

INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE ACLIMAÇÃO SOBRE A COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS TOTAIS DO SIRI AZUL, *CALLINECTES SAPIDUS* RATHBUM 1896 (SIRI)

JOÃO EDMUNDO LUNETTA

Departamento de Fisiologia Geral do Instituto de Biociências e Instituto de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo — Belle W. Baruch Coastal Research Institute, Universidade da Carolina do Sul, Estados Unidos da América do Norte.

1. INTRODUÇÃO	101
2. MATERIAL E MÉTODOS	107
a — Extração dos lipídeos totais	108
b — Saponificação dos lipídeos	109
c — Liberação dos ácidos graxos livres	110
d — Metilação dos ácidos graxos livres	110
e — Cromatografia gás-líquida dos ésteres metílicos dos ácidos graxos	112
3. RESULTADOS	121
4. DISCUSSÃO	129
5. CONCLUSÕES	133
6. BIBLIOGRAFIA	133

RESUMO — Estudou-se a influência da temperatura de aclimação sobre a composição dos ácidos graxos extraídos de três tecidos do siri azul, *Callinectes sapidus*, empregando-se as modernas técnicas da cromatografia em fase gasosa. Compararam-se os resultados obtidos em animais aclimados a 10°C e a 25°C, com aqueles de animais não aclimados, capturados na época em que a temperatura da água do mar era de 9°C. A relação $C_{16}/C_{16:1}$ é praticamente igual a 2 nos animais aclimados a 10°C, e nos da população natural, enquanto que esta relação é bem superior nos animais aclimados a 25°C. Há uma tendência para um aumento da percentagem de ácidos

graxos poli-insaturados quando ocorre abaixamento da temperatura de aclimação. Essa tendência se manifesta principalmente em relação ao ácido docosapentaenóico ($C_{22:5}$).

INFLUENCE OF THE ACCLIMATION TEMPERATURE ON THE COMPOSITION OF TOTAL FATTY ACIDS OF THE BLUE CRAB, *CALLINECTES SAPIDUS*

ABSTRACT — the author studied the influence of the acclimation temperature upon the composition of fatty acids in three different tissues of blue crab, *Callinectes sapidus*, using modern techniques of gas liquid chromatography. A comparison of the results from acclimated animals to 10°C and 25°C has been done with others animals without any previous acclimation, captured only when the sea water temperature was 9°C. The rate $C_{16}/C_{16:1}$ is practically equal to 2 in those animals acclimated to 10°C and the natural population, meanwhile the same relationship is very high in those animals acclimated to 25°C. There are a tendency for the increasing in the percentage of unsaturated fatty acids when there is a decreasing acclimation temperature. The tendency is due meanly to relation to the fatty acid docosapentaenoic ($C_{22:5}$).

CONCLUSIONS:

1. In the animals acclimated at 10°C and in those from natural population (without acclimation) the percentage of stearic acid (C_{18}) is practically half to that found in animals acclimated at 25°C.
2. The percentage of docosapentaenoic acid ($C_{22:5}$) in animals acclimated at 10°C is practically double to that found in animals acclimated at 25°C.
3. Decreasing of acclimation temperature leads to an increase of the quantity of palmitoleic acid ($C_{16:1}$).
4. In acclimation temperature at 10°C, there is an outstanding decrease of linoleic acid's ($C_{18:2}$) percentage.
5. The percentage of unsaturated fatty acids is larger in animals acclimated at 10°C and in those natural population (without acclimation) than in those submitted at 25°C.

6. The alterations in the unsaturated fatty acid's percentage, due from the reduction of the temperature, have an adaptive character.

- 1.

INTRODUÇÃO

A temperatura exerce, em todos os níveis de organização biológica, uma influência importante, tanto ao nível celular e enzimático, como ao nível de cada organismo, cada população ou comunidade. Embora a temperatura experimental possa ser facilmente medida e controlada, dada a extrema variabilidade do material biológico, os dados obtidos experimentalmente, que tentam relacionar o efeito da temperatura sobre os organismos, são, em geral, de difícil interpretação. Como acontece com outros fatores ecológicos, a temperatura nunca age isolada e independentemente, mas interage com outros parâmetros dos sistemas físico-biológicos.

Sabe-se de longa data, que o grau de saturação dos lipídeos de animais ou vegetais é estreitamente associado à temperatura na qual esses lipídeos são formados (BELEHRADEK, 1931) e que o ponto de fusão dos lipídeos depende do grau de saturação dos ácidos graxos que entram na sua constituição.

Os ácidos graxos de longas cadeias constituem uma boa parte das misturas lipídicas. Os ácidos graxos ocorrem principalmente na forma esterificada, como componentes dos triglicerídeos, esteróides e fosfolipídeos. Ácidos graxos livres são os menores componentes dos lipídeos dos tecidos, dos fluidos do corpo de vertebrados, embora eles tenham uma importante função na mobilização e transporte das gorduras de reserva (FREDRICKSON e GORDON, 1958). A bioquímica dos ácidos graxos é muito complexa devido ao fato de se analisarem misturas de ácidos graxos saturados, mono-insaturados e poli-insaturados, hidróxi-ácidos e ácidos graxos de cadeias de diferentes comprimentos e ainda de cadeias ramificadas.

SHORLAND (1962) fez uma revisão da distribuição dos ácidos graxos em microorganismos, criptógamas, fanerógamas e metazoários. Verificou que a distribuição dos ácidos graxos das gorduras

das sementes de plantas fanerógamas tem grande importância e correlação taxonômica. A composição das misturas de ácidos graxos dos animais é grandemente afetada pela dieta, particularmente no que se refere aos poli-insaturados. Não obstante, SHORLAND (1.c.) indica que uma grande diferença pode ser estabelecida entre os ácidos graxos dos animais de "habitats" aquáticos, tanto de água doce como marinho e animais terrestres. As misturas de ácidos graxos dos animais do segundo grupo podem ser diferenciadas daqueles do primeiro grupo, pelo baixo conteúdo de ácidos saturados e alto teor de insaturados, particularmente os ácidos graxos poli-insaturados com 20 e 22 carbonos (C_{20} e C_{22}).

O advento da cromatografia em fase gasosa e o interesse na bioquímica dos ácidos graxos poli-insaturados mudaram muito o aspecto do que se conhecia das gorduras.

Em alguns casos, a temperatura parece condicionar a ocorrência de certos tipos preferenciais de ácidos graxos.

FARKAS e HERODEK (1964) verificaram que a proporção de ácidos graxos poli-insaturados com 20 e 22 carbonos, em crustáceos plantônicos, aumenta com o decréscimo da temperatura.

A análise dos ácidos graxos, realizada por LEWIS (1962) em moluscos e crustáceos das regiões ártica e temperada, mostrou uma completa ausência do ácido esteárico e uma redução do ácido palmítico e um considerável incremento do ácido palmitoléico nos exemplares árticos.

Os estudos de LEWIS são incompletos no sentido de não incluírem dados relativos aos ácidos graxos com 20 e 22 carbonos em suas cadeias (RODEGKER e NEVENZEL, 1964).

Os ácidos graxos de cérebro do peixinho dourado, *Carassius auratus*, aclimado a diversas temperaturas, foram analisados por JOHNSTON e ROOTS (1964). Estes autores notaram uma tendência geral na ocorrência de maior insaturação dos ácidos graxos, com o declínio da temperatura. Especificamente, o nível de ácido esteárico decresceu, enquanto que os níveis de araquidônico e de um ácido poli-insaturado de 22 carbonos aumentaram.

Ainda no referido peixinho, ROOTS (1968) assinalou que, nos animais aclimados ao frio, ocorria maior insaturação nos ácidos

graxos associados aos fosfolipídeos, fosfatidil-colina e fosfatidil-etanolamina.

Análises comparativas, realizadas por MORRIS e SCHNEIDER (1969) sobre a composição dos ácidos graxos do cérebro de peixes *Trematomus bernachii* da região antártica e de *Leptocottus armatus* e *Carassius auratus* da região temperada, demonstraram que 6,5% dos ácidos graxos do peixe *Trematomus* consiste de um ácido poli — insaturado com 24 carbonos.

A dieta dos animais pode afetar diretamente os tipos de ácidos graxos encontrados nos diversos organismos (LOVERN, 1964).

O plancton marinho, uma das maiores fontes de alimento para os peixes, tem atraído recentemente a atenção dos cientistas, a fim de verificar a relação entre os tipos de ácidos graxos ingeridos e os encontrados nos diversos órgãos dos animais que se utilizam dessa fonte de alimentos. Assim, LOVERN (1935), como trabalho inicial, determinou os tipos de ácidos graxos encontrados em crustáceos planc-tônicos marinhos e de água doce, verificando que, nos primeiros, há uma predominância de ácidos graxos com 20 e 22 carbonos na cadeia, enquanto que, nos segundos, há maior quantidade de ácidos graxos com 16 e 18 carbonos. Nesse mesmo trabalho, LOVERN (1. c.) estabeleceu uma relação entre o tipo de ácidos graxos dos peixes marinhos e de água doce, assinalando um paralelismo nos tipos de ácidos graxos com o plancton de cada um desses “habitats” e sugere que as diferenças nos tipos de ácidos graxos dos peixes de ambos os “habitats” têm origem na dieta.

