1. ***Procedimento para determinação de lípidos pelo método gravimétrico seguido de transesterificação para determinação de LCFA por GC-FID***
   1. **Método Gravimétrico**
2. Pesar 0.8 g de esferas de vidro (0.2-0.5mm) para microtubos de centrífuga de 2 mL com tampa de rosca, fechar com tampa e zerar/tarar a balança com o 1º microtubo;
3. Colocar os microtubos vazios seguintes e a tampa no prato da balança e encher com esferas de vidro até obter zero na pesagem;
4. Pesar mais ou menos a mesma quantidade de células liofilizadas para cada microtubo (± 20 mg se tiverem cerca de 30% de lípidos, mais caso tenham menos de 30%, pode-se ter uma ideia deste valor através do fluorimetro);
5. Adicionar (na hotte) 0.8 mL de n-hexano e levar 5min ao Cell Disrupter; colocar 1 min no gelo e voltar a colocar no Cell Disrupter por mais 5 min;
6. Centrifugar 2 min a 10000 rpm;
7. Remover o sobrenadante com pipeta Pasteur de vidro para um tubo de centrífuga de vidro; reservar;
8. Repetir o passo 4, 5 e 6 mais três vezes mas levando só 1min com 0.5 mL de n-hexano ao Cell Disrupter (é só para remover vestígios de lípidos/lavar as esferas);
9. Adicionar ao tubo de centrifuga com n-hexano+lípidos 500 µL de solução 0,9% NaCl (cerca de 20% v/v); tapar o tubo com papel alumínio e prender com elástico, pesar e corrigir o peso com mais NaCl; vortexar 40 seg;
10. Centrifugar numa centrífuga de falcons durante 5 min a 1000g, a 4ºC;
11. Lavar o filtro de seringa (PTFE hidrofóbico) com n-hexano de lavagem (sem deixar entrar ar para o filtro) e filtrar o sobrenadante para um vial de 4mL previamente lavado com n-hexano, seco, guardado no exsicador e pesado; remover vestígios de lípidos lavando o tubo de centrifuga inicial, a seringa e o filtro com n-hexano ‘limpo’ (para GC-FID) e fechar o vial;
12. Evaporar o n-hexano sob corrente de N2 aquecida durante cerca de 40 min; os vials são fechados e guardados no exsicador durante uma noite;
13. No dia seguinte são pesados e são determinadas os g lípidos/g amostras liofilizada.
    1. **Transesterificação**

**Reagentes:**

Metanol com teor de humidade não superior a 0,5 % (m/m).

Hexano para cromatografia.

Solução metanólica aproximadamente 10% de ácido sulfúrico: diluir 10 ml de ácido sulfúrico em 100 ml de metanol.

Solução de 2000 mg/L de padrão interno C17

**Importante: todo o trabalho laboratorial deverá ser efetuado na hotte química, de preferência com mascara de segurança e 2 pares de luvas (se cair uma gota nas luvas, rejeitar as mesmas para um contentor especifico para ficar na hotte e calçar novas).**

1. A recta de calibração vai de 50-300mg/L de cada LCFA, se tiver 30% de lípidos isso corresponde a 600 mg de lípidos totais em 1mL ou 300 mg em 2mL; o melhor é adicionar 2 mL de n-hexano às amostras; vortexar e transferir para um tubo de ensaio com tampa de rosca de 30 ml, 1 mL de amostra, 100 l de solução de padrão interno e adicionar 1 mL de solução metanólica de ácido sulfúrico 10%.
2. Fechar o tubo e colocar no bloco de aquecimento (ou banho maria) a 100 ºC durante 2 horas. NOTA: é muito importante fechar corretamente os tubos para evitar a evaporação da mistura reacional. A reação deve dar-se em excesso de metanol e não pode haver perdas. Retirar as amostras e deixar arrefecer à temperatura ambiente.
3. Uma vez arrefecidas, adicionar a cada amostra 1 mL de hexano, agitar vigorosamente com um vortex e deixar em repouso cerca de 5 min ou o tempo necessário para se verificar a separação das fases. Recolher a amostra orgânica (a fase superior) onde se encontram os ésteres metílicos dos ácidos gordos (FAME) para um tubo de 10 mL. Secar a amostra com tiossulfato de sódio anidro ( [Na](https://pt.wikipedia.org/wiki/S%C3%B3dio)2[S](https://pt.wikipedia.org/wiki/Enxofre)2[O](https://pt.wikipedia.org/wiki/Oxig%C3%AAnio)3) ou sulfato de sódio anidro (?). Para isso colocar com uma pequena espátula uma porção do sal e agitar. Se o sal se aglomerar em forma de pedra, colocar mais uma pequena porção, até que o sal fique disperso na solução. Transferir a amostra para um vial de 2 mL com septo, rolhar e analisar no cromatógrafo gasoso.

Os vials são colocados no amostrador automátMSico e analisados no cromatógrafo gasoso com detetor FID nas seguintes condições:

- Coluna TEKNOKROMA TRWAX 30 m x 0,25 mm id; 0,2 m espessura de filme

- Temperatura da coluna: 50ºC durante 2 min, seguido de rampa de aquecimento a 10ºC /min até 225ºC mantendo a 225 ºC durante 10 min.

- Injetor a 220 ºC; split 1:20 volume de injeção: 1 l de amostra

- Gás de arraste: He a 1 ml/min (Pressão constante de 16 a 17 psi)

- Temperatura do detetor FID: 250 ºC;

- Caudal de ar: 250 ml/min

- Caudal de Hidrogénio: 30 ml/min

- Caudal de N2 (make-up): 30 ml/min

A primeira análise deve ser de solvente (hexano) para verificar que a coluna e o solvente não contêm impurezas. Só depois devem analisar as amostras.

**Deposição dos resíduos**

Todos os resíduos devem ser recolhidos num recipiente com o rótulo “Resíduos de solventes orgânicos LER 070403”.

As pipetas de Pasteur são descartadas nos recipientes amarelos de tampa vermelha.

O restante material de vidro deve ser deixado a evaporar na hotte química.

**Preparar material**

Todo o material deve ser lavado com Derquim e água quente e passado por n-hexano antes de ser utilizado. Depois de utilizado, pode ser forçada a volatilização do n-hexano com recurso a banho-maria (goblé de vidro com os tubos e seringas dentro de outro goblé com água sobre uma placa de aquecimento).