidos e Bases

(dependendo da concentração diluir com bastante água)

- Ác. clorídrico, Ác. sulfúrico, Ác. acético, Hidróxido de sódio, Etc...



### **RESÍDUOS DE REAGENTES OU SOLVENTES PERIGOSOS**

Colocar num contentor à parte com a devida identificação

- Em caso de dúvida perguntar sempre a alguém responsável.



## Perigo dos Produtos Químicos

Verificar nos rótulos dos frascos a existência de símbolos de risco ou códigos de risco e segurança:

### 1. Símbolos de aviso



**E - Explosivo ou instável**

Evitar choques ou colisões. Movimentar com cuidado, com adequada protecção dos olhos, pele e vestuário. Manter afastado de chamas.



**Xn - Nocivo / Xi - Irritante**

Provoca danos na saúde, quer em contactos casuais quer em contactos prolongados. Não se deve permitir o contacto com pele ou roupa, ingerir ou inalar. Deve ser usada máscara protectora.



**F - Inflamável / F+ - Extremamente inflamável**

Substância que inflamam e ardem com facilidade. Deve ser mantida afastada de chamas, fontes de ignição ou de calor. Não ingerir.



**C - Corrosivo**

Pode causar danos irreversíveis nos tecidos vivos. Não permitir o contacto com pele ou roupa. Não ingerir ou inalar. Usar luvas durante o manuseamento.



**O - Oxidante ou comburente**

É uma substância que em contacto com uma fonte de ignição permite o início ou a intensificação de uma combustão. Manter afastado de chamas. Não ingerir.



**R - Radioactivo**

Emissão de radiações que em doses elevadas podem ser fatais.



**T - Tóxico / T+ - Muito tóxico**

pode causar danos variáveis, podendo provocar a morte. Não se deve permitir o contacto com a pele ou roupa. Não ingerir ou respirar os vapores. Usar luvas durante o manuseamento.



**N - Perigoso para o ambiente**

Substância que provoca danos no meio ambiente. Deve ser conveniente neutralizada ou tratada antes de libertada.



## **2. Códigos de Classificação Simples de Risco**

Indicam o risco associado à manipulação da substância. Cada código é composto pela letra **R**, seguido de um número.

Códigos	
R 1	Explosivo em estado seco
R 2	Risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição
R 3	Grande risco de explosão por choque, fricção, fogo ou outras fontes de ignição
R 4	Forma compostos metálicos explosivos muito sensíveis
R 5	Perigo de explosão em caso de aquecimento
R 6	Explosivo em contacto e sem contacto com o ar
R 7	Pode provocar incêndios
R 8	Perigo de incêndio em caso de contacto com materiais combustíveis
R 9	Perigo de explosão se misturado com materiais combustíveis
R 10	Inflamável
R 11	Facilmente inflamável
R 12	Extremamente inflamável
R 13	Gás liquefeito extremamente inflamável
R 14	Reage violentamente com água
R 15	Reage com água libertando gases extremamente inflamáveis
R 16	Explosivo se misturado com substâncias comburentes
R 17	Inflama-se espontaneamente em contacto com o ar
R 18	Pode formar misturas de ar-vapor explosiva/inflamáveis durante a utilização
R 19	Pode formar peróxidos explosivos
R 20	Nocivo por inalação
R 21	Nocivo em contacto com a pele
R 22	Nocivo por ingestão
R 23	Tóxico por inalação
R 24	Tóxico em contacto com a pele
R 25	Tóxico por ingestão
R 26	Muito tóxico por inalação
R 27	Muito tóxico em contacto com a pele
R 27a	Muito tóxico em contacto com os olhos
R 28	Muito tóxico por ingestão
R 29	Em contacto com a água liberta gases tóxicos
R 30	Pode inflamar-se facilmente durante o uso
R 31	Em contacto com ácidos liberta gases tóxicos
R 32	Em contacto com ácidos liberta gases muito tóxicos
R 33	Perigo de efeitos cumulativos
R 34	Provoca queimaduras
R 35	Provoca queimaduras graves
R 36	Irritante para os olhos
R 36a	Lacrimogéneo
R 37	Irritante para as vias respiratórias
R 38	Irritante para a pele
R 39	Perigo de efeitos irreversíveis muito graves
R 40	Possibilidade de efeitos irreversíveis
R 41	Risco de lesões oculares graves
R 42	Possibilidade de sensibilização por inalação