O mesmo autor (1938), estudando os fatores que influenciam a composição das gorduras de reserva na enguia, *Anguilla vulgaris*, notou que, alimentando-as com mexilhões, não havia uma radical modificação na composição dos ácidos graxos da enguia, que se tornavam semelhantes aos ácidos graxos dos moluscos que serviam de alimento no experimento. As enguias, submetidas a uma dieta baixa em gorduras, mostravam um decréscimo na quantidade de ácidos graxos e com a introdução de pedaços de carne de arenque no alimento, agora então, havia uma apreciável modificação da composição dos ácidos graxos, que se tornavam semelhantes àqueles do arenque. Conclui o autor em apreço que, para ocorrer uma mudança radical na composição dos ácidos graxos de um animal, quando estes diferem

profundamente das gorduras ingeridas, esse alimento deve ser fornecido acima de certo nível, antes de que alguma modificação possa se manifestar.

KELLY *et al.* (1959), trabalhando com camarões *Penius* sp., com siris *Callinectes sapidus* e várias espécies de algas, verificaram que os crustáceos alimentados com dietas pobres em gorduras perdem muito dos seus ácidos graxos poli-insaturados e recuperam os mesmos pela ingestão de alimentos que contenham esses ácidos. Os camarões parecem sintetizar maiores quantidades de ácidos graxos insaturados, a partir do óleo da semente de algodão, do que qualquer animal aquático. Esses autores registraram também que o fitoplâncton produz grandes quantidades de ácidos graxos poli-insaturados.

O cultivo em aquário da Cladóceras e Copépodes, alimentados com a alga verde unicelular, *Scenedesmus obtusiusculus* e subsequente análise dos ácidos graxos, por FARKAS e HERODEK (1964), mostrou que a gordura dos cladóceros permanece semelhante à do seu alimento enquanto que, nos copépodes, o grupo do ácido C_{20} - C_{22} aparecia sempre como maior componente. Os autores concluem ser plausível admitir que estes últimos animais obtêm estes ácidos por alongamento da cadeia dos ácidos linoleico e linolênico.

A análise dos lipídeos da estrela do mar (*Pisaster ochraseus*) e de dois organismos conhecidos por servirem de alimento para esse animal, o mexilhão (*Mytilus californianus*) e a craca (*Mitela polymerus*) realizada por RODEGKER e NEVENZEL (1964, 1.c.), revelou que a composição dos ácidos graxos do mexilhão e da craca são muito semelhantes, diferindo da estrela do mar principalmente pela baixa percentagem de ácido eicosaenóico ($C_{20:1}$).

No peixe eurialino, *Mugil cephalus*, KELLY *et al.* (1958) verificaram que o nível de ácidos graxos poli-insaturados, numa dieta isenta de gorduras, decresce consideravelmente e que a natureza das gorduras dos animais estudados é acentuadamente influenciada pela dieta. Estes animais podem, aparentemente, converter ácidos diênóicos da semente de algodão em pequenas quantidades de ácidos tetra, penta e hexaenóico.

Uma análise dos lipídeos, dos eritrócitos e dos mitocôndrias do fígado de ratos, feita por WITTING *et al.*, (1961), mostrou que os

lipídeos foram profunda e drasticamente alterados quando variava a composição dos ácidos graxos na dieta desses animais.

WALKER e KUMMEROW (1964), trabalhando com ratos, verificaram que a composição química dos eritrócitos desses animais, submetidos a quatro tipos de dietas, variava principalmente no que se refere aos ácidos oleico, linoleico, eicosatrienóico e eicosatetraenóico. A quantidade de ácido oleico decrescia quando a de linoleico aumentava na dieta. Esses animais, ingerindo óleo de coco altamente saturado, exibiam um considerável aumento do ácido eicosatrienóico ($C_{20:3}$).

Pressão e profundidade parecem exercer um efeito sobre a composição lipídica dos animais.

Neste particular, os trabalhos de LEWIS (1962-1967) mostraram que, em maiores profundidades, os animais possuem maior quantidade dos ácidos C_{18} e $C_{18:1}$, respectivamente, esteárico e oleico.

Em muitos animais pode-se acompanhar uma *variação estacional*, tanto quantitativa como qualitativa dos lipídeos.

HERODEK e FARKAS (1959) verificaram que a composição química do crustáceo *Astacus leptodactylus*, no que se refere aos ácidos graxos, exhibe um ciclo anual característico, que consiste no desaparecimento dos ácidos poliênicos na primavera e acúmulo durante o outono.

FARKAS e HERODEK (1961) assinalam que, em crustáceos de água doce, essas variações estacionais estão associadas com maior acúmulo de ácidos graxos de cadeia C_{20} e C_{22} , durante o outono.

Em crustáceos marinhos da região antártica, LITTLEPAGE (1964) mostrou uma enorme variação na quantidade de lipídeos armazenados durante o ano, porém não faz considerações a respeito dos ácidos graxos que entram na composição dos mesmos.

Hibernação, fenômeno ligado à mudança de temperatura no meio ambiente, conduz, segundo ZAR (1968), a uma variação da composição lipídica no bezouro *Coleomegilla maculata*, principalmente no que se refere a um incremento do ácido araquidônico ($C_{20:4}$), que flutua de um valor mínimo no outono a um valor máximo em janeiro e fevereiro, decaindo novamente no início da primavera, no hemisfério norte.

A ação de parasitas sobre determinados tecidos promove uma alteração na composição química dos ácidos graxos de certos animais. LUNETTA e VERNBERG (1971) verificaram, no molusco *Nassarius obsoleta*, que diferentes parasitas afetam diferencialmente a composição química dos ácidos graxos, sendo isto, presumivelmente devido às demandas metabólicas de cada espécie de parasitas.

Certas pesquisas evidenciam que a idade do animal pode ser um fator de variação na composição dos ácidos graxos.

NELSON *et al.* (1967) verificaram que mudanças nas concentrações de ácidos palmítico e oleico na barata *Periplaneta americana* estão inversamente relacionadas com a idade.

Finalmente, BAZAN *et al.* (1970) demonstraram que no cérebro de ratos, após choques eletroconvulsivos, havia um aumento de cerca de 175% dos ácidos graxos livres, 30 segundos após a aplicação do choque.

Com a notável exceção dos insetos, o metabolismo dos ácidos graxos dos invertebrados tem sido pouco estudado.

Demonstração direta da síntese de ácidos graxos em invertebrados, além de insetos, inclui o trabalho de MOHRI (1964), que estudou a incorporação de substâncias marcadas, nas diversas frações lipídicas nos embriões de ouriço do mar; VONK *et al.* (1950), que estudaram em *Helix pomatia* a incorporação da D₂O nos ácidos graxos; ZANDEE (1962), que verificou baixa taxa de incorporação do acetato marcado com ¹⁴C nos ácidos graxos insaturados em relação aos saturados em *Astacus* e WOOTON e WRIGHT (1962), que assinalaram incorporação "in vivo" de mevalonato nos ácidos graxos de *Nereis* e *Arenicola*.

Pela breve exposição bibliográfica, nota-se que muitos são os fatores que têm a capacidade de induzir modificações bioquímicas no que se refere aos ácidos graxos e gorduras em geral, os quais podem ser assim resumidos: temperatura, dieta, pressão e profundidade, variação estacional, hibernação, parasitismo, idade, excitação e estado nutritivo.

Depreende-se, ainda, da grande literatura existente, que face ao grande valor comercial, a maior parte das pesquisas referentes aos ácidos graxos e lipídeos foi efetuada em peixes.

Nos demais poiquilotérmicos, há uma tentativa de se correlacionar os lipídeos e ácidos graxos de filós diversos, sem levar em conta as variações individuais próprias de cada espécie.

Relativamente aos crustáceos, decópodes em particular, são raros os trabalhos que procuram elucidar a influência da temperatura na bioquímica dos lipídeos e ácidos graxos em particular.

No presente trabalho, procurou-se verificar a ação da temperatura em animais aclimados a 10°C e a 25°C, sobre os ácidos graxos, tanto qualitativa como quantitativamente, comparando-se os resultados obtidos com animais coletados na natureza, não aclimados, quando a temperatura da água do mar era de 9°C.

Esta pesquisa foi realizada com os recursos das modernas técnicas de cromatografia em fase gasosa, que superam em muito as antigas verificações da insaturação dos ácidos graxos pelo índice do iodo, pois, além de permitir conhecer o grau de insaturação, pode-se, por esta técnica, determinar o número de carbonos da cadeia de cada ácido graxo.

Um estudo desta natureza tende a conduzir, sem dúvida, ao campo da bioquímica ecológica.

Além disso, decorre, em conseqüência da presente pesquisa, um aspecto prático bastante importante. Sabe-se que a causa principal da deteriorização das gorduras é a oxidação das mesmas pelo oxigênio atmosférico, processo este conhecido como rancificação, que altera profundamente o sabor das gorduras. A susceptibilidade à oxidação depende em grande parte do grau de insaturação dos lipídeos.

No caso dos peixes, as gorduras são notáveis pelo alto conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados e, portanto, particularmente sujeitos à deteriorização oxidativa (BANNATYNE e THOMAS, 1969).

Sendo o siri azul, animal comestível, de interesse comercial, um conhecimento da natureza e constituição dos seus ácidos graxos é essencial a fim de se evitar as reações oxidativas durante a industrialização e estocagem dos mesmos.

2. MATERIAL E MÉTODOS:

Na realização do presente estudo utilizaram-se o músculo, glândula do intestino médio e brânquias do siri azul, *Callinectes sapidus*.

