



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AVALIAÇÃO ABRANGENTE DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

LUIZ PAULO MORAIS DE OLIVEIRA

MESTRADO

MANAUS – AM
Abril de 2022

LUIZ PAULO MORAIS DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO ABRANGENTE DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DO
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, exigida como requisito para obtenção de título de Mestre em Química, com ênfase na linha de pesquisa em Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Moura Araújo da Silva

MANAUS – AM
Abril de 2022

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

O48a Oliveira, Luiz Paulo Morais de
Avaliação abrangente da composição lipídica do Tambaqui
(*Colossoma macropomum*) / Luiz Paulo Morais de Oliveira . 2022
77 f.: il.; 31 cm.

Orientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

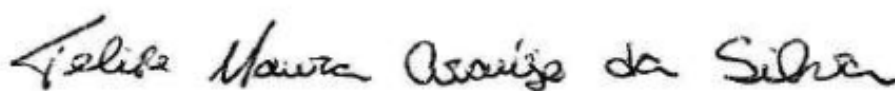
1. Peixes Amazônicos. 2. Óleo. 3. triacilglicerídeos. 4. ácidos
graxos. 5. cromatografia. I. Silva, Felipe Moura Araújo da. II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

*Avaliação Abrangente da Composição Lipídica do Tambaqui (*Colossoma macropomum*)*

LUIZ PAULO MORAIS DE OLIVEIRA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre (a) em Química.

Aprovada em, 04 de abril de 2022.



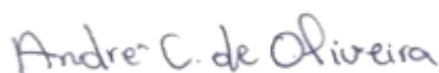
FELIPE MOURA ARAÚJO DA SILVA (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientador



MARIA LUCIA BELÉM PINHEIRO (PPGQ/UFAM)

Membro Interno



ANDRÉ CORREA DE OLIVEIRA (LMD/INPA)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 04 de abril de 2022.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Luiz Henrique Soares de Oliveira e a minha querida mãe Alsineia Silva de Moraes que dedicou e ainda dedica sua vida em função da minha.

Ao meu orientador Felipe Moura Araújo da Silva, que é um dos grandes pesquisadores que já conheci, pela sua capacidade de instigar a busca pelo conhecimento tanto em si como nos que estão em sua volta.

Ao Prof. Dr. Raimundo Carlos Pereira Júnior e a Prof.(a) Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro, por suas contribuições significativas ao desenvolvimento do trabalho.

A Central Analítica (CA) da UFAM pela estrutura e aos companheiros de laboratório em especial do LABCEM e LABGC que contribuíram direta e indiretamente na minha formação.

Ao financiamento concedido pela CAPES, através do subsídio de bolsa para a realização da pesquisa.

Ao PPGQ e a Universidade Federal do Amazonas que me possibilitou de desenvolver como pessoa, e como um indivíduo racional, preparado para servir a sociedade da melhor forma possível.

RESUMO

A composição química de peixes amazônicos é uma problemática moderna por possuir componentes variáveis em função de condições ambientais, sendo, portanto, imperativo uma abordagem analítica capaz de proporcionar dados robustos relativos à sua composição lipídica. Nesse contexto, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) é um dos mais consumidos na região e mais produzidos no país, possuindo grande impacto na economia, entretanto, mesmo com grande valor, ainda possui escassos estudos quanto a sua composição lipídica. Com isso, o presente projeto teve como objetivo contribuir com uma abordagem analítica holística para lipídios do tambaqui. Inicialmente, indivíduos de ambientes de manejo e selvagem foram adquiridos na feira municipal da Manaus Moderna e submetidos ao método Bligh & Dyer de extração de lipídios totais. Uma parte do extrato foi submetida ao processo de hidrólise e derivatização, sendo posteriormente analisada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) a fim de determinar o teor dos principais ácidos graxos (FAMES). Outra parcela do extrato bruto foi submetida a fracionamento através de técnicas de extração em fase sólida (SPE) visando a obtenção de lipídios neutros, os quais foram analisados por infusão direta no espectrômetro de massas (DIMS) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) operando em fase reversa não aquosa. Como resultado da análise de GC-MS foram determinados 6 FAMES principais, relativos aos ácidos graxos palmítico (C16:0), palmitoleico (C16:1n-7), esteárico (C18:0), oleico (C18:1n-9), linoleico (C18:2n-6) e gondoico (C20:1n-9), totalizando mais de 80% da composição de ácidos graxos dos peixes de manejo e selvagem. Por outro lado, foi observado um teor de ácidos graxos totais significativamente maior para o tambaqui de manejo (38,9 mg/g de filé) em comparação ao tambaqui de selvagem (1,1 mg/g de filé). Finalmente, através das análises de DIMS e HPLC-MS da fração de lipídios neutros, encontrou-se um perfil majoritariamente composto por TAGs, tais como LLO/LOL e PLnO, sendo este coerente com a presença de ácido linoleico, oleico, palmítico e esteárico, o que corrobora com os dados encontrados através da análise GC-MS. Assim, a metodologia proposta para esse trabalho se mostrou eficiente na avaliação abrangente do perfil de lipídios de tambaqui.

Palavras-chave: Peixes Amazônicos, óleo, triacilglicerídeos, ácidos graxos, cromatografia.

ABSTRACT

The chemical composition of Amazonian fish is a modern problem due to variable components depending on the environmental conditions, therefore, an analytical analysis capable of providing robust data on their lipid composition is essential. In this context, tambaqui (*Colossoma macromum*) is a composition of the same, has resources in the region and more country, has a great impact on the economy, however it has great value, still scarce in terms of its lip composition. With this, the project aims to contribute with a holistic analytical approach to tambaqui lipids. The management environments were acquired at the Manaus Moderna municipal fair and selected using the Bligh & Dyer method of receiving total lipids. A part of the mass extract and derivation to the hydrolysis process, being a hydrolysis spectrum in order to determine the content of the main fatty compounds (FAMES). Another raw portion was sent to a fractionation via high efficiency emission, no phase lip spectrometry, and direct emission analysis chromatography, and mass coupled high efficiency emission analysis chromatography (HPLC-MS) operating in phase. non-aqueous reverse. As a result of the GC-MS analysis, 6 main FAMES were determined, related to palmitic (C16:1n-7), palmitic (C16:0n-7), stearic (C18:0), oleic (C18:1-9), linoleic (C18:2n-6) and gondoic (C20:1n-9), totaling more than 80% of the organic fish composition of management and wild fish. On the other hand, a significantly higher total fat content was observed for the handling tambaqui (38.9 mg/g fillet) compared to the fillet tambaqui (1.1 mg/g fillet). Through the alternatives of DIMS and HP from the list of lipids, oleic and palmitic mostly, which is composed of a presence of linoleic acid/such as LLO/LOL and PLnO, which is consistent with the presence of linoleic, oleic, palmitic and stearic acid. which corroborates the data found through the GC-MS analysis. Thus, the methodology proposed for work proved to be efficient in the comprehensive evaluation of the lipid profile of tambaqui.

Keywords: Amazonian fish, oil, triacylglycerides, fatty acids, FAMES.

Lista de Abreviaturas e Símbolos

APCI	Ionização química a pressão atmosférica (do inglês <i>Atmosphere pressure chemical ionization</i>)
API	Ionização a pressão atmosférica (do inglês <i>Atmospheric Pressure Ionization</i>)
ESI	Ionização por Electrospray (do inglês <i>Electrospray ionization</i>)
GC	Cromatografia gasosa (do inglês <i>Gas chromatography</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>)
TIC	Corrente de íons totais (do inglês <i>Total ion current</i>)
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês <i>Collision-induced dissociation</i>)
EI	Ionização por elétrons (do inglês <i>Electron ionization</i>)
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>Mass spectrometry</i>)
DIMS	Infusão direta no espectrômetro de massas (do inglês <i>Direct infusion mass spectrometry</i>)
FAMES	Ésteres metílicos de ácidos graxos (do inglês <i>Fatty acid methyl esters</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>Solid phase extraction</i>)
NARP	Fase reversa não aquosa (do inglês <i>Non-aqueous reverse phase</i>)
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
C₁₈	Octadecilsilano
µL	Microlitros
γ	Gama
pH	Potencial hidrogeniônico
Da	Dalton

Lista de Figuras

Figura 1. Bacia hidrográfica amazônica e seus rios.	18
Figura 2. Ilustração dos peixes a. curimatã, b. tambaqui, c. matrinxã, d. jaraqui, e. pirarucu.	19
Figura 3. Dados de produção histórica de peixes de piscicultura no Brasil de 1977 até 2013.	20
Figura 4. Estruturas de ácido graxo C18:1n-9 (a) triacilglicerol PPP (b) e fosfolípido (c).	24
Figura 5. Mecanismo biosintético de ácido graxo; (1) Processo de condensação e redução a partir de maloil-CoA (2) Ciclos até formação de palmitato.	26
Figura 6. Vias metabólicas de conversão de ALA (18:3n-3) e LA (18:2n-6) em DHA (22:6n-3) e ARA (20:4n-6) respectivamente.	27
Figura 7. Óleo de peixe e a estrutura dos seus ácidos graxos EPA & DHA.	28
Figura 8. Amostras de tambaqui selvagem (acima) e de manejo (abaixo).	34
Figura 9. Protocolo geral de preparo de amostra.	35
Figura 10. Cromatograma entre 30 e 50 minutos do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos de peixe selvagem a) e de manejo b).	39
Figura 11. Análise DIMS com fonte APCI modo positivo.	42
Figura 12. Análise DIMS com fonte APCI modo negativo (a) e ESI modo positivo (b).	43
Figura 13. Cromatograma entre 0-20 min com contagem de íons totais (TIC) na faixa de m/z 700-1000.	45
Figura 14. Espectro MS/MS em APCI dos íons de m/z 882 e 856 $[M+H]^+$	45
Figura 15. Espectro MS/MS em APCI dos íons de m/z 880, 854 $[M-H]^-$ e 884 $[M+H]^+$	47
Figura 16. Espectro MS/MS em APCI dos íons de m/z 856, 882 $[M-H]^-$ e 858 $[M+H]^+$	48
Figura 17. Proposta de fragmentação de TAGs em fonte APCI em modo positivo (a) e modo negativo (b).	49

Lista de Tabelas

Tabela 1. Parâmetros da curva de calibração de padrões usados na quantificação.	40
Tabela 2. Perfil de FAMES presentes em tabaquis de manejo e selvagens.	41
Tabela 3. Dados de íons obtidos e principais fragmentos observados dos TAGs.	49

Lista de Anexos

Figura A1. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 1.	62
Figura A2. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 2.	62
Figura A3. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 3.	62
Figura A4. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 4.	63
Figura A5. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 5.	63
Figura A6. Espectro MS/MS do íon de m/z 880 $[M+H]^+$	63
Figura A7. Espectro MS/MS do íon de m/z 878 $[M-H]^-$	64
Figura A8. Espectro MS/MS do íon de m/z 828 $[M+H]^+$	64
Figura A9. Espectro MS/MS do íon de m/z 826 $[M-H]^-$	64
Figura A10. Espectro MS/MS do íon de m/z 854 $[M+H]^+$	65
Figura A11. Espectro MS/MS do íon de m/z 852 $[M-H]^-$	65
Figura A12. Espectro MS/MS do íon de m/z 806 $[M+H]^+$	65
Figura A13. Espectro MS/MS do íon de m/z 804 $[M-H]^-$	66
Figura A14. Espectro MS/MS do íon de m/z 830 $[M+H]^+$	66
Figura A15. Espectro MS/MS do íon de m/z 828 $[M-H]^-$	66
Figura A16. Espectro MS/MS do íon de m/z 832 $[M+H]^+$	67
Figura A17. Espectro MS/MS do íon de m/z 828 $[M-H]^-$	67
Figura A18. Espectro MS/MS do íon de m/z 886 $[M+H]^+$	67
Figura A19. Espectro MS/MS do íon de m/z 884 $[M-H]^-$	68
Figura A20. Espectro MS/MS do íon de m/z 860 $[M+H]^+$	68
Figura A21. Espectro MS/MS do íon de m/z 858 $[M-H]^-$	68
Figura A22. Espectro MS/MS do íon de m/z 834 $[M+H]^+$	69
Figura A23. Espectro MS/MS do íon de m/z 832 $[M-H]^-$	69
Figura A24. Espectro MS/MS do íon de m/z 836 $[M+H]^+$	69
Figura A25. Espectro MS/MS do íon de m/z 834 $[M-H]^-$	70
Figura A26. Espectro MS/MS do íon de m/z 910 $[M+H]^+$	70
Figura A27. Espectro MS/MS do íon de m/z 908 $[M-H]^-$	70
Figura A28. Espectro MS/MS do íon de m/z 912 $[M+H]^+$	71
Figura A29. Espectro MS/MS do íon de m/z 910 $[M-H]^-$	71
Figura A30. Espectro MS/MS do íon de m/z 888 $[M+H]^+$	71
Figura A31. Espectro MS/MS do íon de m/z 886 $[M-H]^-$	72
Figura A32. Espectro MS/MS do íon de m/z 862 $[M+H]^+$	72

Figura A33. Espectro MS/MS do íon de m/z 860 $[M-H]^-$	72
Figura A34. Espectro MS/MS do íon de m/z 864 $[M+H]^+$	73
Figura A35. Espectro MS/MS do íon de m/z 862 $[M-H]^-$	73
Figura A36. Espectro MS/MS do íon de m/z 890 $[M+H]^+$	73
Figura A37. Espectro MS/MS do íon de m/z 888 $[M-H]^-$	74
Figura A38. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 1.....	74
Figura A39. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 2.....	74
Figura A40. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 3.....	75
Figura A41. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 4.....	75
Figura A42. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 5.....	75
Figura A43. Cromatograma do mix de FAMES.	76

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	Amazonia e Recursos Hídricos.....	17
2.2	Peixes Amazônicos	18
2.2.1	<i>Colossoma macropomum (Cuvier, 1818)</i>	20
2.3	Composição química de peixes	22
2.3.1	<i>Lipídios</i>	23
2.4	Síntese lipídica & Aspectos fisiológicos	25
2.5	Análises químicas em lipídios	28
2.5.1	<i>Espectrometria de massas</i>	28
2.5.2	<i>Sistemas hifenados</i>	30
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo Geral.....	32
3.2	Objetivos Específicos.....	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	Técnicas cromatográficas & espectrométricas	33
4.1.1	<i>Extração em fase sólida (SPE)</i>	33
4.1.2	<i>Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)</i> 33	
4.1.3	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)</i>	33
4.1.4	<i>Infusão direta no espectrômetro de massas (DIMS)</i>	33
4.2	Solventes & Reagentes	34
4.3	Coleta das amostras	34
4.4	Protocolo de preparo de amostra	35
4.4.1	<i>Extração</i>	36
4.4.2	<i>Derivatização</i>	36
4.4.3	<i>Fracionamento</i>	36
4.5	Análise de perfil de FAMES por GC-MS	37
4.6	Análise do perfil de lipídios neutros por DIMS	37
4.7	Avaliação de lipídios neutros por HPLC-MS	38
5	RESULTADOS & DISCUSSÃO	39

5.1	Análise do perfil de FAMES por GC-MS	39
5.2	Análise do perfil de lipídios neutros por DIMS	42
5.3	Avaliação de lipídios neutros por HPLC-MS & perfil de fragmentação por DIMS.....	44
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	51
7	REFERÊNCIAS	52
	ANEXOS	62

1 INTRODUÇÃO

Diante de uma biodiversidade grandiosa na Região Amazônica com uma abundância de espécies nativas, a bacia hidrográfica amazônica abriga recursos indispensáveis para o desenvolvimento local, sendo portadora de um ecossistema aquático complexo de rios e peixes com características variadas, desta forma, atrai grande atenção global como fonte promissora de recursos hídricos (GOULDING & CARVALHO, 1982).

Uma das consequências de tal riqueza é possuir a maior ictiofauna de peixes de água doce do mundo. Dada sua diversidade, dentre muitos peixes disponíveis, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) chama atenção por ser um peixe robusto capaz de sobreviver em ambientes desfavoráveis, o que faz dele um excelente animal para piscicultura e seu manejo é uma das atividades de grande propulsão na região dado suas características de grande aceitação pelo mercado, justificando sua grande produção no Brasil (VAL, SILVA & ALMEIDA-VAL, 1998).

O mercado de peixes de origem amazônica é crescente, onde, se apresenta com uma demanda cada vez maior. O tambaqui como segundo mais produzido modernamente, é o grande alvo amazônico desse mercado complexo que inclui cadeias produtivas globais. A crescente demanda propõe novos desafios como critérios de controle de qualidade, necessitando o estabelecimento de padrões rigorosos no comércio global de pescado contendo além de parâmetros de segurança como exposição desse pescado a metais pesados, pesticidas ou como indicador de qualidade nutricional do pescado direcionado ao consumidor (JIMENEZ et al., 2021).

Os lipídios são de grande importância biológica uma vez que atuam como fonte energética no seu metabolismo. Os principais que desempenham essa função são os triacilgliceróis que são estruturas formadas por 3 unidades de ácidos graxos ligadas a 1 unidade de glicerol (FAHY et al., 2005). Os peixes possuem um maquinário enzimático de grande impacto na regulação metabólica e modificação de seus ácidos graxos, especialmente devido a transformação dos ácidos graxos poliinsaturados do grupo n-6 e n-3 que ocorre decorrente a sua

alimentação, em que seu balanço é fundamental como parâmetro da regulação de processos fisiológicos em animais (TOCHER, 2010).

O desenvolvimento de uma abordagem robusta suficientemente capaz de fornecer informações satisfatórias relativas à composição lipídica de peixes é uma problemática moderna, e ao mesmo tempo um imperativo para se compreender a real natureza da matriz estudada. O que envolve etapas críticas que devem ser consideradas para um estudo abrangente, como o adequado preparo de amostra, que é uma das etapas chave, ainda pouco trabalhada em abordagens lipidômicas, e um dos meios para isso é empregar materiais de fácil acesso em um laboratório de produtos naturais, que possua a capacidade de extrair quantidades representativas de lipídios da amostra em quantidades satisfatórias (JING et al., 2013).

O fracionamento do extrato lipídico bruto é uma possibilidade frente a possível diversidade de grupos lipídicos polares e neutros presentes na amostra com natureza química distinta, o que implica no âmbito do estudo, que conduz ao uso de instrumentação analítica apropriada e a sua destinação às técnicas de separações mais eficazes para cada situação.