R 43	Possibilidade de sensibilização em contacto com a pele
R 44	Risco de explosão se aquecido em ambiente fechado
R 45	Pode causar cancro
R 46	Pode causar alterações genéticas hereditárias
R 47	Pode causar má formações congénitas
R 48	Risco de efeitos graves para a saúde em caso de exposição prolongada
R 49	Pode causar cancro por inalação
R 50	Muito tóxico para os organismos aquáticos
R 51	Tóxico para os organismos aquáticos
R 52	Nocivo para os organismos aquáticos
R 53	A longo prazo pode provocar efeitos negativos no ambiente aquático
R 54	Tóxico para a flora
R 55	Tóxico para a fauna
R 56	Tóxico para os organismos do solo
R 57	Tóxico para as abelhas
R 58	A longo prazo pode provocar efeitos negativos no meio ambiente
R 59	Perigoso para a camada de ozono
R 60	Pode comprometer a fertilidade
R 61	Risco durante a gravidez com efeitos adversos para a descendência
R 62	Possível risco de comprometer a fertilidade
R 63	Possíveis riscos, durante a gravidez, de efeitos indesejáveis na descendência
R 64	Pode causar danos nos bebés alimentados com o leite materno
R 65	Nocivo: pode causar danos nos pulmões se ingerido
R 66	Exposição continuada pode causar pele seca e gretada
R 67	Vapores podem causar sonolência e tonturas

### **3. Códigos de Classificação Simples de Segurança**

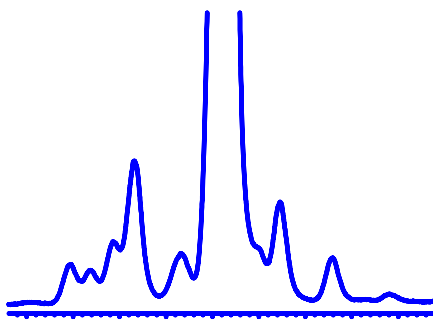
Indicam o que se deve realizar a fim de prevenir acidentes. Cada código é composto pela letra **S**, seguido de um número.

Códigos	
S 1	Conservar bem trancado
S 2	Manter fora do alcance das crianças
S 3	Conservar em lugar fresco
S 4	Manter longe de lugares habitados
S 5	Conservar em água
S 6	Conservar em .... (gás inerte a especificar pelo fabricante)
S 7	Manter o recipiente bem fechado
S 8	Manter o recipiente ao abrigo da humidade
S 9	Manter o recipiente num lugar bem ventilado
S 12	Não fechar o recipiente hermeticamente
S 13	Manter longe da comida, bebidas, incluindo os dos animais
S 14	Manter afastado de substâncias inflamáveis
S 15	Conservar longe do calor
S 16	Conservar longe de fontes de ignição -Não fumar
S 17	Manter longe de materiais combustíveis
S 18	Abrir manipular o recipiente com cautela