Os animais experimentais foram coletados em Beaufort, Carolina do Norte, Estados Unidos. Este crustáceo, de grande importância econômica nos Estados Unidos da América do Norte, vive numa variedade de fundos, em estuários e águas oceânicas não profundas, ocorrendo desde a Nova Escócia até o Uruguai (WILLIAMS, 1965).

O passo inicial na execução desta pesquisa consistiu na aclimação do siri azul. Após a coleta, cada animal era colocado em uma caixa plástica com água do mar a 30‰, convenientemente arejada, e separados em dois lotes, mantidos em câmaras de aclimação a 10°C e a 25°C, durante três semanas, no mínimo. Eram alimentados com pedaços de fígado (O'CONNOR *et al.*, 1969) duas vezes por semana e submetidos a um fotoperíodo de 12 horas. A fim de uniformizar as condições experimentais, somente animais machos, na fase de intermuda, foram utilizados, pois é sabido (DAMBOVICEANU, 1932, O'CONNOR *et al.*, 1968) que durante a muda e nas fases finais da pré-muda há um decréscimo de certos constituintes bioquímicos da glândula do intestino médio e do líquido do meio interior.

Além dos animais aclimados a 10°C e a 25°C, foram utilizados, também, animais recém coletados na natureza, portanto não aclimados. A captura desses animais processou-se nos meses de inverno, quando a temperatura média da água do mar era de 9°C.

As seguintes etapas foram executadas para obtenção dos ácidos graxos:

- a. extração dos lipídeos totais;
- b. saponificação dos lipídeos e liberação dos ácidos graxos livres;
- c. liberação dos ácidos graxos livres;
- d. metilação dos ácidos graxos livres;
- e. análise qualitativa e quantitativa dos ésteres-metílicos dos ácidos graxos livres pela cromatografia em fase gasosa.

a. EXTRAÇÃO DOS LIPÍDEOS TOTAIS

Os lipídeos totais dos homogeneizados de músculo, glândula do intestino médio e brânquias, foram extraídos seguindo a técnica mais empregada atualmente, ou seja, o método de FOLCH *et al.*, (1957), utilizando clorofórmio metanol (2:1, V/V) com um volume de 20 vezes o peso de cada tecido. Acrescentado o clorofórmio-metanol, os tecidos eram novamente homogeneizados. A extração dos lipídeos processou-se durante duas horas.

FOLCH *et al.* (1.c.) expressam a necessidade de remover contaminantes não lipídicos dos extratos preparados, como descritos acima. A técnica de FOLCH *et al.* prescreve uma seqüência de lavagens, as quais, segundo os autores, removem efetivamente os contaminantes não lipídicos, liberando um extrato lipídico puro.

b. SAPONIFICAÇÃO DOS LIPÍDEOS

A fim de analisar os ácidos graxos totais, os lipídeos obtidos durante a extração, deverão ser saponificados. O extrato é tratado com uma base. Este procedimento hidrolisa os ácidos graxos dos ésteres do colesterol, dos lipídeos neutros e fosfolipídeos, convertendo-os em sabões solúveis na água.

A saponificação foi procedida da seguinte forma: o extrato clorofórmio-metanol contendo os lipídeos foi evaporado sob pressão, em um balão de 250 ml. A hidrólise dos lipídeos realizou-se acrescentando-se ao resíduo 50 ml de etanol-éter-etílico (3:1v:v), mais 0,5 ml de KOH, 10N, durante 3 horas (JAMES, 1963).

Alguns lipídeos são resistentes à hidrólise, assim, uma alíquota foi hidrolisada durante 18 horas, comparando-se o resultado nos dois intervalos de tempo. Um período de 3 horas, a frio, mostrou-se satisfatório na saponificação dos lipídeos.

Terminado o período de hidrólise, a mistura etanol-éter-etílico foi removida a vácuo num evaporador rotatório, adicionando-se em seguida, água bi-destilada a fim de obter uma solução clara. A seguir, 75 ml de éter de petróleo (p.e. 30-60°C) foram acrescentados, deixando-se o mesmo permanecer durante 24 horas. Duas fases separaram-se: a superior consistindo de éter de petróleo com o colesterol e a fase inferior consistindo de água e resíduos de álcool com os sais de potássio dos ácidos graxos. A fase superior, foi sifonada e despezada.

Um meio conveniente de se proceder à sifonagem do éter de petróleo foi usar um tubo de vidro em U, um ramo do qual era colocado no balão e o outro ramo passando através do orifício de uma rolha de borracha que fechava um funil separador. Um outro tubo de vidro em L era colocado em outro orifício da rolha do funil separador e através deste fazia-se o vácuo. Desta forma, a fase superior (éter

de petróleo) era facilmente separada da fase aquosa. Repetiu-se 4 vezes este processo.

c. LIBERAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

Os ácidos graxos foram então liberados pela adição de 10 ml de HCl 1,5 N à fase aquosa remanescente no balão. 75 ml de éter de petróleo (p. e. 30-60°C) foram adicionados e o frasco agitado durante 10 minutos. Deixou-se esta mistura repousar durante 24 horas, numa atmosfera de N₂. Decorrido esse período, a fase superior constituída pelo éter de petróleo, contendo os ácidos graxos livres, foi transferida para um funil separador de 250 ml, usando-se a mesma técnica do vácuo descrita no parágrafo anterior. A fase aquosa remanescente no balão foi lavada 3 vezes com éter de petróleo, o qual era posteriormente sifonado para o mesmo funil separador. A fim de se removerem traços de HCl, o éter de petróleo foi lavado duas vezes com 5 ml de água bi-destillada. Após a separação das duas fases, a inferior aquosa foi desprezada e o éter de petróleo seco em sulfato de sódio anidro (JAMES, 1.c.). O éter de petróleo remanescente no funil separador foi em seguida transferido para tubos de vidro com rolha de Teflon e evaporado empregando-se um fluxo de N₂.

d. METILAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

A separação de compostos pela cromatografia em fase gasosa requer compostos que sejam voláteis nas temperaturas na qual estes aparelhos operam. Uma boa técnica de diminuir o ponto de ebulição dos ácidos graxos é transformá-los nos seus correspondentes ésteres-metílicos, pela adição de um radical metílico aos ácidos graxos. Desta forma, quando é necessário proceder-se a uma análise do composto variando de C₁₀ a C₂₄ numa mesma amostra, os ésteres metílicos deste composto são empregados. Qualquer método na preparação dos ésteres-metílicos dos ácidos graxos (a. g.), para analisá-los através da cromatografia de fase gasosa, deve ser simples, rápido, quantitativo e não dar origem a mudanças estruturais destes compostos ou reações colaterais. Muitas técnicas foram recomendadas na metilação dos a. g. e uma, mais particularmente, é o emprêgo do tri-fluoreto de boro como catalisador na esterificação dos ácidos graxos.

Tri-fluoreto de boro metanol foi então acrescentado ao tubo contendo os ácidos graxos, sendo esta operação realizada sob uma atmosfera de N_2 , na proporção de 1 ml do reagente para cada 4-16 mg de lipídeos (MORRINSON e SMITH, 1964).

Os tubos foram fechados e conduzidos para um banho-maria durante dois minutos. Este tempo foi previamente testado tendo-se achado que o mesmo era suficiente para a metilação dos a. g.

A mistura foi então transferida para um funil separador, com 30 ml de éter de petróleo (p. e. 30-60°), com mais 20 ml de água bi-distilada e agitada vigorosamente. Deixou-se a mesma repousar durante 24 horas em atmosfera de N_2 .

A fase inferior aquosa foi desprezada. O éter de petróleo, fase superior, foi então filtrado através de um papel de filtro, previamente desengordurado, para a eliminação de pequenas gotículas de água. O funil separador e papel de filtro foram lavados 3 vezes com éter de petróleo. O filtrado foi recolhido num balão de fundo redondo e o éter de petróleo evaporado sob pressão num evaporador rotatório.

Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram então dissolvidos com 2 ml de hexano, redestilado, que é um bom solvente para este tipo de composto (HORNING *et al.*, 1964). O hexano empregado foi previamente analisado pela cromatografia em fase gasosa, para verificar o seu grau de pureza. Nenhum extra-pico surgiu de sua análise.

Desta forma, os ésteres metílicos dos ácidos graxos estavam prontos para a análise cromatográfica em fase gasosa.

A composição de uma mistura de ácidos graxos pode mudar enormemente como consequência das manipulações experimentais (HORNING *et al.*, 1. c.). Desta forma, para testar a eficácia do método empregado na obtenção dos ésteres metílicos dos ácidos graxos, compostos de referência, ou seja, ácidos graxos de cadeia variando de C_8 a C_{22} foram metilados e analisados pela CGL, sendo os resultados completamente satisfatórios.

Sabe-se pelos trabalhos de FULK e SHORB (1970), que a metilação dos ácidos graxos pelo tri-fluoreto de boro metanol pode conduzir à formação de artefatos provenientes do ácido oléico principalmente, evidenciados na análise por cromatografia em fase gasosa.