A espectrometria de massas é uma poderosa ferramenta para a compreensão de lipídios em seus diversos níveis. Quando aplicada de forma unitária por infusão direta no espectrômetro de massas (DIMS), é capaz de fornecer dados relativos ao perfil lipídico, conforme a peculiaridade das diferentes tipos de fontes disponíveis para tal que resultam em respostas diferentes, sendo, portanto, complementares. Entretanto, quando hifenada com cromatografia gasosa (GC-MS), através da saponificação/transesterificação da amostra lipídica, pode fornecer o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos que a compõem, assim como quando hifenado a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC-MS), é capaz de avaliar a composição de triacilgliceróis e sua composição de ácidos graxos sem alterar a natureza original da amostra, bem como entender a regioespecificidade de cada um quando a separação ocorre com êxito (MARZILLI et al., 2003).

Dada a carência de dados mais amplos relativos a tais componentes lipídicos de peixes amazônicos, especialmente de tambaqui que é um dos mais produzidos no país, o estudo propõe uma abordagem abrangente e integrativa sobre a composição lipídica de tambaqui, a fim de fornecer dados para o

entendimento de seus aspectos metabólicos e fisiológicos, bem como nutricionais e de qualidade para o crescente mercado de peixes no mundo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Amazonia e Recursos Hídricos

O bioma amazônico é largamente reconhecido como sendo portador de uma exuberante biodiversidade, e a consequência direta deste fato, é a grande preocupação do mundo com a manutenção de seus recursos genéticos, uma vez que tais recursos possuem um potencial imensurável no desenvolvimento de estudos, que possibilitam descobertas de impacto para a sociedade (LEES et al., 2016; TUOMISTO et al., 1995). Daí surge a preocupação em se demarcar áreas de reservas florestais próximos as áreas urbanas, onde é possível proteger tais recursos genéticos de forma mais controlada e efetiva, simultaneamente ao desenvolvimento de estudos para a melhor compreensão dessa rica fauna e flora, assim como fornecer valiosas substâncias bioativas pertencentes ao bioma (OLIVEIRA et al., 2011; SANTOS et al., 2020). Assim sendo, a conservação de recursos hídricos também é de grande relevância haja vista que está passível de modificações antrópicas que podem influenciar parte de ecossistemas aquáticos e terrestres que interagem mutuamente (CASTELLO et al., 2013).

A bacia hidrográfica do Amazonas é a mais extensa rede hidrográfica do globo terrestre, contando com 25.000 km de rios, que possui 7 milhões de km², dos quais 3,8 milhões estão no Brasil. É formada por rios de diferentes naturezas, como os de águas brancas que incluem o Rio Solimões-Amazonas, o Rio Madeira, o Rio Purus e o Rio Juruá. Esses rios têm nascentes nas encostas orientais dos Andes, possuem elevada quantidade de sais básicos e turbidez, com aspecto barrento. Os rios de águas escuras nascem nas terras baixas amazônicas, como o Rio Negro, que é portador de ácidos húmicos que são formados pela matéria orgânica não decomposta na serapilheira do solo, que conseqüentemente, são lixiviados para os riachos, é pobre em nutrientes e de baixo pH (4,4-4,9). E os rios de águas claras como Tocantins, Xingu, Tapajós têm uma ampla gama de valores de pH, embora haja exceções, são geralmente muito pobres em nutrientes (GOULDING & CARVALHO, 1982).

Cada rio possui um regime sazonal de subida e descida do nível da água, e isso impacta as vegetações que compõem as margens, onde diferentes regiões

de divisa são formadas entre superfície terrestre e rios, como áreas alagadas (várzea e igapó), ainda com os diferentes tipos de águas que compõe os rios, e suas características físico-químicas próprias ao longo de sua extensão. A bacia amazônica é detentora da ictiofauna mais rica do mundo, compreendendo uma grande parte da diversidade das famílias de peixes conhecidas no globo (BOGOTÁ-GREGORY et al., 2020; VAL et al., 2010).

Figura 1. Bacia hidrográfica amazônica e seus rios.



Fonte: adaptado de Goulding & Carvalho (1982).

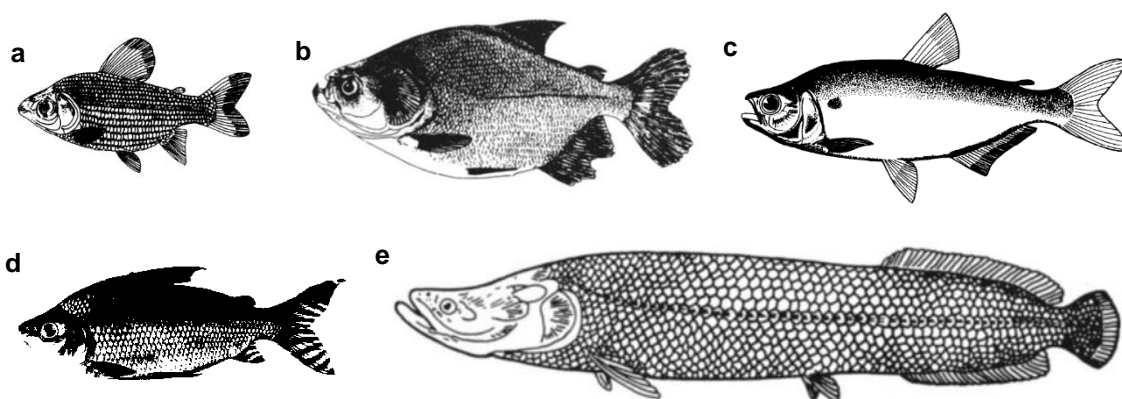
2.2 Peixes Amazônicos

O bioma aquático dispõe de uma enorme variedade de peixes, tal riqueza poderia ser explicada pela dimensão da bacia, características distintas dos rios que a compõe e seu dinamismo. Os peixes pertencentes às ordens dos Characiformes e Siluriformes (bagres) representam a maior parte com 1200 e 1000 respectivamente de espécies amazônicas. O total de espécies chega a 2257, onde 1248 dessas são endêmicas da região amazônica, isto é, constituem cerca de 15 % da ictiofauna de água doce do mundo e cerca de 80% da ictiofauna brasileira (VAL, SILVA & ALMEIDA-VAL, 1998; OBERDORFF et al., 2019).

Peixes nativos como o jaraqui (*Semaprochilodus* sp.), curimatã (*Prochilodus nigricans*), matrinxã (*Brycon* sp.), pirarucu (*Arapaima gigas*) e

tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Figura 2) são de grande importância para a região, se destacando pelo seu valor de mercado devido seu peso, tamanho, sabor ou abundância (ARIDE, ROUBACH & VAL, 2004). O pirarucu por exemplo, pertencente a ordem dos Osteoglossiformes, pode alcançar 3 metros de comprimento e pesar próximo dos 250 kg, sendo considerado um peixe gigante da Amazônia. Pode ainda ser conhecido como “bacalhau brasileiro” por possuir um filé com ótima aceitação no mercado. É um peixe capaz de suportar baixa disponibilidade de oxigênio devido sua respiração aérea, além de sua alta taxa de crescimento, no entanto, possui uma latência de resposta fisiológica frente a um ambiente de estresse (BRANDÃO, GOMES & CHAGAS, 2006; SAINT-PAUL, 1986).

Figura 2. Ilustração dos peixes a. curimatã, b. tambaqui, c. matrinxã, d. jaraqui, e. pirarucu.



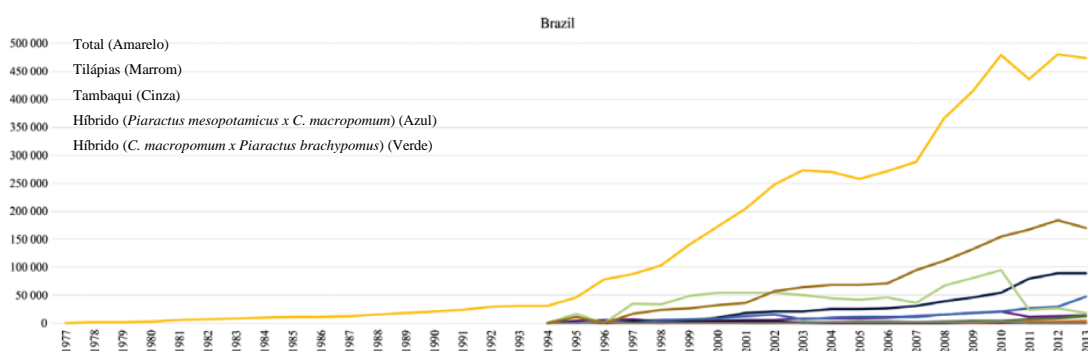
Fonte: adaptado de Saint-Paul (1986).

Os peixes são fontes alimentícias de extrema importância na Amazônia para muitas comunidades ribeirinhas que se utilizam da pesca de subsistência para consumo próprio. Por outro lado, a prática da pesca comercial se utiliza da captura do pescado para ser destinado ao comércio com finalidade de obtenção de renda por parte dos pescadores, esse pescado capturado pode ser destinado ao mercado local ou ser destinado aos entrepostos de pescado para seu beneficiamento e exportação, incrementando a economia da região (FREITAS & RIVAS, 2006).

Além do extrativismo, no mercado global a piscicultura possui papel importante na produção de pescado na América Latina. Na última década, os

principais países que se destacaram na produção total do continente foram Peru pelo extrativismo, Chile pela salmonicultura e o Brasil por sua aquicultura continental. Esse último conquistando interesse pela diversidade e potencial de peixes nativos especialmente com o tambaqui e seus híbridos (*Piaractus mesopotamicus* x *C. macropomum*) e (*C. macropomum* x *Piaractus brachypomus*) que vem contribuindo cada vez mais sobre a produção da piscicultura nacional atrás apenas das tilápias conforme a Figura 3 (VALLADÃO, GALLANI & PILARSKI, 2018).

Figura 3. Dados de produção histórica de peixes de piscicultura no Brasil de 1977 até 2013.



Fonte: adaptado de Valladão, Gallani & Pilarski (2018).

A destinação dessa produção vai para além do peixe fresco, mas também seus subprodutos como cabeças, caudas e bexigas natatórias que vem crescendo e alcançaram o número de mais de 700 toneladas desses subprodutos de peixes exportados no ano de 2020, onde quase sua totalidade é destinada ao mercado Chines (JIMENEZ et al., 2021).

2.2.1 *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

O tambaqui é um teleósteo pertencente a ordem dos Characiformes, a subfamília Serrasalminae dentro da família Characidae, com formato romboidal é considerado o segundo maior peixe de escama da América latina, chegando a alcançar 90 cm de comprimento e a pesar 30 kg (SANTOS et al., 2013). É detentor de uma combinação específica de dentes molariformes capaz de esmagar castanhas e sementes de frutos, sendo uma espécie onívora que

possui hábito alimentar variado conforme a sazonalidade do regime de águas, que pode ser associado a frutos de espécies vegetais de áreas alagadas em regime de cheias, e em regime de seca principalmente zooplâncton. As principais espécies de frutos a jauari (*Astrocaryum jauari*) e a seringa-barriguda (*Hevea spruceana*) são as de maior prevalência no consumo dos tambaquis que chegam a exercer uma pressão de 220 kg/cm² para o inteiro trituramento do fruto, quando não, são ingeridos inteiros e o peixe atua como agente de dispersão a longa distância (DA SILVA; PEREIRA-FILHO & DE OLIVEIRA-PEREIRA, 2000).

Conta com uma fisiologia robusta, resistindo a condições de ambientes aquáticos de hipóxia e alta acidez, é capaz de suportar águas com pH 4 sem grandes impactos sobre parâmetros de excreção de amônia, fluxos ácido-base, status ácido-base interno, gases sanguíneos e indicadores de estresse plasmático como cortisol, glicose, lactato (WOOD et al., 2018).

Dentre algumas características importantes possui alta taxa de crescimento em função de sua boa conversão alimentar especialmente com a quantidade e tipo de alimentação satisfatória, é resistente a doenças com densidade relativamente baixa de parasitos. Além da boa adaptabilidade a variações ambientais apresentando algumas modificações fisiológicas em função das mudanças do seu micro-habitat como disponibilidade de oxigênio, pH da água, fonte nutriente, tornando exitoso e com alta produtividade seu manejo em ambientes controlados (CLARO-JR et al., 2004; MEROLA & PAGÁN-FONT, 1988; CHAGAS et al., 2007).

O sistema de cultivo intensivo (canal de igarapé) e semi-intensivo (viveiro) expõe certas peculiaridades da espécie, que possui boa adaptação a ecossistemas lênticos, permanecendo em áreas alagadas de várzea quando na fase juvenil, onde cresce e se alimenta de zooplâncton, frutas e sementes. Na fase adulta faz a migração reprodutiva e trófica para o canal principal do rio. Em sistema semi-intensivo alcança um maior crescimento chegando a triplicar seu peso, devido a maior disponibilidade de fontes alimentares naturais, pois se utiliza de seu eficiente aparelho filtrador que o permite capturar zooplâncton presentes nas águas. No sistema intensivo tem maior gasto energético afetando seu percentual de gordura (ARBELÁEZ-ROJAS, FRACALOSI & FIM, 2002; SANTOS et al., 2013).

O tambaqui é uma das espécies mais populares e consumidas da Região Amazônica, e é o segundo peixe com maior produção no Brasil. E com isso, o padrão de exigência do comércio exterior para além de ganhos de escala, requer a adoção de tecnologias modernas que utilizam a avaliação de parâmetros de qualidade como segurança, frescor, atributos físicos, integridade e valor nutricional que são de grande relevância na competitividade sistêmica de cadeias produtivas globais. Nestas, os aspectos químicos se destacam pois estão diretamente relacionados com tais parâmetros, e avaliá-los é uma inerência para assegurar um padrão de qualidade exigido pelo comércio global (PEDROZA FILHO et al., 2016; JIMENEZ et al., 2021; ABABOUC, 2006; DOWLATI, DE LA GUARDIA & MOHTASEBI, 2012).

2.3 Composição química de peixes

A análise química de alimentos propõe compreender os constituintes dos alimentos para diferentes âmbitos, como avaliar qualitativa ou quantitativamente a presença de contaminantes na matriz, o seu perfil nutricional, além de também avaliar componentes relacionados a parâmetros de qualidade sensorial para o consumidor. Em peixes, avaliações químicas são um imperativo para assegurar um perfil de qualidade e segurança a ser perseguido (HAARD, 1992). Na Amazônia especialmente, o monitoramento de contaminantes tais como metais pesados como mercúrio e pesticidas como diclorodifeniltricloroetano (DDT) em regiões como a reserva Samuel na bacia amazônica são relevantes objetos de estudos (DA SILVA RABITTO et al., 2011). Por outro lado, a degradação de bases voláteis nitrogenadas como a trimetilamina, que estão associadas com o frescor do pescado, também é um importante parâmetro a ser analisado no âmbito do controle de qualidade (WU & BECHTEL, 2008).

Peixes são animais com composição química complexa, possuem água, carboidratos, lipídios, proteínas, vitaminas, minerais e compostos nitrogenados não proteicos em proporções variadas. Os principais componentes de peixe são água, proteínas e lipídios, podendo variar bastante dependendo da parte do animal (VEGUNOPAL & SHAHIDI, 1996).

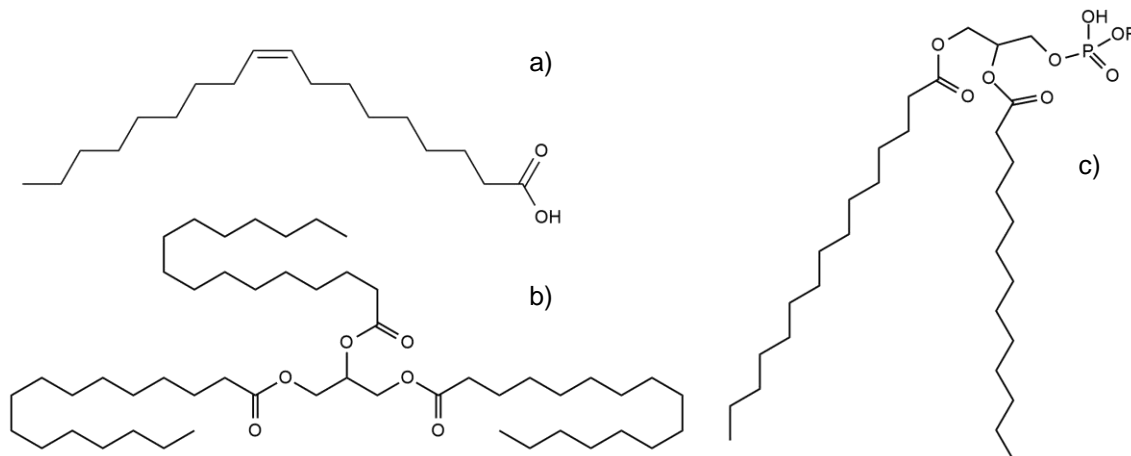
2.3.1 Lipídios

Os lipídios são estruturas orgânicas caracterizadas pela insolubilidade total ou parcial em água, sendo, portanto, solúvel em solventes orgânicos. Tal definição é capaz de englobar uma quantidade de moléculas extremamente variadas em tamanho, complexidade e funcionalidade. Podem ser classificados de forma geral em 8 grupos principais; acilas graxas, glicerolipídios, glicerofosfolipídios, esfingolipídios, esteróis, prenóis, sacarolipídios e policetídeos (FAHY et al., 2005). A classificação descrita pertence ao sistema de classificação abrangente para lipídios, em que se categoriza os lipídios em hidrofóbicos e anfipáticos. Através do sistema de banco de dados designado LIPID MAPS, estão disponíveis estruturas depositadas em cada classe, as acilas graxas, glicerolipídios, glicerofosfolipídios e esteróis são os de maior quantidade de estruturas depositadas, sendo também os mais abundantes e frequentemente encontrados no tecido muscular de peixes (FAHY et al., 2009; SARGENT & TOCHER, 2003).

As acilas graxas compõem um grupo de estruturas de diferentes tamanhos de cadeias carbônicas, geralmente lineares e com número par de carbonos, que podem conter funcionalidade cíclica ou não, heteroátomos e diferentes graus de insaturações. Dentre elas, os ácidos graxos são uma subclasse das mais relevantes, pois constituem duas outras classes, os triacilgliceróis (glicerolipídios) e os fosfolipídios (glicerofosfolipídios). Os ácidos graxos possuem uma nomenclatura padrão para representação de sua estrutura do tipo Ca:b, onde “a” é o número de carbonos do ácido graxo e “b” é o seu número de insaturação, que em caso da presença de insaturação, pode ser classificado pelo sistema ômega (n-x), em que “x” é a indicação do primeiro carbono com insaturação em relação ao carbono metílico do ácido graxo. Por outro lado, a identificação de um triacilglicerol (TAG) se dá pelo uso de uma sigla contendo 3 letras em maiúsculo do tipo XYZ referentes a identificação de cada ácido graxo e sua posição na molécula, onde as letras “X” e “Z” representam as posições *sn-1/3* e a letra “Y” representa a posição *sn-2*. A figura 4, ilustra a estrutura do ácido graxo do tipo C18:1n-9, do triacilglicerol PPP que possui 3 unidades de ácidos palmíticos ligados em uma molécula de glicerol, e um fosfolipídio, contendo duas unidades de ácidos graxos ligados a uma unidade de

glicerol, e em uma de suas extremidades (*sn*-1/3) contendo um grupo fosfato que poderá estar ligado ou não a um grupo radical (R) conferidor de polaridade a estrutura como a colina, inositol, etanolamina ou serina (FAHY et al., 2005; SARGENT & TOCHER, 2003).