- S 20 Não comer nem beber durante a utilização
- S 21 Não fumar durante a utilização
- S 22 Não respirar o pó
- S 23 Não respirar o vapor/gás/fumo/aerossol
- S 24 Evitar o contacto com a pele
- S 25 Evitar o contacto com os olhos
- S 26 Em caso de contacto com os olhos lavar imediata abundantemente em água e chamar um médico
- S 27 Retirar imediatamente a roupa contaminada
- S 28 Em caso de contacto com a pele lavar imediata e abundantemente com água
- S 29 Não despejar os resíduos nos esgotos
- S 30 Nunca adicionar água ao produto
- S 33 Evitar a acumulação de cargas electrostáticas
- S 35 Eliminar os resíduos do produto e os seus recipientes com todas as precauções possíveis
- S 36 Usar vestuário de protecção adequado
- S 37 Usar luvas adequadas
- S 38 Em caso de ventilação insuficiente usar equipamento respiratório adequado
- S 39 Usar protecção adequada para os olhos/cara
- S 40 Para limpar os solos e os objectos contaminados com este produto utilizar (a especificar pelo fabricante)
- S 41 Em caso de incêndio e/ou explosão não respirar os fumos
- S 42 Durante as fumigações/pulverizações, usar equipamento respiratório adequado
- S 43 Em caso de incêndio usar ... (meios de extinção a especificar pelo fabricante. Se a água aumentar os riscos acrescentar "Não utilizar água")
- S 45 Em caso de acidente ou indisposição consultar imediatamente um médico (se possível mostrar-lhe o rótulo do produto)
- S 46 Em caso de ingestão consultar imediatamente um médico e mostrar o rótulo ou a embalagem
- S 47 Conservar a uma temperatura inferior a ...°C (a especificar pelo fabricante)
- S 48 Conservar húmido com ... (meio apropriado a especificar pelo fabricante)
- S 49 Conservar unicamente no recipiente de origem
- S 50 Não misturar com ... (a especificar pelo fabricante)
- S 51 Usar unicamente em locais bem ventilados
- S 52 Não usar sobre grandes superfícies em lugares habitados
- S 53 Evitar a exposição - obter instruções especiais antes de usar
- S 54 Obter autorização das autoridades de controlo de contaminação antes de despejar nas estações de tratamento de águas residuais
- S 55 Utilizar as melhores técnicas de tratamento antes de despejar na rede de esgotos ou no meio aquático
- S 56 Não despejar na rede de esgotos nem no meio aquático. Utilizar para o efeito um local apropriado para o tratamento dos resíduos
- S 57 Utilizar um contentor adequado para evitar a contaminação do meio ambiente
- S 58 Elimina-se como resíduo perigoso
- S 59 Informar-se junto do fabricante de como reciclar e recuperar o produto
- S 60 Elimina-se o produto e o recipiente como resíduos perigosos
- S 61 Evitar a sua libertação para o meio ambiente. Ter em atenção as instruções específicas das fichas de dados de Segurança
- S 62 Em caso de ingestão não provocar o vómito: consultar imediatamente um médico e mostrar o rótulo ou a embalagem

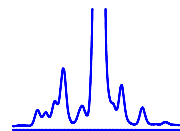
## IX – Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa



---

Nº	Descrição
LML-C1.1	<a href="#">Equipamentos Cromatográficos</a>
LML-C2.1	<a href="#">Colunas Cromatográficas</a>

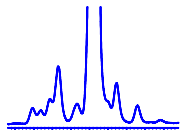
---



## Equipamentos Cromatográficos

### Cromatógrafos em utilização no Laboratório de Metabolismo Lipídico:

- **HP 5890 Hewlett Packard**  
(Agilent Techn. Inc., Palo Alto, CA)
  
- **HP 6890 Hewlett Packard (Instrumento #1)**  
(Agilent Techn. Inc., Palo Alto, CA)
  
- **HP 6890 Hewlett Packard (Instrumento #2)**  
(Agilent Techn. Inc., Palo Alto, CA)
  
- **Varian CP-3800**  
(Varian Analytical Instr., Walnut Creek, CA, USA)
  
- **Varian Saturn 2000**  
(Varian Analytical Instr., Walnut Creek, CA, USA)



## Colunas cromatográficas

### Colunas Cromatográficas em utilização no Laboratório de Metabolismo Lipídico:

➤ **CP-Sil 88**

(Chrompack CP7489, Varian Inc., Walnut Creek, CA)

- Comprimento: 100 m
- Diâmetro interno: 0,25 mm
- Espessura da fase estacionária: 0,20  $\mu\text{m}$

➤ **OmegaWax 250**

(Supelco, Bellefont, CA, USA)

- Comprimento: 30 m
- Diâmetro interno: 0,25 mm
- Espessura da fase estacionária: 0,25  $\mu\text{m}$

➤ **BPX-70**

(SGE Chromatography Supplies, Austin, TX)

- Comprimento: 60 m
- Diâmetro interno: 0,25 mm
- Espessura da fase estacionária: 0,25  $\mu\text{m}$

➤ **CP-Sil 8 MS**

(Chrompack CP7489, Varian Inc., Walnut Creek, CA)

- Comprimento: 30 m
- Diâmetro interno: 0,25 mm
- Espessura da fase estacionária: 0,25  $\mu\text{m}$

➤ **Coluna semicapilar MN 116**

(Permapond-FFAP, Macherey-Nagel)

- Comprimento: 50 m
- Diâmetro interno: 0,25 mm
- Espessura da fase estacionária: 0,25  $\mu\text{m}$