Estes artefatos estão relacionados principalmente com o tempo de estocagem do tri-fluoreto de boro. A fim de se ter certeza de que

tais artefatos não estavam sendo produzidos durante a metilação, ácido oléico puro, para análise cromatográfica em fase gasosa, adquirido do Applied Science Laboratories, Inc., foi tratado pelo mesmo procedimento, como os ácidos graxos extraídos dos tecidos dos animais. Nenhum extra-pico foi observado, após a análise do mesmo pela cromatografia em fase gasosa.

e. CROMATOGRAFIA GÁS-LÍQUIDA DOS ÉSTERES METÍLICOS DOS ÁCIDOS GRAXOS

A base para uma separação cromatográfica a gás é a distribuição de uma amostra entre duas fases. Uma destas fases é a fase estacionária líquida, adsorvida em forma de uma capa quase imperceptível sobre um sólido inerte com uma superfície de grande área; a outra fase é um gás que passa através da fase estacionária. A cromatografia a gás é uma técnica utilizada para separar substâncias voláteis por meio de uma corrente de gás sobre uma fase estacionária. Se esta fase estacionária é um sólido, fala-se de cromatografia gás-sólido. Esta técnica depende das propriedades de adsorção do conteúdo da coluna para separar amostras, em especial gases. No caso da fase estacionária ser um líquido, fala-se em cromatografia gás-líquido (CGL). A ampla variedade de fases líquidas com temperaturas usáveis até 400°C fazem da CGL a forma mais versátil e seletiva da cromatografia a gás.

Na CGL os componentes que deverão ser separados são levados da coluna por um gás inerte (gás portador). Os constituintes da amostra repartem-se entre o gás-portador e o solvente não volátil (fase estacionária), adsorvido em um sólido inerte de tamanho controlado (suporte). O solvente seletivamente retarda os componentes da amostra de acordo com o seu coeficiente de distribuição até que estes formem bandas separadas no gás portador. Estas bandas componentes deixam a coluna na corrente de gás e são registradas como uma função do tempo pelo detetor. As vantagens desta técnica de eluição são: a coluna se regenera continuamente pela ação do gás inerte; geralmente os componentes da amostra separam-se completamente e se misturam somente com um gás inerte, tornando fácil a coleta das frações e determinação quantitativa; o tempo de análise em geral é curto.

Uma desvantagem é a de componentes de uma amostra que se retém fortemente, se moverem muito lentamente ou em alguns casos permanecerem imóveis. Esta dificuldade pode ser superada programando a temperatura da coluna para reduzir o tempo de eluição. Por programação de temperatura devemos entender o aumento de temperatura da coluna durante uma separação cromatográfica, para proporcionar uma análise mais rápida e mais versátil.

As partes básicas de um cromatógrafo são segundo McNAIR et BONELLI (1969):

1. Uma fonte de gás portador puro e alta pressão
2. Um controlador exato do fluxo de gás
3. Ponto de injeção da amostra (mantido sempre quente quando em operação)
4. Coluna com:
 - a. suporte sólido e inerte com uma superfície de grande área;
 - b. fase líquida adsorvida ao suporte inerte;
5. Detector (com a eletrônica necessária)
6. Registrador
7. Termostato no ponto de injeção, coluna e detector

a. **GÁS PORTADOR:** um cilindro de gás a alta pressão serve como fonte de gás portador. Em cromatografia isotérmica a gás, a permeabilidade (resistência) de uma coluna não muda durante uma análise. Usa-se um regulador de pressão para assegurar um fluxo uniforme na entrada da coluna.

A uma dada temperatura esse fluxo constante de gás eluirá os componentes em um tempo característico, denominado tempo de retenção.

b. **INTRODUÇÃO DA AMOSTRA NO CROMATÓGRAFO:** a amostra deve ser introduzida na coluna de forma instantânea, como um "tampão", por meio de seringas, que podem ser de tipos variáveis, cuja agulha penetra através de um septo de borracha que se fecha automaticamente após a retirada da agulha, não permitindo o refluxo do gás portador.

c. **COLUNAS:** os tubos das colunas usadas em CGL podem ser de cobre, aço inoxidável, alumínio e vidro, em forma reta, dobrada ou em espiral. As colunas de cobre não são muito usadas pelo

fato de apresentarem adsorção ou reação com os componentes da amostra.

Certos compostos instáveis, tais como esteróides e ácidos graxos, podem ser melhor separados em colunas de vidro.

d. **SUPORTE SÓLIDO:** a finalidade do suporte é prover o meio de distribuição da fase líquida de maneira uniforme sobre uma grande superfície. Este deve ser:

1. inerte
2. de grande superfície
2. de forma regular e tamanho uniforme

e. **FASE ESTACIONÁRIA:** a seleção correta do solvente de partição a ser usado é provavelmente o parâmetro mais importante em CGL. Idealmente o solvente deve ter as seguintes características:

1. As amostras devem exibir diferentes coeficientes de distribuição.
2. As amostras devem ter uma solubilidade razoável no solvente.
3. O solvente deve ter uma pressão a vapor imperceptível nas temperaturas de operação.

A versatilidade e seletividade da CGL deve-se a ampla seleção de solventes disponíveis. De acordo com a fase estacionária empregada, teremos diferentes tempos de retenção das amostras, numa mesma temperatura. Escolher a fase estacionária adequada para os tipos de compostos que se deseja separar é uma tarefa sumamente importante.

f. **TEMPERATURA:**

1. *Temperatura do ponto de injeção:* o ponto de injeção deve estar suficientemente quente para vaporizar a amostra rapidamente para que não haja perda de eficiência na técnica de injeção. Por outro lado, a temperatura do ponto de injeção deve ser suficientemente baixa para evitar decomposição. A variação da temperatura do ponto de injeção pode conduzir a resultados práticos na obtenção dos cromatogramas. Ao aumentar-se essa temperatura, se a eficiência da coluna ou forma dos picos melhora, é porque a mesma estava muito baixa. Se os picos emergem mais rapidamente e em formas estranhas a temperatura está muito alta.

2. *Temperatura da coluna:* a temperatura da coluna deve ser suficientemente alta para que se obtenha a análise em um lapso de

tempo razoável e suficientemente baixa para obter a separação desejada dos compostos da amostra.

De acordo com uma simples aproximação feita por GIDDINGS, o tempo de retenção se duplica a cada 30°C de diminuição da temperatura da coluna. Para maioria das amostras, quanto mais baixa a temperatura de operação da coluna, mais alto será o coeficiente de partição na fase estacionária e melhor a separação resultante. Em alguns casos não é possível usar uma temperatura de operação baixa. No caso de amostras com variação ampla do ponto de ebulição de seus constituintes, seria desejável empregar a programação de temperatura.

3. *Temperatura do detetor:* a influência da temperatura sobre o detetor depende consideravelmente do tipo de detetor usado. Como regra geral, pode-se dizer que o detetor e as conexões de saída da coluna ao mesmo devem estar suficientemente quentes de modo que não se produza condensação de amostra ou da fase líquida. O alargamento dos picos e perda de picos componentes são característicos da condensação. Para detectores do tipo de ionização, a temperatura deve manter-se bem alta para evitar não somente a condensação das amostras, mas também da água ou produtos derivados formados no processo de ionização.

g. **DETETORES:** apesar de a coluna ser “o coração do cromatógrafo” em fase gasosa, as melhores separações passariam despercebidas se não fora o detetor. Este indica a presença e mede a quantidade de componentes no eluente da coluna.

A relação entre a concentração da amostra e a resposta do detetor se define como taxa dinâmica do detetor. A porção linear da taxa dinâmica é a linearidade do detetor. Para fins quantitativos, a resposta do detetor deve ser uma função linear da quantidade da amostra injetada.

Os detetores devem ser razoavelmente insensíveis a mudanças no fluxo de gás, operáveis numa ampla variação de temperatura e com respostas independentes da natureza da amostra e sobretudo não deve adsorver ou reagir com quaisquer componentes da amostra. Este último requerimento é muito importante, principalmente se iremos coletar as frações da amostra para estudos posteriores.

Existem vários tipos de detetores, porém nos ateremos apenas à descrição do princípio de funcionamento do detetor de ionização de chama, que foi o tipo utilizado no presente estudo.

O princípio da operação do detetor de ionização de chama é que o gás efluente da coluna é misturado com o hidrogênio e queimado com ar ou oxigênio. Íons e elétrons, formados na chama, são capturados por dois eléctrodos, entre os quais existe uma diferença de potencial de 100 a 300 volts. O mais freqüente é a existência de um só eléctrodo. A corrente de ionização atravessa uma forte resistência. A tensão nas extremidades desta resistência é enviada à entrada de um amplificador, a corrente contínua, ligado a um registrador (GUI-CHARD *et al.*, 1968 em TRANCHANT, J.).

O detetor de ionização de chama responde virtualmente a todos os compostos com exceção, entre outros, mais particularmente ao ar e água. A falta de respostas ao ar e água faz do detetor de ionização de chama um ótimo detetor na análise de poluintes do ar ou amostras aquosas como bebidas alcoólicas e materiais biológicos. As quantidades mínimas detetáveis são da ordem de $0,00001\mu\text{g}$ e o limite de temperatura 400°C (McNAIR 1. c.).