Figura 4. Estruturas de ácido graxo C18:1n-9 (a) triacilglicerol PPP (b) e fosfolipídio (c).



A maior parte dos lipídios que constituem fontes alimentícias consistem nesses ésteres de ácidos graxos com glicerol, que podem ser mono, di ou triacilgliceróis, especialmente o último encontrado em maior abundância. Outros lipídios dessas fontes também são ésteres como fosfolipídios, glicolipídios e ésteres de colesterol. No entanto, alguns dos componentes não são saponificáveis tais como colesterol, esteróis vegetais, colecalciferol, carotenóides, tocóis entre outros. Estes, podem ser isolados através de hidrólise alcalina como subproduto no processo de saponificação, sendo considerados matéria insaponificável (GURR, 1999; DEWICK, 2002).

Os peixes são principalmente compostos por fosfolipídios, triacilgliceróis e esteróis, os triacilgliceróis desempenham função de reserva energética sendo aumentado no músculo em função da natureza do percentual lipídico de cada peixe. Os peixes podem ser classificados conforme o seu percentual de gordura corporal, em magros o percentual deve estar abaixo de 2%, em gordos há diferentes faixas, os de baixa que está entre 2-4%, os de média entre 4-8% e os de alta gordura corporal acima de 8% (ACKMAN, 1994).

Em peixes magros como o bacalhau (*Gadus* spp.) que possuem menos de 2% de lipídios totais, as proporções de fosfolipídios tendem a ser maiores no

filé em relação a peixes gordos, podendo chegar até a 90% da composição total de lipídios (MORADI et al., 2011). Certos tipos de peixes de água doce como os da ordem Perciformes da família Channidae, possuem o filé contendo 72% de lipídios neutros, 25% de fosfolipídios e 3% de glicolipídios, com triacilgliceróis respondendo por 92% do lipídio neutro. A fosfatidilcolina (PC) e a fosfatidiletanolamina (PE) representaram 65% e 28%, respectivamente, dos fosfolipídios (HENDERSON & TOCHER, 1987). Embora seja reportado que o tambaqui, possua um teor de gordura corporal em torno de 6% com a predominância de 90% de lipídios neutros, a sua composição apenas foi descrita em termos de perfil de ácidos graxos, tais estudos são escassos e insatisfatórios frente a importância econômica desse pescado e a variabilidade natural de peixes em funções do ambiente, necessitando uma abordagem abrangente para sua avaliação (MAIA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1992).

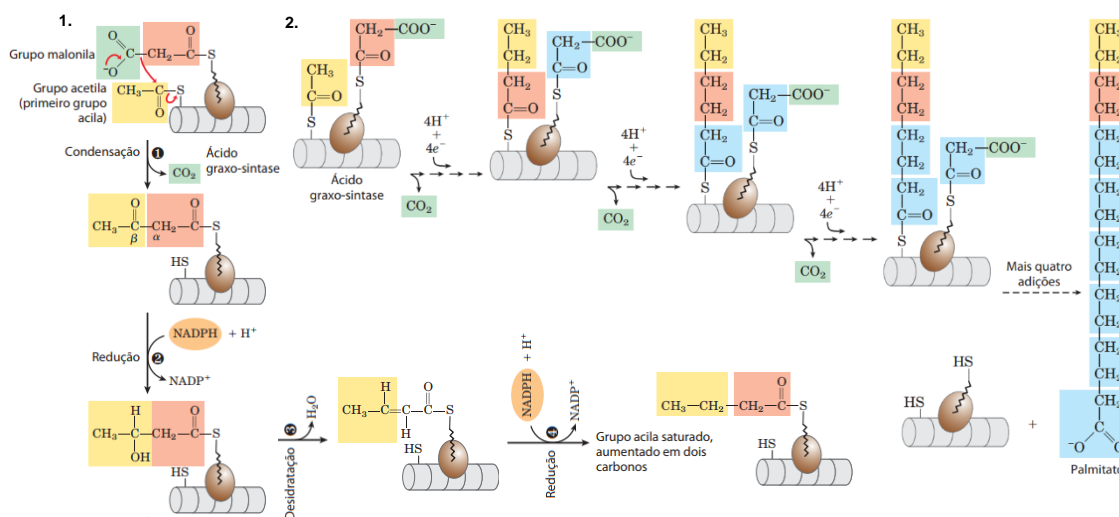
2.4 Síntese lipídica & Aspectos fisiológicos

O metabolismo de síntese lipídica para produção de ácidos graxos em peixes, assim como em outros animais ocorre a partir de precursores não lipídicos, através da carboxilação da acetil-CoA se tornando malonil-CoA através da reação de Claisen, em seguida, a mesma sofre uma sequência de condensações e reduções com unidades de acetil-CoA, que se repetem ciclicamente até a formação de uma molécula de ácido graxo (Figura 5). Após a síntese citosólica de ácidos graxos, estes são transferidos até o retículo endoplasmático, onde ocorrerá o processo de esterificação de ácidos graxos com unidades de glicerol formando assim os fosfolipídios e triacilglicerídeos (HENDERSON, 1996).

Nos peixes de água doce, os ácidos graxos encontrados podem ser de origem endógena ou dietética, e assim como os vertebrados, eles não são capazes de produzir ácidos graxos poliinsaturados, tais como os ácidos linoleico (LA) e alfa-linolênico (ALA), que são modificados através de processos mediados pelas enzimas elongases e desaturases. Para isso, a fonte de alimentação tem papel importante na biossíntese de ácidos graxos n-3 e n-6, uma vez que a partir dela o peixe possui um maquinário enzimático capaz de converter tais ácidos graxos em outros como Ácido araquidônico (ARA) além dos Ácidos

eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) que são considerados ácidos graxos essenciais, pois não são sintetizados, sendo a alimentação a única fonte possível (MONROIG, TOCHER & CASTRO, 2018; TURCHINI & FRANCIS, 2009).

Figura 5. Mecanismo biosintético de ácido graxo; (1) Processo de condensação e redução a partir de maloil-CoA (2) Ciclos até formação de palmitato.

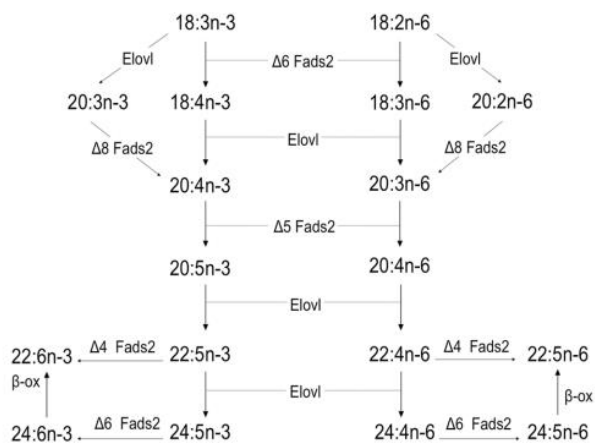


Fonte: adaptado de Nelson & Cox (2005).

Há indícios de diferenciação na prevalência da ativação dessas vias metabólicas biossintética de alongação e dessaturação em peixes de água doce e marinhos. Em que peixes de ambiente marinho possuem menor ativação dessas vias, e isso possivelmente se dá em virtude de sua alimentação em grande parte carnívora de peixes marinhos contendo fontes mais ricas em EPA e DHA, contrariamente à alimentação de peixes de água doce onde a alimentação é herbívora/onívora sendo estas mais ricas em LA e ALA (TOCHER & GHIONI, 1999). Por outro lado, estudos recentes em tambaqui demonstraram a presença de maquinário enzimático para síntese de ácidos graxos essenciais, pela presença de desaturase e elongases (Fads2, Elovl2 e Elovl5) que permitem a conversão de LA e ALA em ácidos graxos bioativos ARA, EPA e DHA. Com a expressão de elongases (Elovl4a e Elovl4b), se mostrou capaz de sintetizar ácidos graxos de 36 carbonos e polienos de 34 carbonos, que já foram reportados em cérebro e olhos de teleostes, e ainda de contribuir na síntese de DHA pela via de Sprecher (FERRAZ et al., 2019; FERRAZ et al., 2020).

Como visto, a mudança da composição lipídica de peixes ocorre naturalmente em função do ambiente a qual estão expostos. Em virtude disso, a indução da mudança do perfil lipídico através da alimentação em ambiente controlado, onde trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) sofreram alteração da razão de ácidos graxos saturados/insaturados, quando alimentadas com óleo de camelina ricos em ALA, o que favoreceu o aumento dos níveis de ácidos graxos n-3 como o EPA & DHA, ácidos graxos esses que são os principais componentes ativos do óleo de peixes (HIXSON, PARRISH & ANDERSON, 2014).

Figura 6. Vias metabólicas de conversão de ALA (18:3n-3) e LA (18:2n-6) em DHA (22:6n-3) e ARA (20:4n-6) respectivamente.



Fonte: adaptado de Oboh e colaboradores (2017).

Os ácidos graxos essenciais desempenham papel no controle e regulação do metabolismo celular e fisiologia animal, especialmente devido a atuação de dioxigenases sobre a oxidação de ARA e EPA, onde são produzidos hormônios autócrinos de meia vida curta e eicosanóides bioativos, que possuem funções variadas que impactam sobre processos inflamatórios, coagulação sanguínea e resposta imune (TOCHER, 2010).

Assim como em peixes, os humanos são em grande parte afetados pela composição lipídica da dieta, em dietas modernas com cereais ricos em n-6 e pobres em n-3 compondo a base da pirâmide alimentar, afetando o equilíbrio desses ácidos graxos no organismo (SIMOPOULOS, 2002). Uma dieta rica em n-3 possui efeitos no desenvolvimento neural de crianças que possuem grande demanda fisiológicas, pois mamíferos possuem grande quantidade de n-3 no

cérebro e retina (KHALILI TILAMI & SAMPELS, 2018), além de seu efeito sobre a fisiologia cardíaca, contribuindo na fluidez das membranas plasmáticas e na manutenção das funções cardíacas (ENDO & ARITA, 2016).

Figura 7. Óleo de peixe e a estrutura dos seus ácidos graxos EPA & DHA.



2.5 Análises químicas em lipídios

Houve um grande progresso nas últimas décadas na disponibilização de ferramentas para a compreensão mais abrangente de dados a respeito da composição qualitativa e/ou quantitativa de amostras biológicas incluindo peixes, devido a sua composição complexa e variável. A instrumentação analítica é uma das mais poderosas ferramentas especialmente a espectrometria de massas que possui papel central nesse contexto, que ainda pode se apresentar em sistemas hifenados, o que aumenta a abrangência da analítica possibilitando uma visão mais holística sobre a matriz investigada (JING et al., 2013).

2.5.1 Espectrometria de massas

A espectrometria de massas (MS) é uma ferramenta extremamente potente e funcional em análises lipídicas, sendo capaz de fornecer informações estruturais relevantes para diferentes classes de lipídios, nesse âmbito é possível utilizar diferentes fontes como a de ionização por elétrons (EI), onde é possível avaliar ésteres metílicos derivados de ácidos graxos oriundos de diferentes fontes, em que nesse caso, é mais comumente encontrado acoplado ao cromatógrafo gasoso. Importante ainda é o uso de fontes de ionização

branda, onde se destacam APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*) e ESI (*Electrospray ionization*), em que se torna possível a análise de lipídios de diferentes naturezas como triacilglicerídeos e fosfolipídios (MURPHY, FIEDLER & HEVKO, 2001). Embora também sejam fontes utilizadas acopladas a cromatógrafos líquidos, há em grande parte também o uso da infusão direta (DIMS), que possuem uma grande vantagem que é a rápida e econômica análise do perfil lipídico onde é possível avaliar diferentes classes presentes nas amostras (SHON et al., 2015; LISA et al., 2017).

As fontes de ionização branda descritas anteriormente são designadas como API (*Atmospheric Presssure Ionization*) e representaram um grande avanço, pois aumentaram a abrangência da espectrometria de massas para análises de biomoléculas, uma vez que se tornou possível a ionização multicomponente de traços com alta sensibilidade em amostras ambientais a nível subpicométrico (CARROLL et al., 1981).

Em análises lipídicas ambas as fontes são aplicadas com êxito, mas particularmente a ESI é uma fonte largamente aplicada em biomoléculas, possui grande abrangência por ser capaz de ionizar moléculas de baixa a alta massa molecular, apesar de ser uma fonte mais proeminente eficaz na ionização de compostos de alta polaridade, sua utilização abrangente em análises lipídicas se justifica pelo uso de sais na detecção de adutos em análises de lipídios neutros. Em grande parte, são sais de sódio, lítio e amônio que são frequentemente empregados no uso da técnica (HSU & TURK, 1999). Por outro lado, a APCI não é tão difundida em biomoléculas por suas limitações relativas a compostos de alta polaridade e massa molecular, entretanto, em análises lipídicas possui grande valor, uma vez que diferente de ESI não requer uso de sais como aditivos para detecção dos íons, gerando boas respostas na análise, além de gerar fragmentação de fonte que contribui na caracterização em análises preliminares (BYRDWELL, 2001).

A caracterização estrutural de triacilgliceróis por MS é de grande relevância, pois com a fragmentação (MS/MS) é possível avaliar a presença de íons de diacilgliceróis $[M - RCO_2]^+$ no espectro, com perdas neutras associadas a ácidos graxos, onde a propensão dos grupos de saída são derivados da posição (*sn-1/3*) que sofrem eliminação mais facilmente que os ácidos graxos presentes na posição (*sn-2*), sendo possível dessa maneira, a obtenção de

dados com implicações regioseletivas na aplicação da técnica (MARZILLI et al., 2003).

2.5.2 Sistemas hifenados

Até então a espectrometria se mostrou uma ferramenta poderosa em análises lipídicas, no entanto, existem algumas limitações da técnica no modo DIMS como a supressão iônica em decorrência de um efeito de matriz no processo de ionização em amostras biológicas de alta complexidade. Especialmente quando não há tratamento prévio acaba sendo uma impertinência grave para o processamento e interpretação dos dados, o que torna tal abordagem analítica por si só insatisfatória. Com isso, os sistemas hifenados se apresentam como a solução potencial a tal problemática, uma vez que hifenado (acoplado) com sistemas cromatográficos, a espectrometria de massas obtém incrementos de resolução, sensibilidade e seletividade (MAURER, 2006; LIN et al., 2010).

A cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), são técnicas que quando acopladas com o espectrômetro de massas formam sistemas hifenados capazes de analisar com eficiência amostras de alto grau de complexidade. Em um sistema GC-MS a principal aplicação é na separação de ésteres metílicos na análise do perfil de ácidos graxos, em que é possível separar e quantificar através do modo seletivo de íons, a presença de componentes como EPA e DHA em óleo de peixe (YI et al., 2014). Por outro lado, em um sistema (HPLC-MS) há sistemas de eluição variados na separação cromatográfica, onde é possível ser adaptado conforme a classe avaliada. Na análise de colesterol e seus produtos de oxidação em tecidos de peixes por exemplo, é possível um método operando em fase normal de eluição, com boa eficiência cromatográfica (SALDANHA et al., 2006;). Além das possibilidades descritas, uma característica marcante de tais sistemas hifenados é a separação de isômeros, como os de triacilgliceróis analisados em fase reversa não aquosa (NARP) presentes em amostra lipídica, que não seria evidenciado na análise DIMS sem uma separação prévia (SEGALL et al., 2005).

Uma abordagem muito empregada modernamente é a lipidômica, que é um conceito novo em construção advindo das ciências “ômicas”, voltado à

análise lipídica que possui uma diversidade de aplicações e âmbitos, com abordagens analíticas das mais variadas. Dentre elas, a DIMS é utilizada como lipidômica “*shotgun*”, apesar disso, em grande parte as abordagens lipidômicas se utilizam sistemas hifenados, especialmente HPLC-MS operando frequentemente em fase reversa de eluição (LI et al., 2011). Embora a instrumentação analítica possua papel central em aplicações modernas, o seu avanço com o passar dos anos, possibilitou uma visão mais holística sobre a química de alimentos com diversidade de aplicações. O estabelecimento do procedimento de preparo de amostra possui fundamental importância, e é um ponto onde ainda carece de procedimentos abrangentes que garantam a fiel reprodução da composição lipídica da matriz nos dados obtidos (WU et al., 2020).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Contribuir com o conhecimento químico acerca da composição lipídica do tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de uma abordagem analítica abrangente.

3.2 Objetivos Específicos

Produzir extratos brutos de tambaquis de ambientes selvagem e de manejo, utilizando método capaz de extrair as classes lipídicas presentes no peixe.

Realizar fracionamento do extrato bruto utilizando extração em fase sólida (SPE).

Avaliar o perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) e quantificá-los pelas análises de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS).

Avaliar o perfil lipídico por infusão direta no espectrômetro de massas (DIMS).

Avaliar a composição lipídica através de análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC-MS).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Técnicas cromatográficas & espectrométricas

4.1.1 Extração em fase sólida (SPE)

Empregou-se pipeta pasteur de vidro ponta curta como coluna suporte, de 15 cm de comprimento e de 2 ml de capacidade volumétrica, que foi empacotada com fase estacionaria composta por sílica gel 60 (Merck®) com granulometria entre 70 e 230 mesh (63 e 200 µm).

4.1.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

A análise por Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foi realizada no laboratório de cromatografia gasosa (LABCG) da Central Analítica (UFAM), utilizando um cromatógrafo modelo TRACE GC ULTRA acoplado a um espectrômetro de massas, modelo ISQ (Thermo Scientific), e equipado com injetor automático modelo TriPlus RSH.

4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS)

A análise por Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (HPLC-MS) foi realizada no laboratório LABCEM da Central Analítica (UFAM), utilizando o cromatógrafo Acella® (Thermo Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas (TSQ Quantum Access - Thermo Scientific) equipado com fonte APCI.

4.1.4 Infusão direta no espectrômetro de massas (DIMS)

A análise de Infusão direta no espectrômetro de massas foi realizad no laboratório LABCEM da central analítica (UFAM), empregando um espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo (QqQ) modelo TSQ Quantum Access

(Thermo Scientific, MA, EUA) equipado com as fontes de ionização química a pressão atmosférica (APCI) e Ionização por electrospray (ESI).