A única desvantagem do detetor de ionização de chama é que no momento que injetamos a amostra não surge no registrador o pico referente a introdução de ar na coluna, e portanto, devemos acionar a pena do registrador manualmente para indicar o exato momento da injeção a fim de calcularmos o tempo de retenção de cada composto da amostra a ser analisada.

h. REGISTRADOR: o sinal produzido pelo detetor pela passagem dos diversos componentes de uma amostra é impresso continuamente através de um registrador, com uma escala total de resposta de 1 mv/1 seg. A velocidade do papel do registrador é regulada de acordo com a rapidez de emergência dos vários picos.

i. VELOCIDADE DO GÁS PORTADOR: a eficiência de uma coluna depende, entre outros fatores, da seleção da velocidade linear correta do gás. A taxa de fluxo ótimo pode ser determinada experimentalmente fazendo-se uma delineação da equação de Van Deemeter do número de AEPT (alto equivalente platô teórico) contra a velocidade linear do gás.

A maneira mais simples para medir as taxas de fluxo do gás é com o emprego de um medidor de fluxo de bolhas de sabão e um cronômetro.

O AEPT é dado pela forma:

$$\text{AEPT} = L/N$$

onde L representa o comprimento da coluna em centímetros e N é o número de platôs teóricos. Para uma determinada coluna, um determinado tamanho da amostra e um fluxo de gás fixo, o número de platôs teóricos é calculado pela fórmula $N = 16 (x/y)^2$, onde x é a distância do ponto de injeção ao ápice do pico e y é a largura do pico na linha de base.

Desta forma, a taxa ótima no fluxo gasosa pode ser obtida fazendo-se um gráfico, tendo na ordenada o número de AEPT e na abcissa as diversas velocidades do fluxo gasoso. O ponto da curva onde coincidir a velocidade do gás com o mínimo de AEPT indicará o fluxo gasoso mais eficiente para a coluna em questão.

Por meio destas verificações foi possível escolher a melhor velocidade do fluxo gasoso para aumentar a eficiência das colunas que empregamos para o estudo dos ácidos graxos.

j. COLUNAS POLARES E NÃO POLARES: o tipo de coluna empregada na análise cromatográfica é bastante importante, pois dela depende a separação dos constituintes da amostra injetada.

Devem-se utilizar sempre dois tipos de colunas, as chamadas polares e não polares, pois esta técnica permite confrontar os resultados e ainda confirmar quais dos nossos compostos são saturados e quais insaturados.

Uma regra importante na cromatografia de fase gasosa é que a ordem de eluição numa coluna não polar ou fracamente polar é principalmente uma função do ponto de ebulição dos componentes da amostra, sendo que a estrutura química das moléculas é de pouca importância, enquanto que, numa coluna polar, a estrutura química das moléculas é crítica.

Nas colunas não polares, os ácidos graxos insaturados são eluídos antes dos correspondentes saturados, ocorrendo o inverso nas colunas polares. Essas propriedades das colunas polares e não polares, permite-nos, com o auxílio de outras técnicas, verificar se um dado ácido graxo é realmente saturado ou insaturado. Assim, numa colu-

na de Apiezon L (não polar), a ordem de eluição dos ésteres-metílicos dos ácidos graxos é a seguinte: metil-caprilato, metil-laurato, metil-miristato, metil-palmitato, metil-linoleato, metil-oleato, metil-estearato, enquanto que numa coluna E G SS-X a ordem é: metil-caprilato, metil-laurato, metil-miristato, metil-palmitato, metil-estearato, metil-oleato e metil-linoleato.

1. ANÁLISE QUALITATIVA: o volume do gás portador necessário para eluir um composto em uma coluna é denominado de volume de retenção.

Sob condições constantes de pressão, a taxa do fluxo do gás é linear com o tempo e pode-se, por isso, chamar-se o volume de retenção de tempo de retenção.

Este volume de retenção ou tempo de retenção é característico para uma amostra e fase líquida, e pode, devido a isso, ser usado para identificar os componentes da amostra. A temperatura da coluna, entretanto, deve ficar constante. A identificação é baseada na comparação do tempo de retenção dos componentes desconhecidos com aquele obtido de um padrão analisado sob condições idênticas.

Volume de retenção não corrigido (ou não ajustado) é aquele volume medido do ponto de injeção à altura máxima do pico. Este dado não é comumente usado desde que o mesmo não pode ser comparado com outras colunas ou instrumentos.

Volume de retenção ajustado é o volume medido do pico formado pelo ar à altura máxima do pico. Também é variável com as colunas e instrumentos.

O volume de retenção relativo é aquele referido a um componente padrão. É o mais fácil de se obter. Em geral, o volume de retenção relativo depende somente da temperatura da coluna e do tipo de fase líquida. Este é o método recomendado por todos os autores para a identificação dos picos.

Pode-se também identificar um composto desconhecido construindo-se um gráfico semi-logarítmico de uma série homóloga. Se uma amostra contendo inúmeros membros de uma série homóloga é injetada num cromatógrafo a gás, o gráfico semi-logarítmico do tempo de retenção é proporcional a alguma propriedade crescente da série homóloga. Portanto a identificação de membros de uma série homóloga pode ser obtida pelo gráfico, projetando-se o logaritmo do

tempo de retenção de cada composto da amostra (no eixo das ordenadas), verso o número de átomos de carbono (nas abcissas).

Este método de identificação é vantajoso por somente 3 ou 4 compostos serem necessários para estabelecer a inclinação da reta e assim pode ser usado para identificar outros membros da mesma série.

A confirmação na análise qualitativa se um determinado composto é saturado ou não, pode ser verificada através da hidrogenação dessa substância. Hidrogenação de ácidos graxos insaturados torna-os saturados e conseqüentemente haverá uma mudança no tempo de retenção do composto em questão.

m. ANÁLISE QUANTITATIVA: a fim de quantificar uma mistura de ácidos graxos, a resposta e linearidade do detetor devem ser conhecidas. Verifica-se a linearidade do detetor injetando-se quantidades crescentes de uma mistura simples e comparando-se a relação da altura do pico de dois componentes da amostra de diferentes concentrações.

É sabido (ETTRE *et al.*, 1963) que a resposta relativa aos ésteres-metílicos dos ácidos graxos, usando o detetor de ionização de chama, pode ser considerada como a concentração de peso por cento. Admite-se que todos os picos foram eluídos e que cada composto tem a mesma resposta no detetor. Se todas essas suposições foram testadas, este método é rápido e simples, pois, a % de um composto A será:

$$\% A = \frac{\text{área do pico A}}{\text{área total dos picos}} \times 100$$

n. MEDIDA DAS ÁREAS DOS PICOS: existem vários métodos para a determinação da área dos picos e aqui somente será descrita a técnica usada no presente trabalho.

Desde que os picos normais são aproximadamente um triângulo, pode-se calcular a área multiplicando-se a altura máxima do pico pela largura, na porção média do mesmo. A base normal do pico não é usada pois amplos desvios podem ser observados devido a "cauda" formada nos picos. Esta técnica é rápida e simples. Os resultados são bons quando os picos são simétricos e de largura razoável.

Na análise dos ésteres-metílicos dos ácidos graxos, utilizou-se na presente pesquisa um cromatógrafo de ionização de chama, marca Packard, modelo 804, série 7.400.

Dois tipos de colunas de vidro foram utilizados na análise cromatográfica dos ésteres-metílicos dos ácidos graxos:

1. Coluna de 1,90 m de comprimento, contendo interiormente um suporte sólido diatomáceo (CHROMOSORB P) cujo espaço entre as partículas era ao redor de 100-120 "mesh", e cuja fase líquida adsorvida a esse suporte era o etileno glicol succinato (EGS-X).
2. Coluna de 1,20 m de comprimento, cujo suporte sólido interno era um calcinato de diatomáceas a 900°C e cujo espaço interno é praticamente nulo e a fase líquida adsorvida a esse substrato era o silicone (SE 30).

No primeiro tipo de coluna os ácidos graxos saturados são eluídos antes dos ácidos graxos correspondentes insaturados, o que é oposto nas colunas do tipo SE.

Em cada experimento, injetou-se no cromatógrafo, por meio de uma micro-seringa de Hamilton, 1 µl dos ésteres-metílicos dos ácidos graxos. Cada corrida foi repetida no mínimo 3 vezes.

O cromatógrafo foi operado isotermicamente, em idênticas condições em todas as análises realizadas. A temperatura da coluna foi mantida a 160°C, a do ponto de injeção a 180°C e a do detetor a 200°C.

O gás portador usado foi o N₂ com um fluxo constante de 42 ml/min.

A voltagem usada no aparelho foi de 150 volts, e a velocidade do papel registrador dos cromatogramas foi regulada para 30 cm/h.

Os picos resultantes dos cromatogramas foram identificados por comparação, através de seu tempo de retenção, com padrões. Quando um padrão não era disponível, a tentativa de identificação de um pico era feita pelo número de carbonos, segundo o método de WOOD-FORD e GENT (1960) ou pelo gráfico semi-logarítmico do tempo de retenção dos compostos contra o grau de insaturação.

Os ácidos graxos foram quantificados expressando-se a área de cada pico do cromatograma como uma certa porcentagem do total, isto devido ao fato de que, para os ésteres-metílicos dos ácidos gra-

nos contendo no mínimo 8 carbonos e para ácidos graxos de cadeia carbônica bem superiores a esse número, MORNING *et al.*, (1964) verificaram que a medida das áreas dos picos corresponde diretamente a percentagem em peso.

A medida das áreas dos picos foi procedida conforme descrita anteriormente, ou seja, pelo método da triangulação.

A fim de determinar se um ácido graxo era realmente insaturado, após evaporação do seu solvente por um fluxo de N_2 , 5 ml de metanol redestilado e 10 mg de óxido de platina como catalisador foram adicionados aos ésteres-metílicos. Em seguida, através de um orifício da rolha do frasco contendo a mistura acima, insuflou-se cuidadosamente H_2 , fechando-se o frasco hermeticamente, o qual era colocado sobre um agitador magnético, aí permanecendo 24 horas (HAMMARSTRAND, 1966). A hidrogenação dos ácidos graxos insaturados torna-os saturados, ocorrendo, conseqüentemente, uma mudança no tempo de retenção destes compostos e aumentando a percentagem dos compostos saturados.

3. RESULTADOS:

Os resultados, expressos em percentagem por peso, encontram-se assinalados nas Tabelas I, II e III.

Excluíram-se dessas tabelas certos ácidos graxos que foram encontrados esporadicamente em alguns animais, não sendo, conseqüentemente, a soma de todas as percentagens de cada ácido graxo igual a 100%.

Observam-se por essas tabelas que as percentagens mais baixas se referem ao ácido mirístico (C_{14}), nos três tipos de tecidos estudados e em ambas as temperaturas de aclimação, bem como nos animais da população natural. Usar-se-á para os ácidos graxos a designação de FARQUHAR *et al.*, (1959). O número antes dos dois pontos representa o número de átomos de carbono no ácido graxo; o número depois dos dois pontos representa o número de duplas ligações no ácido graxo.

O ácido miristoleico ($C_{14:1}$), embora não assinalado nas tabelas, ocorre em proporção mínima, não quantificável pelo método empregado, em alguns tecidos.

Em todos os animais a percentagem de ácido palmítico (C_{16}) é superior ao palmitoleico ($C_{16:1}$). A relação $C_{16} / C_{16:1}$ é prati-

TABELA I
 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO SIRI AZUL,
Callinectes sapidus

Ácido Graxo	% POR PESO											
	TEMPERATURA DE ACLIMAÇÃO 10°C											
	Músculo				Gl. Instest. Médio				Brânquia			
A N I M A L												
	I	2	3	I	2	3	I	2	3	I	2	3
C ₁₄	T	1,5	T	T	1,0	T	T	T	T	T	T	T
C ₁₆	15,8	13,6	15,2	10,7	10,9	8,6	13,0	13,9	11,7	13,0	13,9	11,7
C _{16:1}	8,0	9,3	7,5	5,6	5,9	5,9	5,5	5,5	5,6	5,5	5,5	5,6
C ₁₈	7,9	6,3	6,4	11,2	9,2	7,9	10,5	11,8	11,7	10,5	11,8	11,7
C _{18:1}	26,9	25,3	28,3	18,2	24,6	21,4	23,8	27,3	32,2	23,8	27,3	32,2
C _{18:2}	T	4,2	2,7	3,5	3,3	1,5	3,7	3,6	—	3,7	3,6	—
C _{20:4}	11,3	8,2	9,0	30,6	19,8	29,2	23,0	15,0	16,4	23,0	15,0	16,4
C _{22:6}	29,7	24,6	30,5	16,0	21,8	17,7	18,0	17,5	22,2	18,0	17,5	22,2

T = Traço

Número depois de dois pontos = Número de duplas ligações

— = Não ocorre este ácido

Cada número refere-se à média de 3 determinações.

TABELA II
 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO SIRI AZUL,
Callinectes sapidus

Ácido Graxo	% POR PESO								
	TEMPERATURA DE ACLIMAÇÃO 25°C								
	Músculo			Gl. Inestet. Médio			Brânquia		
A N I M A L									
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C ₁₄	1,3	T	T	1,1	T	T	1,0	—	1,0
C ₁₆	18,0	12,2	17,8	19,5	13,9	12,0	15,8	13,7	14,0
C _{16:1}	3,3	3,3	3,5	2,0	2,8	2,5	2,0	1,4	1,6
C ₁₈	14,1	14,3	15,0	19,3	25,1	24,0	17,1	16,7	15,0
C _{18:1}	27,1	33,3	28,7	27,3	29,3	30,6	26,6	21,4	22,3
C _{18:2}	9,9	9,3	9,0	8,6	13,4	12,4	7,1	8,3	9,0
C _{20:4}	12,1	11,2	12,3	8,7	12,1	9,6	23,4	28,9	27,6
C _{22:5}	11,7	14,0	12,0	1,6	T	1,0	6,3	4,4	3,9

T = Traço
 Número depois de dois pontos = Número de duplas ligações
 — = Não ocorre este ácido
 Cada número refere-se à média de 3 determinações.

TABELA III
 COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS DO SIRI AZUL,
Callinectes sapidus

Ácido Graxo	% POR PESO								
	POPULAÇÃO NATURAL								
	Músculo			Gl. Inestet. Médio			Brânquia		
A N I M A L									
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
C ₁₄	1,2	0,8	T	2,2	T	T	1,0	1,0	T
C ₁₆	14,3	11,9	13,0	18,5	12,0	17,0	11,0	12,1	13,0
C ₁₈	10,5	5,8	6,0	8,6	3,0	6,0	5,2	4,0	5,0
C _{16:1}	6,1	6,5	6,0	5,1	12,0	14,2	10,3	9,4	8,9
C _{18:1}	17,5	23,9	25,0	24,1	17,8	18,6	21,0	22,5	23,4
C _{18:2}	1,1	2,6	3,4	1,1	1,5	2,0	—	1,3	1,0
C _{20:1}	11,1	10,8	12,0	4,4	18,4	8,9	17,3	17,3	18,0
C _{22:5}	26,8	23,2	27,2	12,7	19,5	20,3	24,0	22,2	25,0

T = Traço

Número depois de dois pontos = Número de duplas ligações

— = Não ocorre este ácido

Cada número refere-se à média de 3 determinações.

camente igual a 2 nos animais aclimados a 10°C, o mesmo ocorrendo nos animais da população natural, enquanto que, nos animais aclimados a 25°C essa relação é bem superior, o que nos indica que nestes animais há um aumento da percentagem do ácido palmítico e um decréscimo na percentagem do palmitoleico.

No que se refere ao ácido esteárico (C_{18}), nos siris mantidos a 25°C, as percentagens desse ácido são maiores do que nos siris mantidos a 10°C e da população natural.

Quanto ao ácido oleico ($C_{18:1}$), não há uma correlação nestes experimentos entre as temperaturas de aclimação e as percentagens. O seu valor oscila de um mínimo de 15,5% a um máximo de 33%.

Nos animais aclimados a 10°C e nos da população natural, nova coincidência se repete no que se refere ao ácido linoleico ($C_{18:2}$), em ambos os grupos e nos três tipos de tecidos, as percentagens desse ácido são muito baixas, comparativamente com os animais aclimados a 25%.

O ácido graxo poli-insaturado araquidônico ($C_{20:4}$), sofre oscilações em sua percentagem, variando de um mínimo de 4,4% a um máximo de 30,6%, não se encontrando diferenças marcantes nas diferentes temperaturas de aclimação.

Com relação ao ácido graxo docosapentaenóico ($C_{22:5}$), nos animais aclimados a 25°C a percentagem mínima deste ácido é de 1% e a máxima de 12%. Outra vez, encontramos um estreito paralelismo entre os animais aclimados a 10°C e os da população natural, nos quais este ácido oscila de um mínimo de 12,7% a um máximo de 30%. O máximo de ácido docosapentaenóico nos animais submetidos a 25°C, corresponde ao mínimo encontrado nos outros dois grupos de animais estudados.

Partindo-se da suposição de que a temperatura de aclimação tenha influência tanto na qualidade como na quantidade dos ácidos graxos insaturados, em um estudo desta natureza é interessante comparar-se a percentagem total dos ácidos graxos insaturados. Para tanto, nas Tabelas IV, V e VI, encontramos a soma das percentagens dos ácidos graxos não saturados, no caso do músculo, glândula do intestino médio e brânquias, respectivamente.

Pela Tabela IV, verifica-se que o músculo dos animais mantidos a 10°C e os da população natural é o que possui maior percentagem de ácido graxo insaturado, o mesmo ocorrendo na glândula do intestino médio (Tabela V) e brânquias (Tabela VI).

É notória a extrema coincidência das médias das percentagens dos ácidos graxos insaturados, do músculo e da glândula do intestino médio nos animais aclimados a 10°C e da população natural.

Assim, as médias das percentagens dos ácidos graxos dos animais mantidos a 10°C, é de 75,1%, 75,1% e 78,2%, para o músculo, glândula do intestino médio e brânquias. Nos animais aclimados a 25°C essas médias, para os mesmos tecidos e na mesma sequência, são: 66,6%, 53,9% e 64,7%. Finalmente, nos animais da população natural, nessa mesma ordem temos: 82,1%, 82,1% e 72,6%.

Observa-se pelas médias das percentagens dos ácidos graxos insaturados, tanto nos animais aclimados a 10°C e da população natural, que estas são superiores em todos os tecidos às médias dos animais aclimados a 25°C.

% DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS DO SIRI AZUL,
Callinectes sapidus
TABELA IV

MÚSCULO									
10°C			25°C			(9°C)			
A N I M A L									
1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	71,6	78,0	64,1	71,1	65,5	82,5	84,4	79,6	
Média	75,1			66,6			82,1		

TABELA V

GI. DO INTESTINO MÉDIO									
10°C			25°C			(9°C)			
A N I M A L									
1	2	3	1	2	3	1	2	3	
	73,9	75,9	75,7	48,1	57,6	56,1	82,5	84,4	79,6
Média	75,1			53,9			82,1		

4.