4.2 Solventes & Reagentes

Metanol (MeOH), Clorofórmio (CHCl₃), Isopropanol (iPrOH), Reagente álcool, ácido acético glacial todos de grau HPLC (Tedia, OH, EUA). Água ultrapura, obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, MA, EUA). Hidróxido de amônio (NH₄OH) (28-30%), Ácido clorídrico (HCl) (36,5-38%) e Hidróxido de Sódio (NaOH) (97,0% de pureza) todos de grau PA da Química Moderna. Trimetilsilildiazometano (TMSD) (≥98% pureza) e o Mix de FAMES 37 componentes SUPELCO foram comprados da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

4.3 Coleta das amostras

As amostras de tambaqui destinados ao estudo foram oriundos de extrativismo animal (peixe selvagem) que foi capturado no município de Tefé-Am, e o de piscicultura (peixe de manejo) foi capturado em barragem de manejo na capital Porto Velho-Ro. Ambos obtidos na feira municipal Manaus Moderna localizada na região central de Manaus. De dimensões iguais e pesando 3 kg, que é o peso médio dos tambaquis frequentemente vendidos na cidade conforme figura 8. Foram transportados a frio dentro de caixa térmica adequada até o laboratório LABCEM onde foi feito a evisceração e o fileteamento do pescado para a destinação ao preparo de amostra.

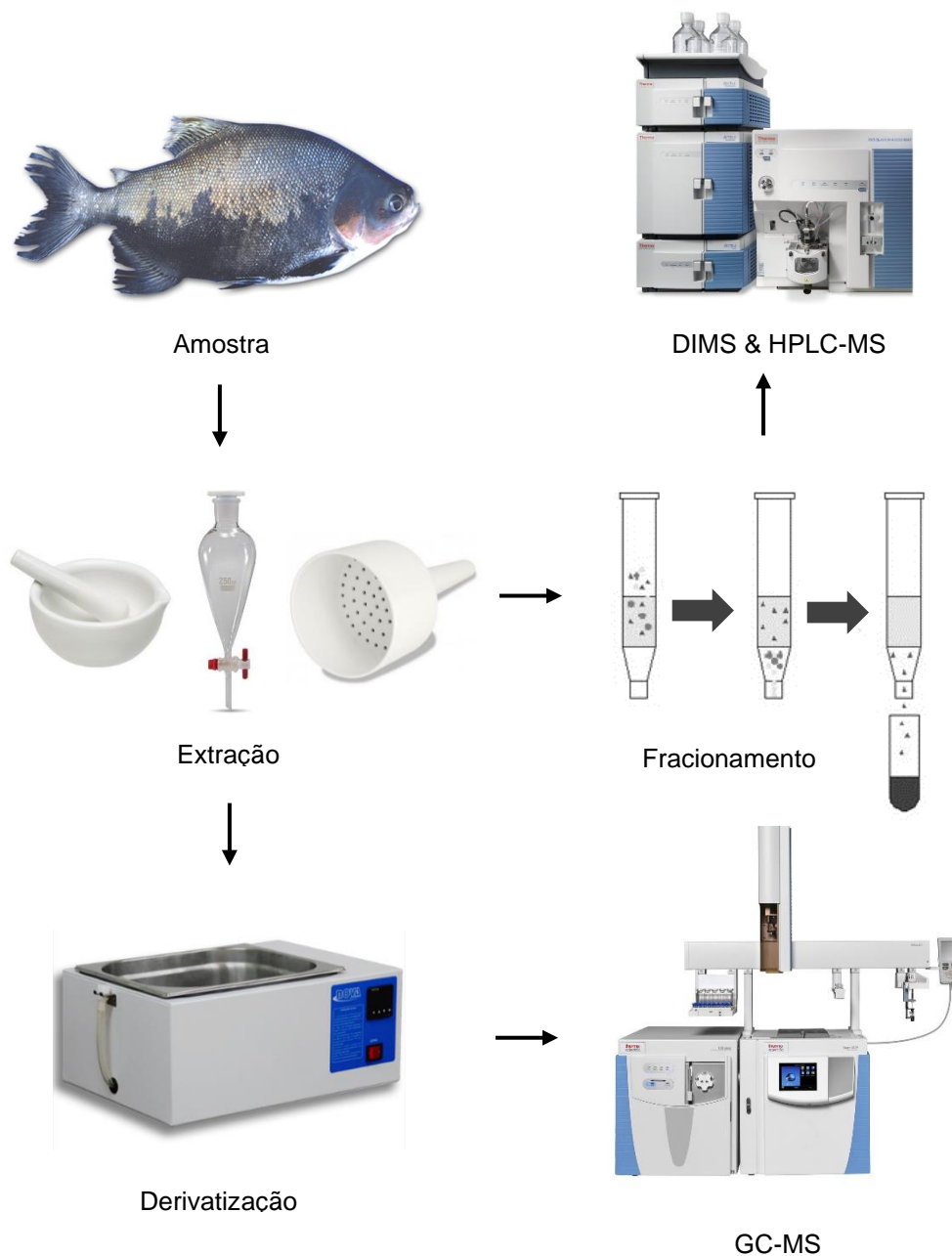
Figura 8. Amostras de tambaqui selvagem (acima) e de manejo (abaixo)



4.4 Protocolo de preparo de amostra

O preparo de amostra foi dividido em três partes; extração, derivatização e o fracionamento. Após a finalização da extração, apenas a amostra de peixe de manejo seguiu para o fracionamento, enquanto que para o procedimento de derivatização ambas foram encaminhadas. Seguindo posteriormente para as etapas analíticas devidas conforme disposto na figura 9 que ilustra o procedimento de preparo de amostra até sua análise.

Figura 9. Protocolo geral de preparo de amostra



4.4.1 Extração

O processo de preparo de extrato foi realizado a partir de 5g de filé do peixe, onde foi feito a maceração que se inicia após o esmagamento do filé com auxílio de gral e pistilo. Com o filé esmagado ele é condicionado a um funil de separação contendo 30 ml da mistura clorofórmio/metanol (1:2), sendo agitado por 2 minutos, após isso se adicionou mais 10 ml de clorofórmio e agitou-se por mais 30 segundos, e em seguida se adiciona 10 ml de água e se agita por mais 30 segundos. Ao finalizar o tempo o extrato é filtrado em papel de filtro com auxílio de funil, o filtrado é devolvido ao funil de separação que é deixado em repouso para a separação de fases e desestabilização da emulsão. Após isso, a fase clorofórmica mais densa é coletada em um frasco e seca se tornando o extrato bruto (BLIGH & DYER, 1959).

4.4.2 Derivatização

A realização da análise por GC-MS do óleo bruto de acordo com Topolewska e colaboradores (2015), consistiu em uma primeira etapa de saponificação, onde se adicionou 2 ml solução metanólica de NaOH 0,5 N em 30 mg de extrato bruto, que ficou em repouso por 30 min a 50 °C em banho maria. Após o processo, foi adicionado 1 ml de solução aquosa 6 N de HCl, e 2 ml de hexano e agitou-se. Em seguida, a fase hexânica foi transferida para um novo frasco, no qual foram adicionados 220 µL de uma solução 10% metanol em acetona. Finalmente, foram adicionados 30 µL do reagente derivatizante trimetilsilildiazometano (TMSD) 2M em hexano (Migowska et al., 2010). O procedimento foi realizado em triplicata e as amostras foram encaminhadas para análise por GC-MS.

4.4.3 Fracionamento

O extrato bruto foi fracionado através da técnica de extração em fase sólida (SPE), utilizando-se de uma pipeta pasteur de vidro empacotada com 600 mg de sílica gel 60 previamente ativada em estufa de secagem a 100 °C por 30 min. Foi solubilizado 10 mg/ml de extrato bruto em Clorofórmio/Ácido acético

(100:1) e aplicado na coluna com auxílio de pipetador manual, adicionalmente se eluiu com mais 18 ml da mesma solução totalizando 20 ml coletados em que deu origem a fração de lipídios neutros. Após coletadas, as frações foram secas com auxílio de nitrogênio gasoso e destinadas as análises posteriores (HAMILTON & COMAI, 1984).

4.5 Análise de perfil de FAMES por GC-MS

Foi utilizada uma coluna DB-WAX (Agilent) com dimensões de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, e gás hélio como gás de arraste com uma vazão constante de 1,0 mL/min e um split de 1:50. As temperaturas do injetor e linha de transferência foram de 250 °C, enquanto a temperatura da fonte de íons foi de 220 °C. O forno foi programado com temperatura inicial de 60 °C por 5 minutos, seguido por uma taxa gradiente de 2,4 °C/min de 60 até 240 °C em 80 minutos de análise. O espectrômetro de massas foi programado em modo de varredura fullscan (40-400 *m/z*). Os ésteres metílicos dos respectivos ácido graxo foram identificados a partir da comparação de seus espectros de massas com base na biblioteca NIST.

4.6 Análise do perfil de lipídios neutros por DIMS

Foi preparada uma solução estoque da fração neutra em iPrOH na concentração de 1 mg/ml, se dilui-se até uma concentração aproximada de 10 ppm para a aplicação por infusão direta em um espectrômetro de massas equipado com a fonte APCI no modo positivo e negativo, e adicionalmente operando em ESI em modo positivo com o emprego de adutos de amônio aditivando-se a amostra a ser injetada 1 µL de hidróxido de amônio. Os parâmetros analíticos utilizados foram os seguintes: *discharge current*: 5 µA; *vaporizer temperature*: 320 °C; *capillary temperature*: 220 °C; *sheath gas*: 30 psi; *aux gas*: 10 arb, *mass range, m/z* 100-1000. Os espectros de MS/MS foram obtidos através de dissociação induzida por colisão (CID) utilizando-se argônio como gás de colisão e energia de colisão de 35 eV.

4.7 Avaliação de lipídios neutros por HPLC-MS

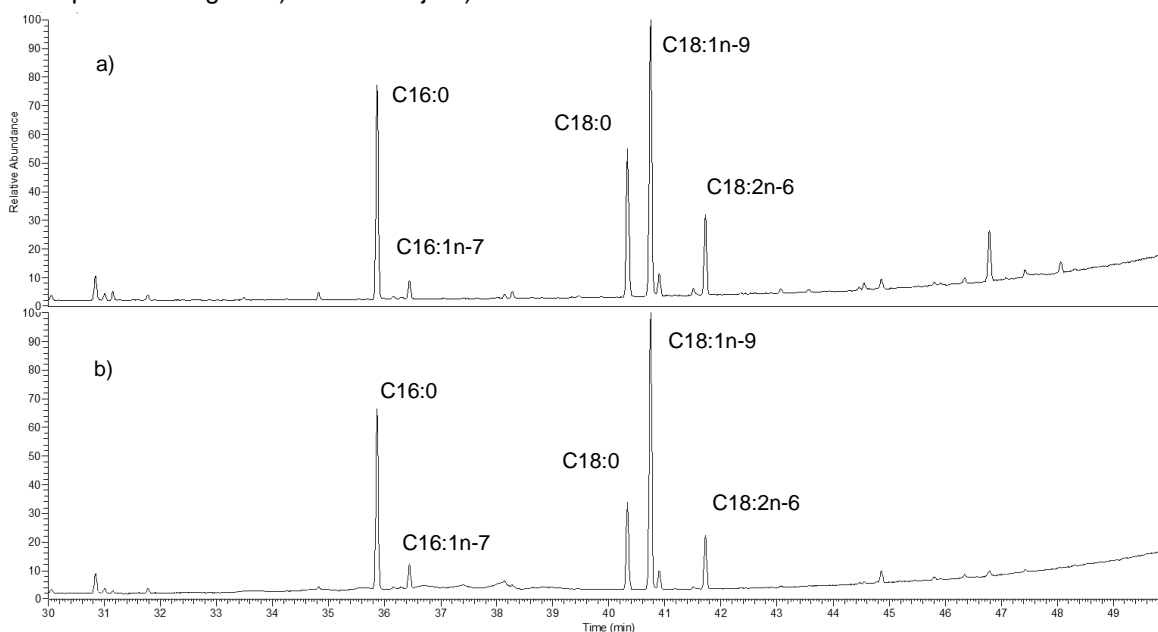
Foi injetado um volume de 10 μ L da amostra de uma solução estoque de 2 mg/mL, em uma coluna Phenomenex Luna C₁₈ (2) (5 μ m, 150 mm x 4,6 mm id) (Torrance, CA, EUA), operando em sistemas de eluição em fase reversa não aquosa, com 3 canais de solventes; MeOH (A) e EtOH (B) iPrOH (C) utilizados como fases móveis, empregando um gradiente de eluição: 0-35 min, 20-0% (A), 80-0% (B) 0-100% (C); 35-45 min 100% (C) a uma vazão de 1 mL/min. O espectrômetro de massas foi equipado com fonte APCI modo positivo e os parâmetros analíticos utilizados foram os seguintes: *discharge current*: 5 μ A; *vaporizer temperature*: 350 °C; *capillary temperature*: 270 °C; *sheath gas*: 35 psi; *aux gas*: 15 arb, *mass range*, *m/z* 400-1000 (BARRON & SANTA-MARIA, 1987).

5 RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 Análise do perfil de FAMES por GC-MS

Na análise por GC-MS foram obtidos os cromatogramas ilustrados na Figura 10, em que se identificou a presença de 14 ésteres metílicos associados a ácidos graxos, dos quais compõem principalmente os ácidos palmitoleico (C16:1n-7), palmítico (C16:0), linoleico (C18:2n-6), oleico (C18:1n-9) e esteárico (C18:0) que totalizam 85% da composição do óleo bruto do tambaqui selvagem e cerca de 93% da composição do tambaqui de manejo conforme os dados da tabela 2.

Figura 10. Cromatograma entre 30 e 50 minutos do perfil de ésteres metílicos de ácidos graxos de peixe selvagem a) e de manejo b).



Considerando os ácidos graxos presentes em maior abundância encontrados em ambos os peixes, foi possível realizar a curva de calibração para a quantificação de 6 dos principais ácidos graxos conforme os dados dispostos na Tabela 1. As principais diferenciações percentuais encontradas entre o peixe de manejo e o selvagem foram principalmente na proporção de ácido oleico que está menor no tambaqui selvagem. Em contrapartida, possui percentualmente mais ácido graxo n-6 ARA e a presença acima de 1% dos ácidos graxos n-3 EPA

e DHA. Em termos de concentração absoluta, pode-se notar uma concentração de ácidos graxos totais muito maior para o peixe de manejo com 38,93 mg/g de filé contra 1,10 mg/g de filé do peixe selvagem, sugerindo que o peixe de manejo é muito mais gordo que o peixe selvagem.

Tabela 1. Parâmetros da curva de calibração de padrões usados na quantificação.

FAME	t _R (min)	Faixa (mg/ml)	Coefficiente Angular	Coefficiente Linear	r ²
C16:0	35,87	0,0046875-0,6	6,54E+09	6,14E+06	0,9998
C16:1n-7	36,45	0,0015625-0,2	9,04E+09	-1,87E+07	0,9987
C18:0	40,34	0,003125-0,4	1,12E+10	-4,74E+07	0,9979
C18:1n-9	40,75	0,0046875-0,6	9,66E+09	-7,17E+07	0,9976
C18:2n-6	41,72	0,00625-0,2	2,62E+09	-1,56E+07	0,9880
C20:1n-9	44,86	0,00625-0,2	1,09E+10	-8,14E+07	0,9917

Em estudos de Stone e colaboradores (2011) com manejo de trutas arco-íris (*O. mykiss*) submetidas a rações enriquecidas com diferentes óleos, também se encontrou valores de ácidos graxos totais de 40 mg/g de filé a partir de 6 semanas para todos os tratamentos, cujo tratamento com óleo de pollock contendo 10,9 mg/g de filé para C16:0 e 13,4 mg/g de filé para C18:1n-9, se assemelharam com valores obtidos no presente estudo com os dois ácidos graxos principais. Ainda, segundo o estudo, foi o tratamento que conseguiu aumentar significativamente o teor de gorduras no filé, assim como modificar o perfil de ácidos graxos de trutas, alcançando maiores teores de ácidos graxos n-3, sugerindo a influência da alimentação sobre a composição lipídica do peixe.

O perfil de ácidos graxos encontrados no presente estudo corrobora em partes com dados reportados na literatura por Maia & Rodriguez-Amaya (1992) para tambaqui, onde, o perfil de componentes majoritários encontrados foram os ácidos palmítico (28,8%), palmitoleico (6,3%), oleico (40%), linoleico (8,9%) e esteárico (9,8%). Por outro lado, a presença de uma razão de ácidos graxos n-3/n-6 abaixo de 0,1 indica uma composição de poliinsaturados predominantes do grupo n-6 assim como encontrados para outros peixes amazônicos como Pacu (*Colossoma mitrei*) 0,23 e Piapara (*Pseudoplatystoma corruscans*) 0,51. A composição dos ácidos graxos desses peixes é de 21 e 23% (C16:0), 40 e 32% (C18:1n-9), 6 e 2% (C18:2n-6) respectivamente, apontando para semelhanças

no padrão de composição de tais ácidos graxos entre esses peixes amazônicos (ANDRADE et al., 1995).

Tabela 2. Perfil de FAMES presentes em tambaquis de manejo e selvagens.

FAMES	Peixe de manejo		Peixe selvagem	
	%área	mg/g de filé	%área	mg/g de filé
C14:0	0,68±0,04	-	0,72±0,02	
C16:0	26,72±0,01	11,46±0,52	25,21±0,10	0,32±0,02
C16:1n-7	3,43±0,03	1,19±0,04	1,96±0,02	0,02±0,00
C17:0	-	-	0,41±0,01	
C18:0	13,32±0,17	3,62±0,18	17,00±0,03	0,13±0,01
C18:1n-9	41,76±0,29	12,64±0,47	31,59±0,05	0,28±0,01
C18:1n-7	2,52±0,03	-	2,29±0,02	
C18:2n-6	8,13±0,04	9,10±0,44	9,29±0,06	0,30±0,02
C20:1n-9	1,73±0,15	0,90±0,05	1,04±0,07	0,02±0,00
C20:2n-6	0,45±0,02	-	0,38±0,03	-
C20:3n-6	0,49±0,02	-	0,63±0,09	-
C20:4n-6	0,73±0,01	-	6,20±0,12	-
C20:5n-3	-	-	1,38±0,06	-
C22:6n-3	-	-	1,86±0,05	-
TOTAL	100%	38,93	100%	1,10

Em estudo realizado com tambaquis de ambientes selvagens e manejados, foi encontrado nos manejados a presença de maiores diferenciações no percentual dos seus ácidos graxos majoritários tais como palmítico e linoleico no músculo, em que os manejados possuíram quantidades próximas ao encontrado no presente estudo. Além de sugerir a maior prevalência de ácidos graxos polinsaturados em peixe selvagens, evidenciam as maiores concentrações de dos ácidos graxos ARA, EPA e DHA maiores nos selvagens de períodos de seca. Esse dado evidencia a influência do ambiente como a alimentação e origem do perfil de ácidos graxos, uma vez que os tambaquis em períodos de seca ficam em regiões mais próximas dos leitos dos rios, sendo necessário se alimentar de zooplâncton alterando sua fonte lipídica (ALMEIDA; VISENTAINER & FRANCO, 2008).