DISCUSSÃO

Vimos na introdução que muitos são os fatores que induzem modificações na composição química dos ácidos graxos (*a.g.*) nos organismos. Entre esses múltiplos agentes, no presente trabalho foi selecionada a temperatura, procurando-se agora investigar a influência da mesma ao nível dos *a.g.* totais do siri azul, *Callinectes sapidus*.

A maior parte dos trabalhos relativos a este problema foi realizada em peixes, justamente devido ao grande interesse comercial desses animais.

Da bibliografia compulsada, infere-se que a temperatura tem uma atuação nítida sobre a composição química dos *a.g.*, porém os autores que investigaram este aspecto da bioquímica dos lipídeos não são concordes quanto ao tipo ou tipos de *a.g.* que mais sofrem a influência das oscilações da temperatura.

Há, com relação aos crustáceos e particularmente os decápodes, uma falta total de dados na literatura. LEWIS (1962) estudou a influência da temperatura sobre os *a.g.* de 14 animais filogeneticamente diferentes, incluindo crustáceos planctônicos, realizando um "pool" desses animais. FARKAS e HERODEK (1964) estudaram a influência da temperatura ambiente na composição química dos *a.g.* dos cladóceros e copépodos, porém analisam globalmente os resultados de espécies diferentes.

As investigações sobre *a.g.* de peixes conduziram à formulação da teoria da existência de dois tipos de lipídeos: o tipo denominado "marinho" e o tipo denominado de "água-doce" (LOVERN, 1937). De acordo com esta teoria, nos organismos de água doce a proporção de *a.g.* com 16 e 18 carbonos é maior do que nos animais marinhos, enquanto nestes, os *a.g.* poli-insaturados, com 20 e 22 carbonos, estão presentes em maior proporção.

A análise dos *a.g.*, pela cromatografia em fase gasosa, do siri azul, revelou que estes animais apresentam lipídeos do tipo 'marinho', ou seja, com uma alta percentagem de C_{20} e C_{22} , conforme indicado nas Tabelas I, II e III.

LEWIS (l.c.), estudando animais poiquilotérmicos marinhos verificou que baixas temperaturas promovem uma perda completa do

ácido esteárico (C_{18}), uma redução do palmítico (C_{16}) e aumento na quantidade de palmitoleico ($C_{16:1}$). AKULIN e CHEBOTAREVA (1969), entre outros, mostraram que com a diminuição da temperatura ambiente há, nos peixes, um aumento de *a.g.* de cadeias longas (C_{20} e C_{22}) e também maior insaturação desses *a.g.*. Os resultados expressos nas Tabelas I, II e III mostram que, nos siris, os mesmos são concordantes com o que expressam os autores anteriormente mencionados. Nos animais aclimados a 10°C e nos da população natural, a percentagem do ácido esteárico (C_{18}) é praticamente a metade daquela encontrada nos animais aclimados a 25°C.

Com relação ao *a.g.* docosapentaenóico ($C_{22:5}$), podemos verificar pelas tabelas assinaladas que nos animais aclimados a 10°C e os da população natural, a percentagem desse ácido é praticamente o dobro daquela encontrada nos animais aclimados a 25°C. Isto concorda ainda com os achados de JOHNSTON e ROOTS (1964), no peixinho dourado *Carassius auratus*.

Na parte referente aos resultados obtidos sobre as pesquisas nos *a.g.*, vimos que a relação $C_{16}/C_{16:1}$ é praticamente igual a 2 nos animais aclimados a 10°C e nos da população natural, enquanto que esta relação nos animais aclimados a 25°C é bem superior. Isto não deixa de ter um significado, que concorda plenamente com LEWIS (1.c.) ao considerar que o abaixamento da temperatura no "habitat" do animal promove um aumento na quantidade de $C_{16:1}$. Esse autor encontrou, para uma variedade de organismos que vivem numa temperatura de 4 a 5°C, o mesmo valor 2 para essa relação e um valor bem superior a esse nos animais que vivem em temperaturas mais elevadas.

JOHNSTON e ROOTS (1964) assinalam não ocorrer modificações nas percentagens de *a.g.* do grupo C_{18} com variação da temperatura de aclimação. No entretanto, LEWIS (1967) estudando os *a.g.* de crustáceos que vivem em profundidade e baixas temperaturas encontrou maior percentagem de $C_{18:1}$ nestes animais.

Os resultados aqui obtidos se aproximam mais dos encontrados por LEWIS, no sentido de que nos animais aclimados a 10°C e da população natural, nos três tipos de tecidos estudados houve uma diminuição acentuada na percentagem do ácido linolênico ($C_{18:2}$).

Com relação ao ácido araquidônico ($C_{20:4}$) e docosapentaenóico ($C_{22:5}$), JOHNSTON e ROOTS (1.c.) encontraram um aumento significativo desses ácidos com o decréscimo da temperatura de aclimação. Embora estes resultados aqui obtidos não concordem com os referidos autores relativamente ao $C_{20:4}$, porque as percentagens desse *a.g.* são muito semelhantes nos três grupos de animais, concordam com relação ao ácido docosapentaenóico ($C_{22:5}$). Tanto nos animais submetidos a 10°C, como naqueles da população natural, em todos os tecidos estudados, as percentagens de $C_{22:5}$ são bem superiores do que nos mesmos tecidos dos animais aclimados a 25°C.

Nas Tabelas IV, V e VI encontram-se expressas as percentagens totais dos ácidos graxos insaturados dos músculos, glândula do intestino médio e brânquias, e, a média das percentagens desses ácidos para cada tecido. Pode-se verificar a extrema coincidência entre as percentagens de *a.g.* totais dos músculos e da glândula do intestino médio, tanto nos animais que foram aclimados a 10°C, como nos animais da população natural.

Nos músculos e glândula do intestino médio de animais aclimados a 10°C há 75,1% de *a.g.* insaturados, enquanto nas brânquias, nessa temperatura de aclimação, ocorrem 78,2%.

Nos animais da população natural, músculos e glândula do intestino médio têm 82,1% de *a.g.* insaturados e brânquias 72,6%.

Note-se que nos animais aclimados a 10°C e nos da população natural a percentagem de *a.g.* insaturados, nos três tecidos, é maior do que nos animais aclimados a 25°C.

Estes resultados e os estreitos paralelismos assinalados nos animais aclimados a 10°C e nos da população natural mostram claramente que a temperatura de aclimação teve um efeito sobre a percentagem de *a.g.* totais do siri azul.

As diferenças obtidas nas percentagens de certos *a.g.* insaturados e na percentagem total desses ácidos, entre animais submetidos a 10°C e a 25°C, não podem ter sido causadas pela dieta, uma vez que ambos os grupos de animais receberam o mesmo tipo de alimento. Esse fator poderia ser evocado para explicar, talvez, as diferenças existentes entre as percentagens de *a.g.* totais dos animais aclimados a 10°C e os da população natural.

Qual seria o significado da introdução de novas duplas ligações nos *a.g.* dos animais aclimados a 10°C e nos da população natural? Comentários prévios na literatura referem-se à necessidade dos organismos manterem gorduras mais líqüidas em baixas temperaturas. Deve ser ressaltado que o problema é mais sutil que esse e está relacionado com a *viscosidade*. Muito antes de um lipídeo particular ter alcançado seu ponto de solidificação, ele teria passado através de estágios de viscosidade incompatível com os processos vitais (LEWIS, 1962). A introdução de uma dupla ligação tem um efeito marcado no ponto de fusão dos *a.g.*; para os ácidos C₁₆ e C₁₈, uma dupla ligação reduz o ponto de fusão de cerca de 58°C. Assim, por um processo bastante simples, disponível a todos os organismos através da dehidrogenase, a viscosidade dos lipídeos pode ser ajustada para que a vida seja compatível dentro de uma gama de temperatura muito variável (LEWIS, l.c.).

A constatação do fato de que o grau de insaturação dos ácidos graxos aumenta nos animais aclimados a 10°C, bem como nos da população natural capturados no inverno, indica que o mecanismo envolvido tem um valor adaptativo.

Outro aspecto prático do presente trabalho, além daquele ressaltado na introdução com relação à oxidação dos *a.g.*, é o fato de que, sendo o siri azul rico em ácidos graxos insaturados, seria uma fonte de alimentos importante para baixar o nível de colesterol sanguíneo. Sabe-se (PEIFER, 1967) que a ingestão da carne de peixe promove uma baixa do nível de colesterol do sangue, tanto no homem como nos animais em experiências em laboratório. Essa capacidade está intimamente associada com o alto teor de ácidos graxos insaturados existente nos peixes. WHITNEY (1970) demonstrou, empregando substâncias radioativas, que o siri azul é incapaz da biosíntese de colesterol. Infelizmente, a autora não fornece dados relativos aos níveis de colesterol normalmente encontrados nesses animais, oriundo da dieta.

Dependente do teor de colesterol encontrado no siri azul, poder-se-ia sugerir também a ingestão da carne desses animais para se obter o efeito do abaixamento do nível de colesterol sanguíneo.

5.