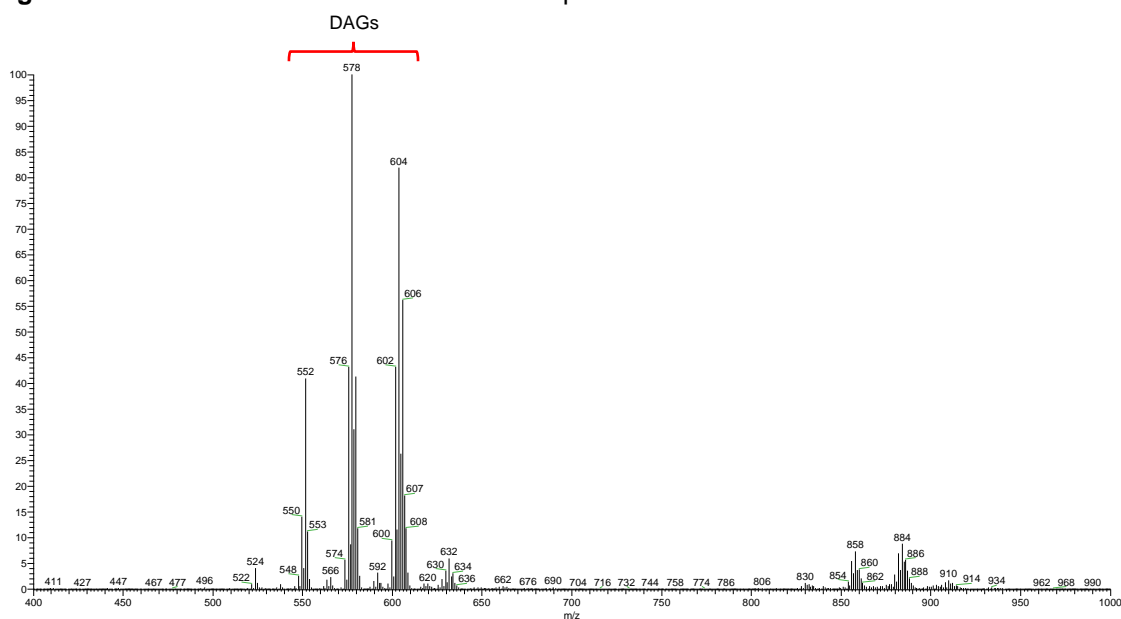
Considerando o impacto das modificações ambientais tais como a sazonalidade do regime de águas e a alimentação sobre o perfil de ácidos graxos

encontrado em tabaqui, e comparando o perfil de óleos de frutos de palmeiras amazônicas do gênero *Astrocaryum* sp., nota-se que possui predominância dos mesmos 4 ácidos graxos principais aqui reportados especialmente palmítico e oleico em concentrações mais acentuadas, o que sugere que tais palmeiras do gênero como *Astrocaryum jauari* podem contribuir fortemente no perfil de ácidos graxos de peixes selvagens, uma vez que são uma das principais fontes energéticas do tabaqui, podendo ser um parâmetro no controle de qualidade ou até mesmo na rastreabilidade da origem do peixe (RODRIGUES; DARNET & SILVA, 2010; LINHARES et al., 2017).

5.2 Análise do perfil de lipídios neutros por DIMS

Na análise por DIMS com o emprego da fonte APCI no modo positivo foram encontrados íons pertencentes a duas faixas principais, a faixa de m/z 800-1000 correspondentes a faixa de triacilglicerídeos (TAGs), e na faixa de m/z 500-650 que corresponde a faixa de diacilglicerídeos (DAGs) que apresentou íons com maior intensidade conforme a figura 11.

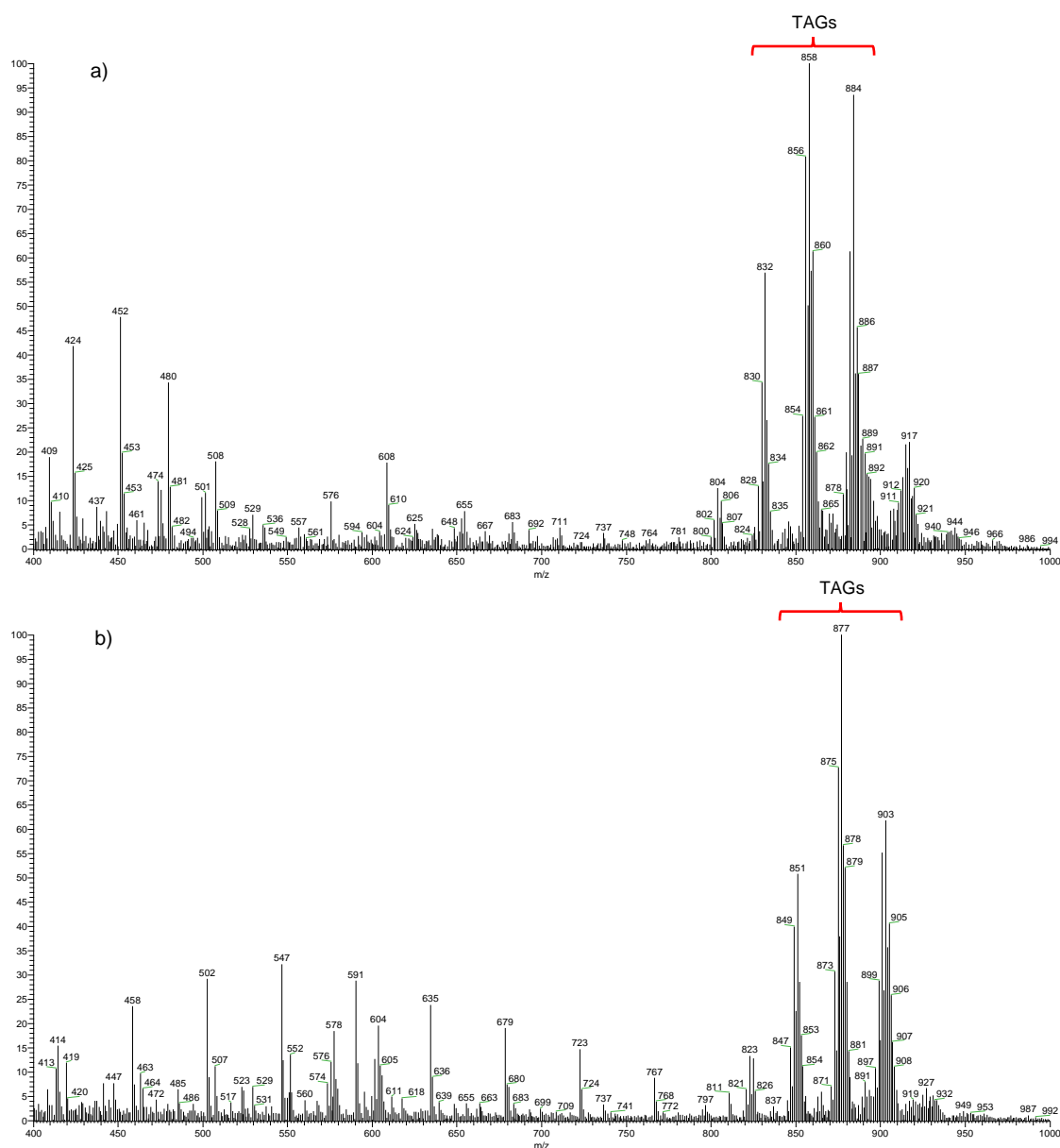
Figura 11. Análise DIMS com fonte APCI modo positivo.



Por outro lado, quando se avalia o modo negativo da fonte APCI pode se notar íons mais intensos na faixa de TAGs conforme ilustrado na figura 12, assim

como na análise com adutos de amônio empregando a fonte ESI, que foi possível avaliar a prevalência de íons relativos à faixa de triacilglicerídeos com maior intensidade na mesma figura, diferentemente dos íons encontrados no modo positivo APCI, onde os de maior intensidade foram respectivamente os de diacilglicerídeos indicando maior fragmentação de fonte como esperado.

Figura 12. Análise DIMS com fonte APCI modo negativo (a) e ESI modo positivo (b).



Na amostra é possível notar a presença de três grupos principais de íons moleculares, que possuem diferença de massa de 26 Da, indicando diferença de

grau de insaturação e tamanho de cadeia carbônica entre os principais triacilgliceróis presentes na fração neutra, onde tal característica espectral pode ser avaliado em perfil de óleos vegetais por DIMS com composição majoritária por ácidos graxos saturados presentes em óleo de coco, em que a diferença encontrada é de unidades de 28 Da havendo diferenciação apenas no tamanho da cadeia carbônica (PIZZO et al., 2019a). Tais aspectos são relevantes para além da avaliação de perfil lipídico característico na diferenciação entre triacilgliceróis de diferentes naturezas, mas também para avaliação de autenticidade de óleo frente a contaminantes, assim como no rápido monitoramento na quantificação desses componentes em óleo de algas (FASCIOTTI et al., 2019; PIZZO et al., 2019b).

5.3 Avaliação de lipídios neutros por HPLC-MS & perfil de fragmentação por DIMS

Uma vez obtidos os perfis de lipídios neutros via DIMS, e conhecendo a predominância de TAGs na fração neutra, foi realizada a análise cromatográfica operando em fase reversa não aquosa (NARP) para se obter os íons principais com menor efeito de matriz possível e assim inicializar a fragmentação. O cromatograma obtido é representado na figura 13, onde foram obtidos íons relacionados a diferentes triacilgliceróis dispostos em 5 picos principais dispostos na tabela 2, onde os picos 2 e 3 representam a maior parte da área total dos picos. Através do perfil de fragmentação foi possível associar os TAGs aos ácidos graxos que os compõe.

O pico 2 é o que possui maior área com dois íons majoritários, os íons de m/z 882 e 856 $[M+H]^+$, em que na fragmentação do íon de m/z 882 há geração das espécies iônicas $[M-RCO_2]^+$ em m/z 600 e 602 com perdas neutras associadas de 282 e 280 Da referentes a resíduos dos ácidos oleico e linoleico respectivamente. E na fragmentação do íon de m/z 856, há a geração das espécies iônicas $[M-RCO_2]^+$ em m/z 578, 600 e 574 com perda neutra associada de 278, 256 e 282 Da referentes aos resíduos de ácidos linolênico, palmítico e oleico.

Figura 13. Cromatograma entre 0-20 min com contagem de íons totais (TIC) na faixa de m/z 700-1000.

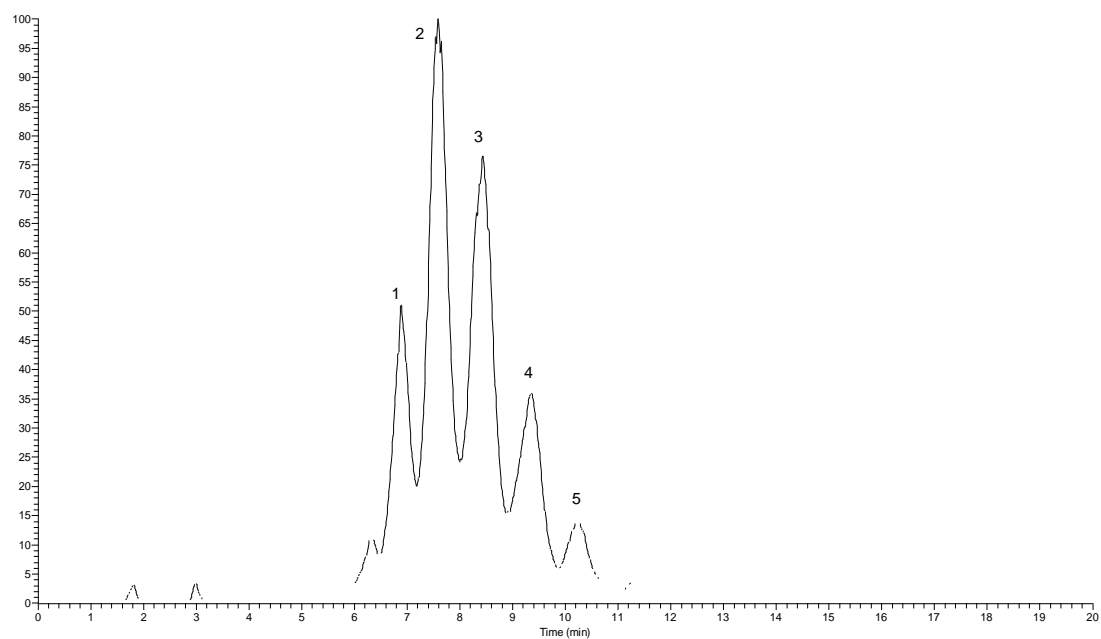
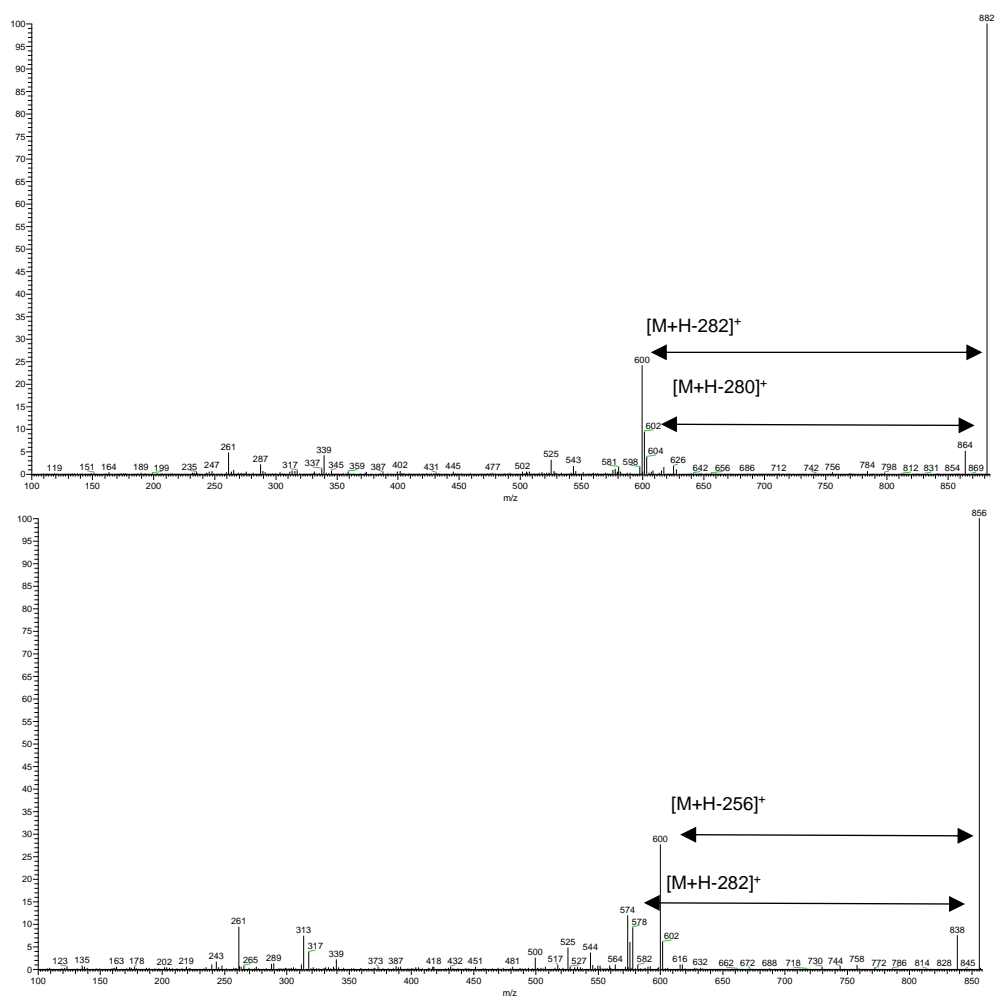


Figura 14. Espectro MS/MS em APCI dos íons de m/z 882 e 856 $[M+H]^+$



No modo negativo por outro lado os íons principais se apresentam em m/z 880 e 854 $[M-H]^-$, na fragmentação do íon de m/z 880 há a geração dos íons de m/z 281, 279 relativos a resíduos de ácidos graxos livres oleico e linoleico. Na fragmentação do íon de m/z 854 há geração de íons m/z 281, 255 respectivos aos resíduos de ácidos graxos livres oleico e palmítico respectivamente.

Similarmente, o pico 3, que é o segundo de maior área que possui os íons majoritários de m/z 884 e 858 $[M+H]^+$, ao se fragmentar o íon de m/z 884 há geração das espécies iônicas $[M-RCO_2]^+$ em m/z 602 e 604 com perdas neutras associadas de 282 e 280 Da respectivas a resíduos de ácidos oleico e linoleico respectivamente. E na fragmentação do íon de m/z 858 $[M+H]^+$ há geração das espécies iônicas $[M-RCO_2]^+$ em m/z 602, 576 e 578 com perdas neutras associadas de ácidos palmítico, oleico e linoleico respectivamente.

Em modo negativo os íons principais que se apresentam são m/z 882 e 856 $[M-H]^-$, na fragmentação de m/z 882 há geração dos íons m/z 281, 279 relativos aos resíduos de ácidos graxos livre oleico e linoleico. E na fragmentação de m/z 856, há geração dos íons de m/z 281, 256 e 279, respectivos aos resíduos de ácidos graxos livre oleico, palmítico e linoleico respectivamente.

Para os íons dos picos minoritários observou-se a mesma natureza de perdas neutras, variando apenas o tamanho do TAG e o tipo de ácido graxo envolvido com as perdas neutras no modo positivo $[M-RCO_2]^+$, e no modo negativo as espécies iônicas de ácidos graxos livre. Como observado para o pico 1 onde foi identificado o íon de m/z 806 que apresentou perda neutra de 228 Da indicando a presença de ácido mirístico, ou como o pico 4 com íon de m/z 912 que apresentou perda neutra de 310 Da sugerindo a presença de ácido gondóico.

Com isso, a proposta do mecanismo de fragmentação com migração de carga sugerida ocorre de forma geral para os triacilgliceróis, uma vez que são mais favorecidos a perda neutra de ácidos graxos na posição sn-1/3 em modo positivo e em modo negativo gerarem ácidos graxos como íons filhos conforme a figura 17.

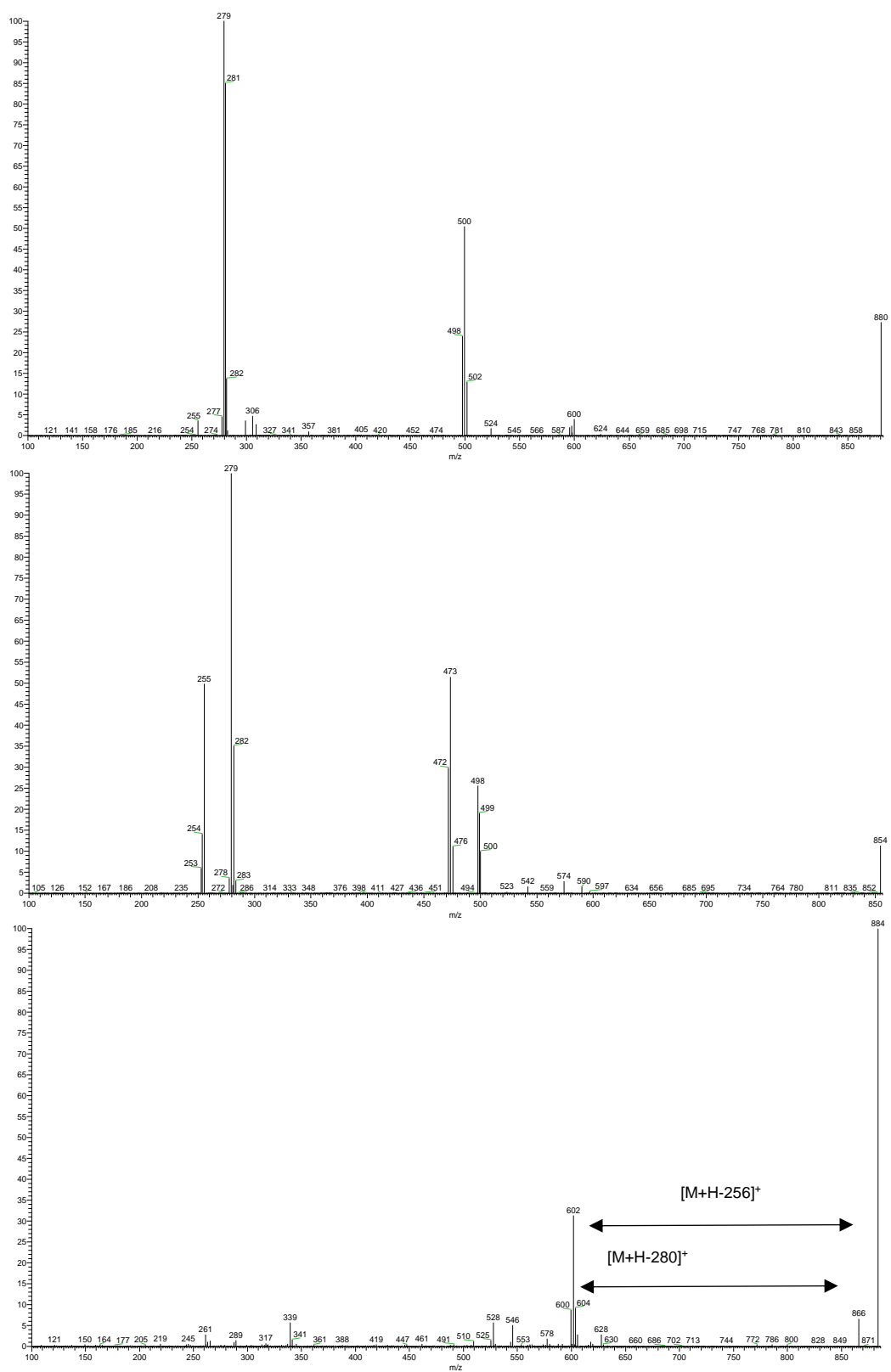
Figura 15. Espectro MS/MS em APCI dos íons de m/z 880, 854 $[M-H]^-$ e 884 $[M+H]^+$ 

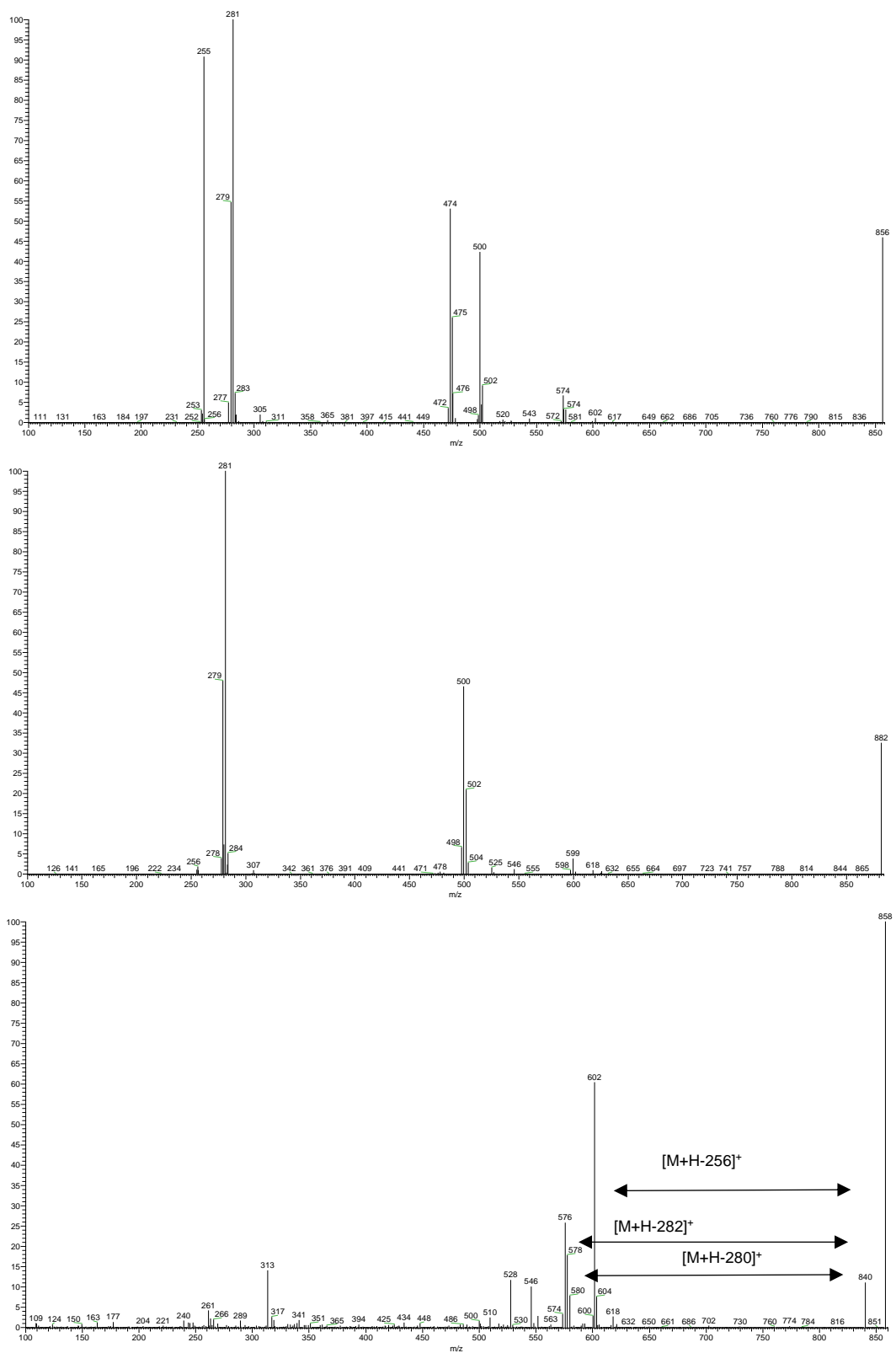
Figura 16. Espectro MS/MS em APCI dos íons de m/z 856, 882 $[M-H]^-$ e 858 $[M+H]^+$ 

Figura 17. Proposta de fragmentação de TAGs em fonte APCI em modo positivo (a) e modo negativo (b).

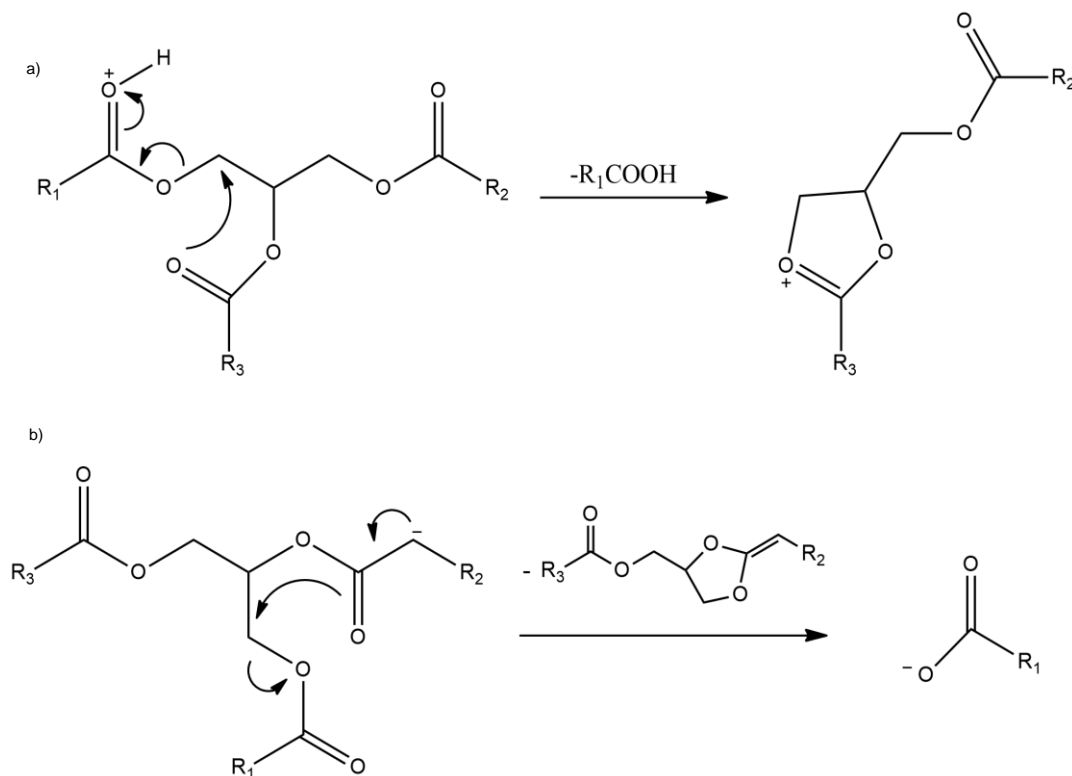


Tabela 3. Dados de íons obtidos e principais fragmentos observados dos TAGs.

Pico	[M+H]	MS ²	[M-H]	MS ²	TAG
1	880	560,598	878	279,281	OLnL/LOLn
	828	572,550	826	253,279	PPoLn/PLnPo
	854	600,574	852	279,253	PoLL/LPoL
	806	550, 578	804	255,280,228	MOP
2	882	600,602	880	281,279	LOL/OLL
	856	578,600,574	854	255,281	PLnO
	830	574,552	828	255,277	PPLn
3	884	602,604	882	281,279	OLO/OOL
	858	576,602	856	255,281,279	POL
	832	576,550,578	830	281,255,253	OPoP
4	886	602,604,606	884	281,279,283	OSL/SOL
	860	578,604	858	281,255	OOP/OPO
	834	578,604	832	255,281	POP/PPO
	836	552,580	834	255,283	SPP/PSP
	910	628,604	908	281,305	DiOO/ODiO
	912	630,602	910	281,309	GoLO
5	888	606,604	886	281,283	OOS/OSO
	862	580,606,578	860	281,255,283	OSP/SOP
	864	580	862	283	SPS
	890	608,606	888	283,281	SSO/SOS

Abreviações: M (mirístico), Po (palmitoleico), P (palmitico), Ln (linolênico), L (linoleico), O (oleico), S (esteárico), Di (dihomo- γ -linolênico), Go (gondoico).

O favorecimento da perda neutra de ácidos graxos nas posições sn-1/3 é de extremo valor pois além de contribuir para o entendimento da composição de ácidos graxos do TAG, viabiliza o entendimento regioespecífico estrutural sobre o TAG especialmente quando acoplado a cromatografia líquida onde é possível separar isômeros que podem ser mais facilmente caracterizados (MOTTRAM & EVERSHED, 1996). E no caso da amostra, evidenciou a predominância de ácidos graxos saturados como palmítico e esteárico, o ácido graxo monoinsaturado oleico e o ácido graxo poliinsaturado linoleico, previamente identificados e corroborados na análise por FAMES.

É importante salientar que os dados obtidos são inéditos para peixes da região amazônica, sendo possível comparar somente com dados de peixes de outros ambientes descritos na literatura. Os dados obtidos apontam para uma composição de lipídios neutros com um perfil de triacilglicerídeos diferenciado em relação aos organismos marinhos. Quando comparado aos TAGs peixes de água salgada por exemplo, há predominância de ácidos graxos com alto grau de insaturação como os do tipo DDO e EPoM predominantemente encontrados em anchova e os EPS e EMM predominantes em atum. Em salmão por outro lado já foi encontrado níveis consideráveis de OOS e PPS (ZHANG et al., 2018). Embora, já se tenha encontrado outros TAGs como indícios de que o salmão do Atlântico também possua prevalência de ácidos graxos de alto grau de insaturação como EPA e DHA também possui níveis consideráveis de ácidos graxos palmítico, esteáricos, oleico e linoleico que também foram frequentemente reportados na composição dos TAGs de tambaqui no presente trabalho (YEO & PARRISH, 2020).

Em contrapartida a composição do tambaqui se assemelha a composição de triacilgliceróis de óleos vegetais, onde OLL/LOL e OOL/OLO podem ser facilmente encontrados com grande abundância, além dos POLn e POL que também foram encontrados em quantidades menores, em óleos como de milho, soja e girassol (FASCIOTTI & NETTO, 2010). Tal fenômeno pode ser atribuído ao ambiente e hábito alimentar do tambaqui que se alimenta na natureza predominantemente de frutos e castanhas de áreas alagadas do período de cheia, assimilando grande parte desses ácidos graxos e os incorporando na forma de triacilgliceróis para manutenção de seu balanço energético em períodos de seca onde há pouca disponibilidade de alimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi possível aplicar uma abordagem eficiente de preparo de amostra na obtenção da fração neutra empregando coluna SPE em sistema no modo normal de eluição, que foi capaz de retirar lipídios polares que eventualmente poderiam dificultar análises posteriores da fração neutra.

A avaliação do perfil ácidos graxos do óleo bruto se mostrou útil para o conhecimento do perfil de ácidos graxos em tabaquis de ambientes diferentes, demonstrando em ambos a predominância dos ácidos oleico, palmítico, linoleico e esteárico. Embora a diferenciação presente pela composição maior escala dos ácidos graxos polinsaturados no peixe selvagem, bem como seu significativo teor lipídico menor em relação ao de manejo.

A análise por DIMS foi capaz de evidenciar o perfil de lipídios neutros através da faixa correspondente aos TAGs e sua confirmação ao comparar em diferentes fontes, confirmou-se a natureza predominantemente de TAGs na amostra e sua diferenciação em termos da diferença de massa entre os íons principais.

O perfil de fragmentação foi capaz de revelar a natureza dos triacilglicerídeos principais que compõe a fração neutra apresentando as perdas neutras relativas a unidades de ácidos graxos das posições sn-1/3, sendo os principais OLL/LOL, OLO/OOL, PLnO, POL com grande semelhança aos encontrados em fontes de óleos vegetais.

Na análise por HPLC-MS foi possível avaliar a quantidade relativa dos TAGs na amostra evidenciando os picos correspondentes aos íons principais e também o comportamento cromatográfico desses TAGs mostrando um padrão na eluição com tempos menores para tags de menores massas compostas por ácidos graxos como o C14:0 (mirístico) até a tempos maiores de ácidos graxos de cadeia longa como C20:1 (gondoico).

7 REFERÊNCIAS

ABABOUC, Lahsen. Assuring fish safety and quality in international fish trade. **Marine pollution bulletin**, v. 53, n. 10-12, p. 561-568, 2006.

ALMEIDA, Neiva Maria; VISENTAINER, Jesuí Vergílio; FRANCO, Maria Regina Bueno. Composition of total, neutral and phospholipids in wild and farmed tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon area. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 10, p. 1739-1747, 2008.

ANDRADE, A. D. et al. ω 3 fatty acids in freshwater fish from south brazil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 10, p. 1207-1210, 1995.

ARBELÁEZ-ROJAS, Gustavo Alberto; FRACALOSSO, Débora Machado; FIM, Jorge Daniel Indrusiak. Composição corporal de tambaqui, *Colossoma macropomum*, e matrinxã, *Brycon cephalus*, em sistemas de cultivo intensivo, em igarapé, e semi-intensivo, em viveiros. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, p. 1059-1069, 2002.

ARIDE, Paulo Henrique Rocha; ROUBACH, Rodrigo; VAL, ADALBERTO LUIZ. Water pH in central Amazon and its importance for tambaqui (*Colossoma macropomum*) culture. **World Aquaculture**, v. 35, n. 2, p. 2427, 2004.

BARRON, L. J. R.; SANTA-MARIA, G. Non-aqueous reverse-phase HPLC analysis of triglycerides. **Chromatographia**, v. 23, n. 3, p. 209-214, 1987.

BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

BOGOTÁ-GREGORY, Juan David et al. Biogeochemical water type influences community composition, species richness, and biomass in megadiverse Amazonian fish assemblages. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

BRANDÃO, Franmir Rodrigues; GOMES, Levy de Carvalho; CHAGAS, Edsandra Campos. Respostas de estresse em pirarucu (*Arapaima gigas*)

durante práticas de rotina em piscicultura. **Acta Amazonica**, v. 36, p. 349-356, 2006.

BYRDWELL, William Craig. Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. **Lipids**, v. 36, n. 4, p. 327-346, 2001.

CARROLL, D. I. et al. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 17, n. 3, p. 337-406, 1981.

CASTELLO, Leandro et al. The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. **Conservation letters**, v. 6, n. 4, p. 217-229, 2013.

CHAGAS, Edsandra Campos et al. Produtividade de tambaqui criado em tanque-rede com diferentes taxas de alimentação. **Ciência Rural**, v. 37, p. 1109-1115, 2007.