CONCLUSÕES

1. Nos animais aclimados a 10°C e nos da população natural (sem aclimação), a percentagem do ácido esteárico (C₁₈) é praticamente a metade da encontrada nos animais aclimados a 25°C.
2. A percentagem de ácido docosapentaenóico (C_{22:5}) nos animais aclimados a 10°C é praticamente o dobro da encontrada nos animais aclimados a 25°C.
3. O abaixamento da temperatura de aclimação conduz a um aumento da quantidade de ácido palmitoleico (C_{16:1}).
4. Na temperatura de aclimação a 10°C, há uma diminuição acentuada da percentagem de ácido linoleico (C_{18:2}).
5. A percentagem de ácidos graxos insaturados é maior nos animais aclimados a 10°C e nos da população natural (sem aclimação), que nos animais submetidos a 25°C.
6. As alterações nas percentagens de ácidos graxos insaturados, decorrentes do abaixamento da temperatura, têm um caráter adaptativo.

BIBLIOGRAFIA

- AKULIN, V. N. & Chebotareva, M. A. — 1969 — Fatty acids of phospholipids of the brain, muscle and liver of the anadromus salmon, *Oncorhynchus nerka* in freshwater and marine conditions. *J. Evolut. Biochem. Physiol.*, 5(5):366-373.
- BAZAN, N. G. & Rakowski, H. — 1970 — Increased levels of brain fatty acids after electroconvulsive shock. *Life Sciences*, 9(1):501-507.
- BELEHRADEK, J. — 1931 — Le mecanisme physico-chimique de l'adaptation thermique. *Protoplasma*, 12:406-434.
- DAMBOVICEANU, A. — 1932 — Composition chimique et physico-chimique du liquide cavitare chez les crustacés décapodes (physiologie de la calcification). *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 2:239-309.
- ETTRE, L. S., and Kabot, F. J. — 1963 — Relative response of fatty-methyl esters on the flame ionization detector. *J. Chromatog.*, 11: 114-116.
- FARKAS, T. & Herodek, S. — 1961 — Seasonal changes in the fatty acid composition of freshwater crustacens. *Mag. Tud. Akad. Tihany. Biol. Kutatoin. Evkonyve*, 28:91-94. (Chem. Abstr., 56:15976 f, 1961).
- FARKAS, T. & Herodek, S. — 1964 — The effect of environmental temperature on the fatty acid composition of crustacean plankton. *J. Lipid Res.*, 5:369-373.
- FARQUHAR, J. W. et al. — 1959 — The analysis of fatty acid mixtures by gas-liquid chromatography; construction and operation of an ionization chamber instrument. *Nutr. Rev.*, 17(2):1-30.

- FOLCH, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S. — 1957 — A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, 226:497-509.
- FREDRICKSON, D. S. & Gordon, R. S. Jr. — 1958 — Transport of fatty acids. *Physiol. Rev.*, 38:585-630.
- FULK, W. K. & Shorb, M. S. — 1970 — Production of an artifact during methanolysis of lipids by boron trifluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 11: 276-277.
- HAMMARSTRAND, K. — 1966 — Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acids. 24 p., Varian Aerograph, California.
- HERODEK, S. & Farkas, T. — 1959 — Seasonal changes in the fatty acid composition of *Astacus leptodactylus*. *Biol. Koslemenyek*, 7: 53-59 (*Chem. Abstr.*, 56: 787 f).
- HORNING, E. C. et al. — 1964 — Quantitative analysis of fatty acids by gas-liquid chromatography. *J. Lipid Res.*, 5: 20-27.
- JAMES, A. T. — 1963 — Qualitative and quantitative determination of the fatty acids by gas-liquid chromatography. In: Glick, D. ed. *Methods of Biochemical analysis*, 8: 1-59, Interscience Publishers New York.
- JOHNSTON, P. V. & Roots, B. I. — 1964 — Brain lipid fatty acids and temperature acclimation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 11: 303-309.
- KELLY, P. B., Reiser, R. & Hood, D. W. — 1958 — The origin and metabolism of marine fatty acids: The effect of diet on the depot fats of *Mugil cephalus* (the common mullet). *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 35: 189-192.
- KELLY, P. B., Reiser, R. & Hood, D. W. — 1959 — The origin of the marine polyunsaturated fatty acids: Composition of some marine plankton. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, 36: 104-106.
- LEWIS, R. W. — 1962 — Temperature and pressure effects on the fatty acids of some marine ectotherms. *Comp. Biochem. Physiol.*, 6: 75-89.
- LEWIS, R. W. — 1967 — Fatty acid composition of some marine animals from various depths. *J. Fish. Res. Bd. Can.*, 24 (5): 1101-1115.
- LITTLEPAGE, J. L. — 1964 — Seasonal variations in lipid content of two antarctic marine crustacea. SCAR — Symposium on Antarctic Biology, 1962. In *Antarctic Actualités Scientifiques et Industrielles*, 1312: 463-470.
- LOVERN, J. A. — 1935 — Fat metabolism in fishes. VI. The fats of some plankton Crustacea. *Biochem. J.*, 29: 847-849.
- LOVERN, J. A. — 1937 — The composition of the depot fats of aquatic animals. *Biochem. J.*, 31: 755-763.
- LOVERN, J. A. — 1938 — Fat metabolism in fishes. Factors influencing the composition of depot fat of fishes. *Biochem. J.*, 32. 1214-1224.
- LOVERN, J. A. — 1964 — The lipids of marine organisms. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 2: 169-191.
- LUNETTA, J. E. & VERNBERG, W. — 1971 — Fatty acid composition of parasitized and non-parasitized tissue of the mud-fat snail, *Nassarius obsoleta*. *Expl. Parasitol.* 30: 244-248.
- McNAIR, H. M. & BONELLI, E. J. — 1969 — Basic Gas Chromatography. 308 p. Varian Aerograph, California.
- MOHRI, H. — 1964 — Utilization of ^{14}C -labeled acetate and glycerol for lipid synthesis during the early development of sea urchin embryos. *Biol. Bull.*, 126: 440-455.

- MORRINSON, W. F. & SMITH, L. M. — 1964 — Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids — with boron fluoride-methanol. *J. Lipid Res.*, 5: 600-608.
- MORRIS, R. W. & SCHNEIDER, M. J. — 1969 — Brain fatty acids of an Antarctic fish, *Trematomus bernachii*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 28: 1461-1465.
- NELSON, D. R., TERRANOVA, A. C. & SUKKESTAD, D. R. — 1967 — Fatty acid composition of the glyceride and free fatty acid fractions of the fat body and hemolymph of the cockroach, *Periplaneta americana* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.*, 20: 907-917.
- O'CONNOR, J. D. & GILBERT, L. I. — 1968 — Aspects of lipid metabolism in crustaceans. *Amer. Zool.*, 8: 529-539.
- O'CONNOR, J. D. & GILBERT, L. I. — 1969 — Alterations in lipid metabolism associated with premolt activity in a land crab and freshwater crayfish. *Comp. Biochem. Physiol.*, 29: 889-904.
- PEIFER, J. J. — 1967 — Hypocholesterolemic effects of marine oils. in: Stansby, M. E. — *Fish Oils*, Circ., 285, 16 p. Washington, D.C.
- RODEGKER, W. & NEVENZEL, J. C. — 1964 — The fatty acid composition of three marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 11 (1): 53-60.
- ROOTS, B. I. — 1968 — Phospholipids of goldfish (*Carassius auratus* L.) brain: The influence of environmental temperature. *Comp. Biochem. Physiol.*, 25: 457-466.
- SHORLAND, F. B. — 1962 — The comparative aspects of fatty acid occurrence and distribution. In: A. M. Florkin and H. S. Manson eds. *Comparative Biochemistry*, 3: 1-102. Academic Press, N. Y.
- TRANCHANT, J. — 1968 — Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse. 361 p. Masson & Cie. Éditeurs, Paris.
- VONK, H. J., MIGHORST, J. C. A. & De GROOT, A. P. — 1950 — The metabolism of the snail investigated by means of heavy water. *Physiol. Comp. Oecol.*, 2: 51-58.
- WALKER, B. L. & KUMMEROW, F. A. — 1964 — Dietary fat and the structure and properties of rat erythrocytes. III. Response of erythrocyte fatty acids to various dietary fats. *J. Nutr.*, 82: 329-332.
- WHITNEY, J. C. — 1970 — Absence of sterol biosynthesis in the blue crab *Callinectes sapidus*, Rathbun and in the barnacle *Balanus balanus nubilus* Darwin. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 4: 229-237.
- WILLIAMS, A. B. — 1965 — Marine Decapods of the Carolinas. *Fish. Bull.*, 65 (1): 142-174.
- WITTING, L. A. et al. — 1961 — Dietary alterations of fatty acids of erythrocytes and mitochondria of brain and liver. *J. Lipid Res.*, 2 (4): 412-418.
- WOOTTON, J. M. & WRIGHT, L. D. — 1962 — A Comparative study of sterol biosynthesis in Annelida. *Comp. Biochem. Physiol.*, 5: 253-264.
- WOODFORD, F. P. & VAN GENT, C. M. — 1960 — Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters: The "Carbon number" as a parameter for comparison of columns. *J. Lipid Res.*, 1: 188-190.
- ZANDEE, D. I. — 1962 — Lipid metabolism in *Astacus astacus* L. *Nature*, 195: 814-815.
- ZAR, J. H. — 1968 — The fatty acid composition of the ladybird beetle, *Coleomegilla maculata* (De Geer) during hibernation. *Comp. Biochem. Physiol.*, 26: 1127-1129.