CLARO-JR, Luiz et al. O efeito da floresta alagada na alimentação de três espécies de peixes onívoros em lagos de várzea da Amazônia Central, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 34, p. 133-137, 2004.

DA SILVA RABITTO, Inês et al. Mercury and DDT exposure risk to fish-eating human populations in Amazon. **Environment International**, v. 37, n. 1, p. 56-65, 2011.

DA SILVA, J. A. M.; PEREIRA-FILHO, M.; DE OLIVEIRA-PEREIRA, M. I. Seasonal variation of nutrients and energy in tambaqui's (*Colossoma Macropomum* Cuvier, 1818) natural food. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 60, p. 599-605, 2000.

DEWICK, Paul M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. John Wiley & Sons, 2002.

DOWLATI, Majid; DE LA GUARDIA, Miguel; MOHTASEBI, Seyed Saeid. Application of machine-vision techniques to fish-quality assessment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 40, p. 168-179, 2012.

ENDO, Jin; ARITA, Makoto. Cardioprotective mechanism of omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of cardiology**, v. 67, n. 1, p. 22-27, 2016.

FAHY, Eoin et al. A comprehensive classification system for lipids1. **Journal of lipid research**, v. 46, n. 5, p. 839-861, 2005.

FAHY, Eoin et al. Update of the LIPID MAPS comprehensive classification system for lipids1. **Journal of lipid research**, v. 50, p. S9-S14, 2009.

FASCIOTTI, Maira et al. Investigating the potential of ion mobility-mass spectrometry for microalgae biomass characterization. **Analytical chemistry**, v. 91, n. 14, p. 9266-9276, 2019.

FASCIOTTI, Maíra; NETTO, Annibal D. Pereira. Optimization and application of methods of triacylglycerol evaluation for characterization of olive oil adulteration by soybean oil with HPLC–APCI-MS–MS. **Talanta**, v. 81, n. 3, p. 1116-1125, 2010.

FERRAZ, Renato B. et al. A complete enzymatic capacity for long-chain polyunsaturated fatty acid biosynthesis is present in the Amazonian teleost tambaqui, *Colossoma macropomum*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 227, p. 90-97, 2019.

FERRAZ, Renato B. et al. The fatty acid elongation genes *elovl4a* and *elovl4b* are present and functional in the genome of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 245, p. 110447, 2020.

FREITAS, Carlos Edwar de Carvalho; RIVAS, Alexandre Almir Ferreira. A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia Ocidental. **Ciência e cultura**, v. 58, n. 3, p. 30-32, 2006.

GOULDING, Michael; CARVALHO, Mírian Leal. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.

GURR, Michael Ian. **Lipids in nutrition and health: A reappraisal**. Elsevier, 1999.

HAARD, Norman F. Control of chemical composition and food quality attributes of cultured fish. **Food research international**, v. 25, n. 4, p. 289-307, 1992.

HAMILTON, James G.; COMAI, Karen. Separation of neutral lipids and free fatty acids by high-performance liquid chromatography using low wavelength ultraviolet detection. **Journal of Lipid Research**, v. 25, n. 10, p. 1142-1148, 1984.

HENDERSON, R. J. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. **Archives of Animal Nutrition**, v. 49, n. 1, p. 5-22, 1996.

HENDERSON, R. James; TOCHER, Douglas R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. **Progress in lipid research**, v. 26, n. 4, p. 281-347, 1987.

HIXSON, Stefanie M.; PARRISH, Christopher C.; ANDERSON, Derek M. Changes in tissue lipid and fatty acid composition of farmed rainbow trout in response to dietary camelina oil as a replacement of fish oil. **Lipids**, v. 49, n. 1, p. 97-111, 2014.

HSU, Fong-Fu; TURK, John. Structural characterization of triacylglycerols as lithiated adducts by electrospray ionization mass spectrometry using low-energy collisionally activated dissociation on a triple stage quadrupole instrument. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 10, n. 7, p. 587-599, 1999.

JIMENEZ, Érica Antunes et al. International trade of Amazon fish byproducts: Threats and opportunities for coastal livelihoods. **Ocean & Coastal Management**, v. 212, p. 105812, 2021.

JING, Jing et al. Advances in analytical technologies to evaluate the quality of traditional Chinese medicines. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 44, p. 39-45, 2013.

KHALILI TILAMI, Sarvenaz; SAMPELS, Sabine. Nutritional value of fish: lipids, proteins, vitamins, and minerals. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 26, n. 2, p. 243-253, 2018.

LEES, Alexander C. et al. Hydropower and the future of Amazonian biodiversity. **Biodiversity and conservation**, v. 25, n. 3, p. 451-466, 2016.

LI, Min et al. Recent advances of chromatography and mass spectrometry in lipidomics. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 399, n. 1, p. 243-249, 2011.

LIN, Lin et al. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. **Analyst**, v. 135, n. 11, p. 2970-2978, 2010.

LINHARES, Bernardo M. et al. Fatty Acids Profile, Physicalchemical Properties and Minerals with Quantify Indicator of *Astrocaryum aculeatum* Pulp Oil. **Journal of Agricultural Science**, v. 9, n. 12, p. 352, 2017.

LÍSA, Miroslav et al. Lipidomic analysis of biological samples: comparison of liquid chromatography, supercritical fluid chromatography and direct infusion mass spectrometry methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1525, p. 96-108, 2017.

MAIA, Everardo Lima; RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Colossoma macropomum*. In: **Developments in Food Science**. Elsevier, p. 633-642., 1992.

MARZILLI, Lisa A. et al. Structural characterization of triacylglycerols using electrospray ionization-MS n ion-trap MS. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 3, p. 195-202, 2003.

MAURER, Hans H. Hyphenated mass spectrometric techniques—indispensable tools in clinical and forensic toxicology and in doping control. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 41, n. 11, p. 1399-1413, 2006.

MEROLA, Nino; PAGÁN-FONT, Francisco A. Pond culture of the Amazon fish tambaqui, *Colossoma macropomum*: A pilot study. **Aquacultural engineering**, v. 7, n. 2, p. 113-125, 1988.

MIGOWSKA, Natalia et al. Trimethylsilyldiazomethane (TMSD) as a new derivatization reagent for trace analysis of selected non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) by gas chromatography methods. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 397, n. 7, p. 3029-3034, 2010.

MONROIG, Oscar; TOCHER, Douglas R.; CASTRO, Luís Filipe C. Polyunsaturated fatty acid biosynthesis and metabolism in fish. In: **Polyunsaturated fatty acid metabolism**. AOCS Press, 2018. p. 31-60.

MORADI, Y. et al. A review on fish lipid: composition and changes during cooking methods. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 20, n. 4, p. 379-390, 2011.

MOTTRAM, Hazel R.; EVERSLED, Richard P. Structure analysis of triacylglycerol positional isomers using atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 47, p. 8593-8596, 1996.

MURPHY, Robert C.; FIEDLER, Jessica; HEVKO, John. Analysis of nonvolatile lipids by mass spectrometry. **Chemical reviews**, v. 101, n. 2, p. 479-526, 2001.

NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Artmed Editora, 2014.

OBERDORFF, Thierry et al. Unexpected fish diversity gradients in the Amazon basin. **Science advances**, v. 5, n. 9, p. eaav8681, 2019.

OBOH, Angela et al. Two alternative pathways for docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6n-3) biosynthesis are widespread among teleost fish. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-10, 2017.

OLIVEIRA, Márcio L. et al. **Reserva Ducke: A biodiversidade amazônica através de uma grade**. PPBio, 2011.

PEDROZA FILHO, Manoel Xavier et al. Panorama da cadeia produtiva do pirarucu. **CNA, Boletim ativos da aquicultura**, v. 8, 2016.

PETENUCCI, Maria Eugênia et al. Seasonal variations in lipid content, fatty acid composition and nutritional profiles of five freshwater fish from the Amazon basin. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 93, n. 10, p. 1373-1381, 2016.

PIZZO, Jessica S. et al. Determination of coconut oil adulteration with soybean oil by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 1468-1474, 2019a.

PIZZO, Jessica Santos et al. Direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry applied in the detection of adulteration of coconut oil with palm kernel oil. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 36, n. 11, p. 1597-1604, 2019b.

RODRIGUES, Antonio M.; DARNET, Sylvain; SILVA, Luiza H. Fatty acid profiles and tocopherol contents of buriti (*Mauritia flexuosa*), patawa (*Oenocarpus bataua*), tucuma (*Astrocaryum vulgare*), mari (*Poraqueiba paraensis*) and inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, p. 2000-2004, 2010.

SAINT-PAUL, Ulrich. Potential for aquaculture of South American freshwater fishes: a review. **Aquaculture**, v. 54, n. 3, p. 205-240, 1986.

SALDANHA, Tatiana et al. HPLC separation and determination of 12 cholesterol oxidation products in fish: comparative study of RI, UV, and APCI-MS detectors. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 12, p. 4107-4113, 2006.

SANTOS, Carla LG et al. Molecular networking-based dereplication of strictosidine-derived monoterpene indole alkaloids from the curare ingredient *Strychnos peckii*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 34, p. e8683, 2020.

SANTOS, Evandro Freitas et al. Fauna parasitária de tambaqui *Colossoma macropomum* (Characidae) cultivado em tanque-rede no estado do Amapá, Amazônia oriental. **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 105-111, 2013.

SARGENT, John R.; TOCHER, Douglas R.; BELL, J. Gordon. The lipids. **Fish nutrition**, p. 181-257, 2003.

SEGALL, S. D. et al. Analysis of triacylglycerol isomers in Malaysian cocoa butter using HPLC–mass spectrometry. **Food research international**, v. 38, n. 2, p. 167-174, 2005.

SHON, Jong Cheol et al. Direct infusion MS-based lipid profiling reveals the pharmacological effects of compound K-reinforced ginsenosides in high-fat diet induced obese mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 11, p. 2919-2929, 2015.

SIMOPOULOS, Artemis P. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 8, p. 365-379, 2002.

STONE, D. A. J. et al. The effects of phase-feeding rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with canola oil and Alaskan pollock fish oil on fillet fatty acid composition and sensory attributes. **Aquaculture Nutrition**, v. 17, n. 2, p. e521-e529, 2011.

TOCHER, Douglas R. Fatty acid requirements in ontogeny of marine and freshwater fish. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 5, p. 717-732, 2010.

TOCHER, Douglas R.; GHIONI, Cristina. Fatty acid metabolism in marine fish: low activity of fatty acyl $\Delta 5$ desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. **Lipids**, v. 34, n. 5, p. 433-440, 1999.

TOPOLEWSKA, Anna et al. Evaluation of four derivatization methods for the analysis of fatty acids from green leafy vegetables by gas chromatography. **Journal of Chromatography B**, v. 990, p. 150-157, 2015.

TUOMISTO, Hanna et al. Dissecting amazonian biodiversity. **Science**, v. 269, n. 5220, p. 63-66, 1995.

TURCHINI, Giovanni M.; FRANCIS, David S. Fatty acid metabolism (desaturation, elongation and β -oxidation) in rainbow trout fed fish oil-or linseed oil-based diets. **British Journal of Nutrition**, v. 102, n. 1, p. 69-81, 2009.

VAL, Adalberto L. et al. Amazônia: recursos hídricos e sustentabilidade. **Águas do Brasil: análises estratégicas. São Paulo: Instituto de Botânica**, p. 95-109, 2010.

VAL, Adalberto Luis; SILVA, M. N. P.; ALMEIDA-VAL, Vera Maria Fonseca. Hypoxia adaptation in fish of the Amazon: a never-ending task. **South African Journal of Zoology**, v. 33, n. 2, p. 107-114, 1998.

VALE, Gonçalo et al. Three-phase liquid extraction: a simple and fast method for lipidomic workflows [S]. **Journal of lipid research**, v. 60, n. 3, p. 694-706, 2019.

VALLADÃO, Gustavo Moraes Ramos; GALLANI, Sílvia Umeda; PILARSKI, Fabiana. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**, v. 10, n. 2, p. 351-369, 2018.

VENUGOPAL, V.; SHAHIDI, Feridoon. Structure and composition of fish muscle. **Food Reviews International**, v. 12, n. 2, p. 175-197, 1996.

WOOD, Chris M. et al. The physiology of the Tambaqui (*Colossoma macropomum*) at pH 8.0. **Journal of Comparative Physiology B**, v. 188, n. 3, p. 393-408, 2018.

WU, Ted H.; BECHTEL, Peter J. Ammonia, dimethylamine, trimethylamine, and trimethylamine oxide from raw and processed fish by-products. **Journal of aquatic food product technology**, v. 17, n. 1, p. 27-38, 2008.

WU, Zhuojun et al. "Lipidomics": Mass spectrometric and chemometric analyses of lipids. **Advanced drug delivery reviews**, v. 159, p. 294-307, 2020.

YEO, JuDong; PARRISH, Christopher C. Evaluation of triacylglycerol (TAG) profiles and their contents in salmon muscle tissue using ESI-MS/MS spectrometry with multiple neutral loss scans. **Food chemistry**, v. 324, p. 126816, 2020.

YI, Tao et al. Comparative analysis of EPA and DHA in fish oil nutritional capsules by GC-MS. **Lipids in health and disease**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2014.

ZHANG, Huijun et al. Characterization of positional distribution of fatty acids and triacylglycerol molecular compositions of marine fish oils rich in omega-3 polyunsaturated fatty acids. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

ZHANG, Shuming; WANG, Hongbin; ZHU, Mei-Jun. A sensitive GC/MS detection method for analyzing microbial metabolites short chain fatty acids in fecal and serum samples. **Talanta**, v. 196, p. 249-254, 2019.

ANEXOS

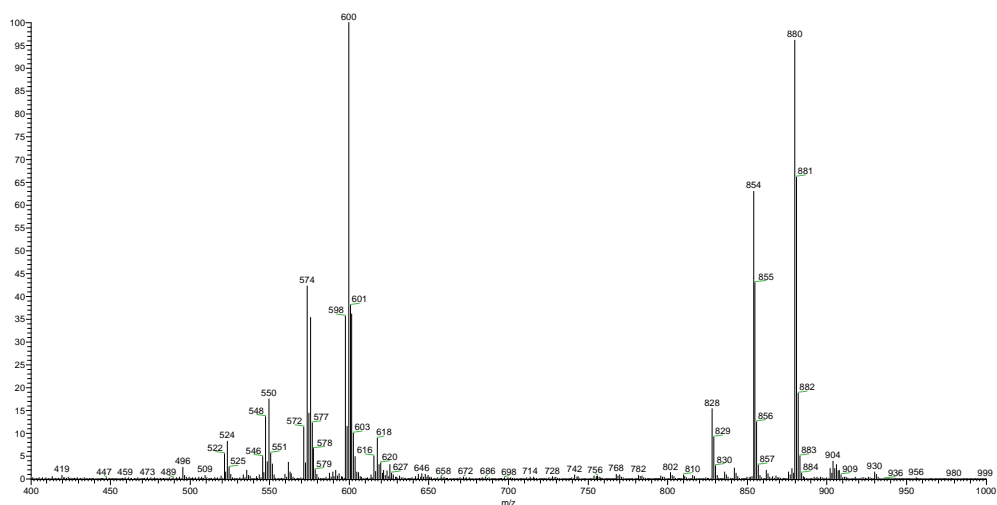


Figura A1. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 1.

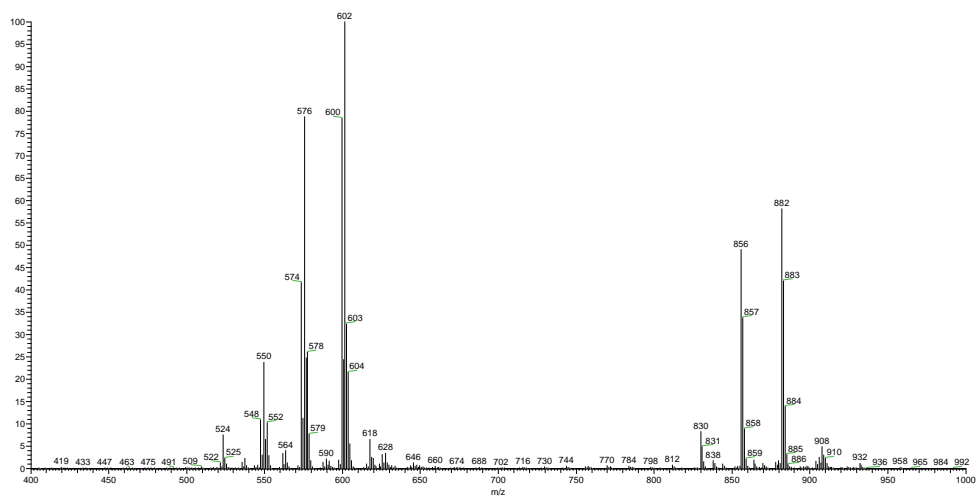


Figura A2. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 2.

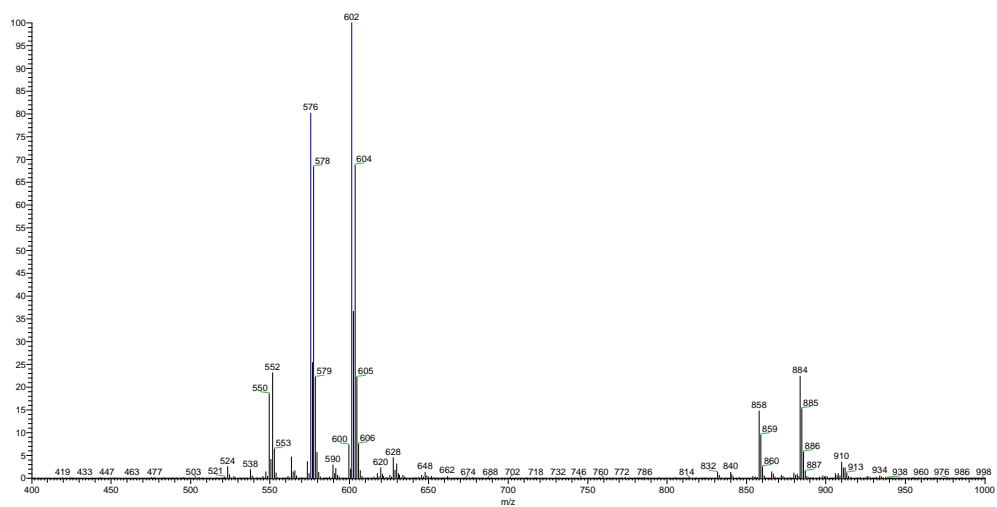


Figura A3. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 3.

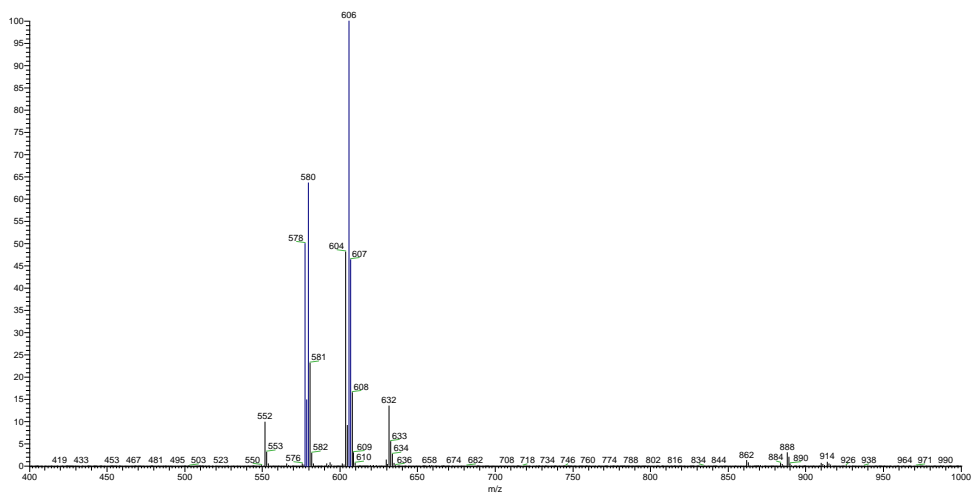


Figura A4. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 4.

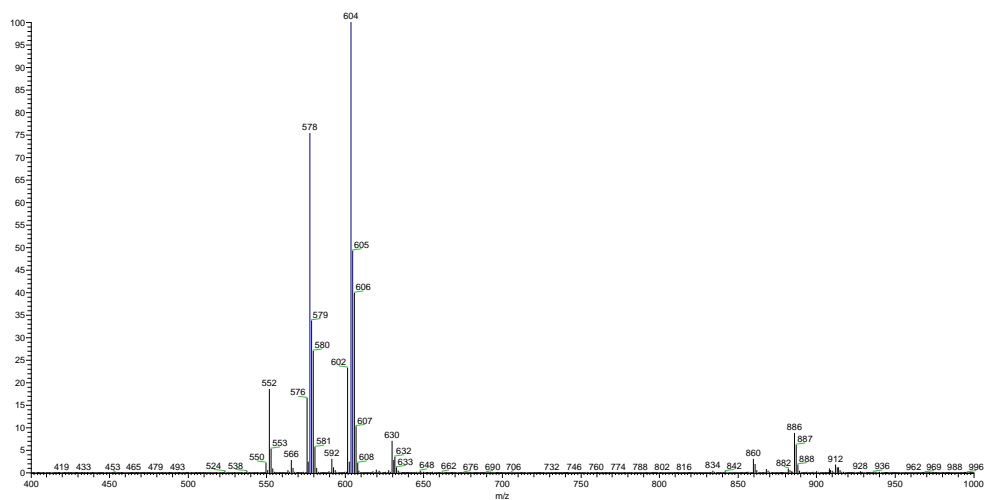


Figura A5. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo positivo) pico 5.

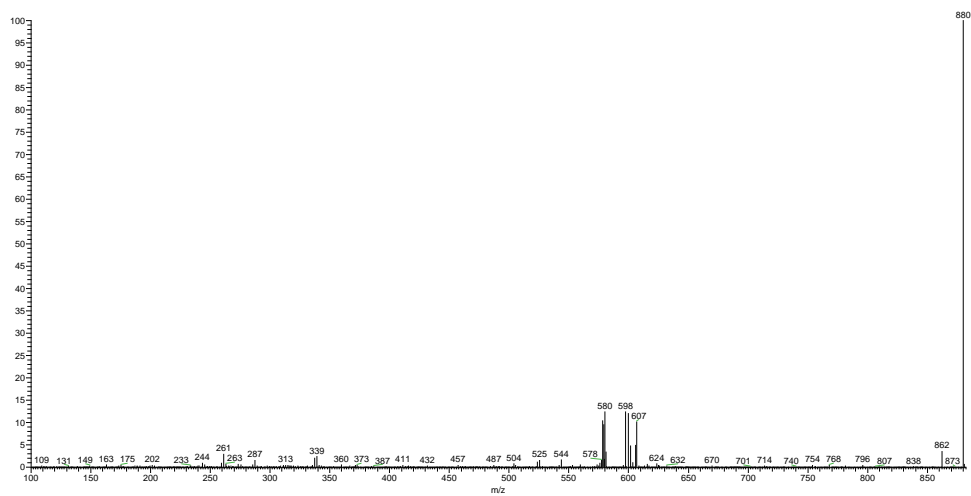


Figura A6. Espectro MS/MS do íon de m/z 880 $[M+H]^+$.

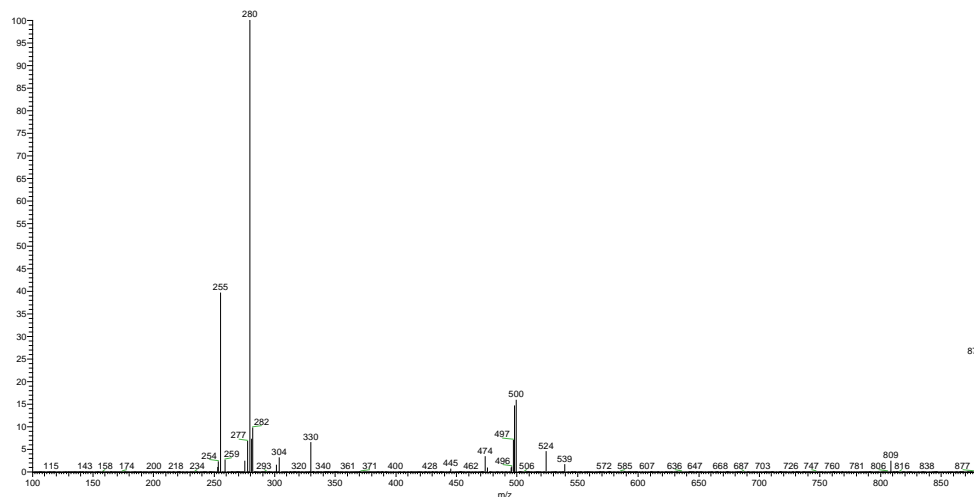


Figura A7. Espectro MS/MS do íon de m/z 878 [M-H]⁻.

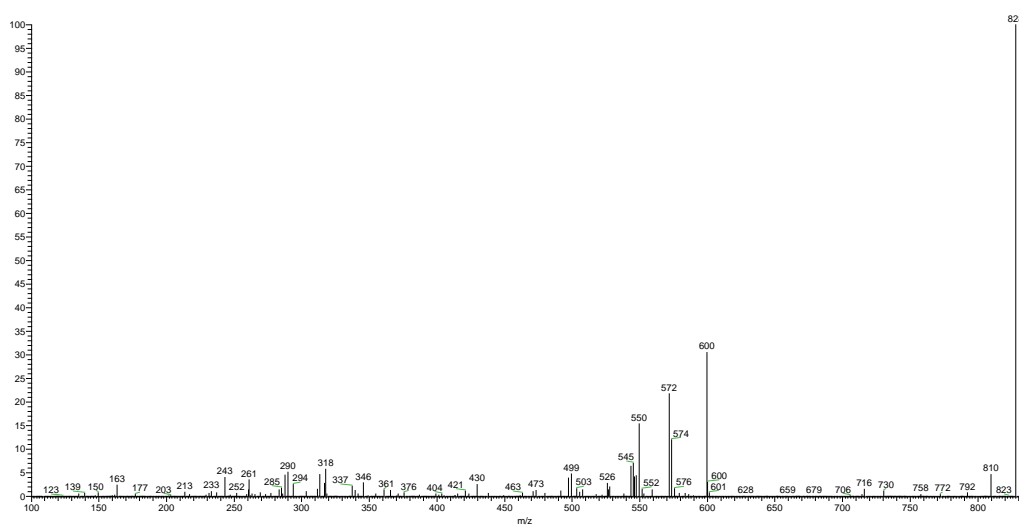


Figura A8. Espectro MS/MS do íon de m/z 828 [M+H]⁺.

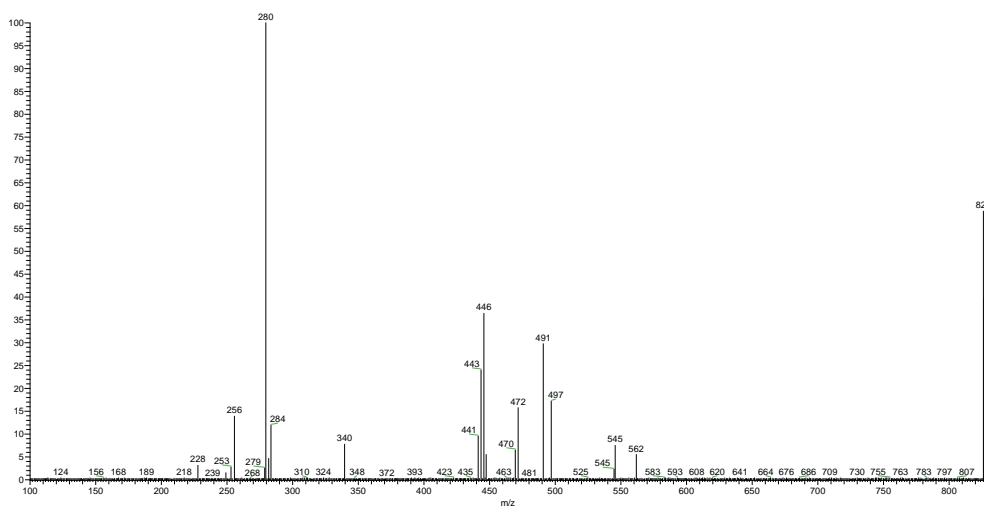


Figura A9. Espectro MS/MS do íon de m/z 826 [M-H]⁻.

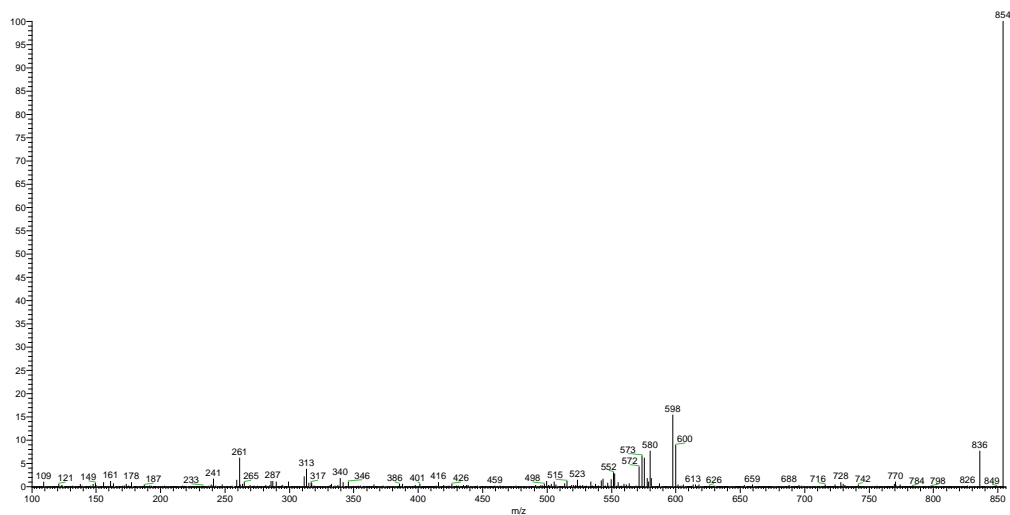


Figura A10. Espectro MS/MS do íon de m/z 854 $[M+H]^+$.

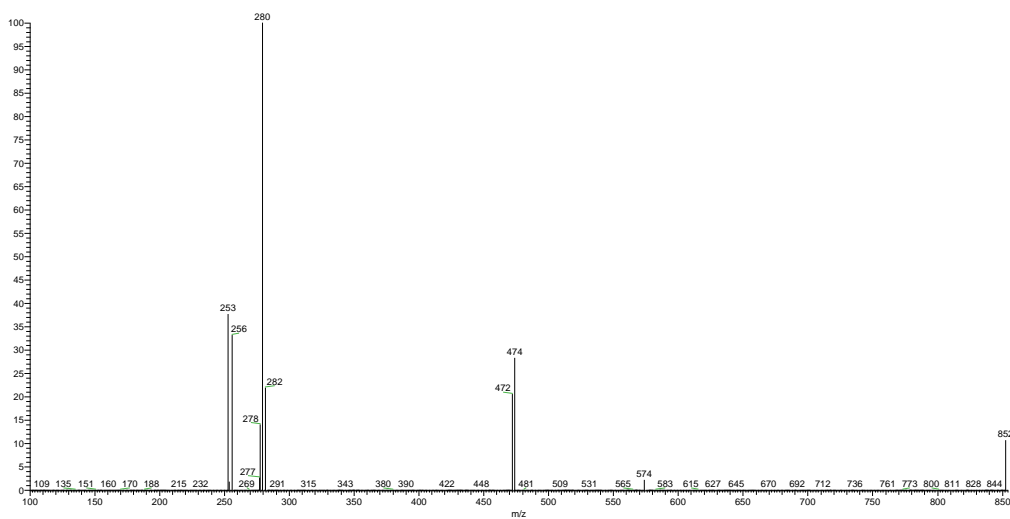


Figura A11. Espectro MS/MS do íon de m/z 852 $[M-H]^-$.

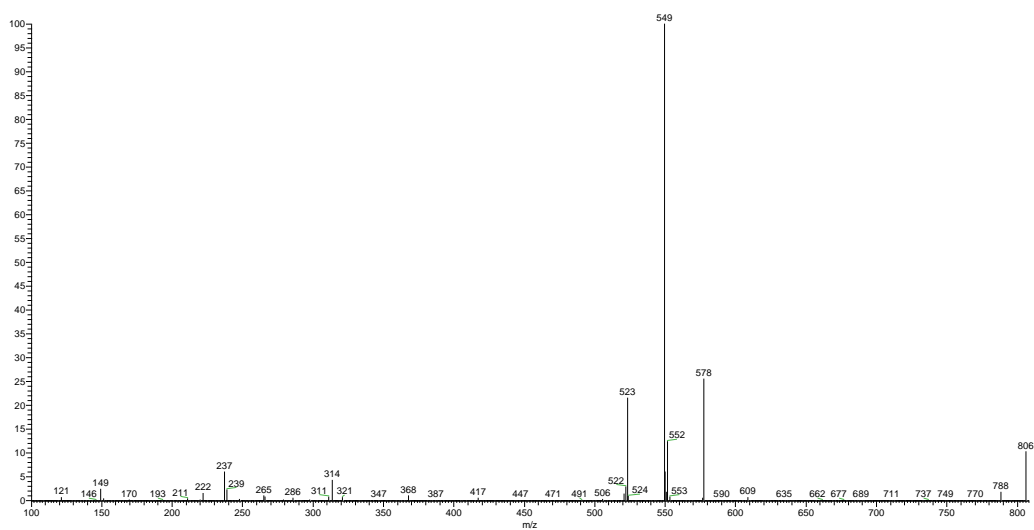


Figura A12. Espectro MS/MS do íon de m/z 806 $[M+H]^+$.

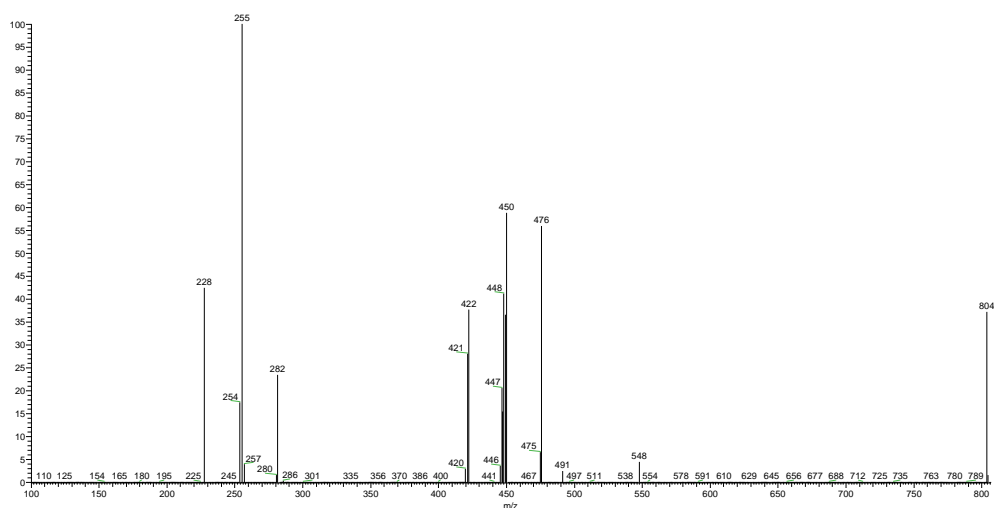


Figura A13. Espectro MS/MS do íon de m/z 804 [M-H].

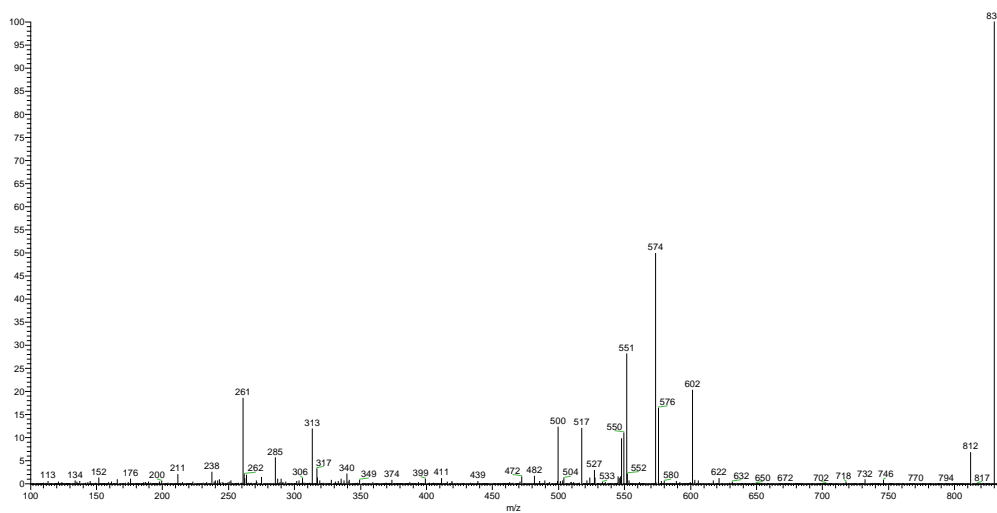


Figura A14. Espectro MS/MS do íon de m/z 830 [M+H]⁺.

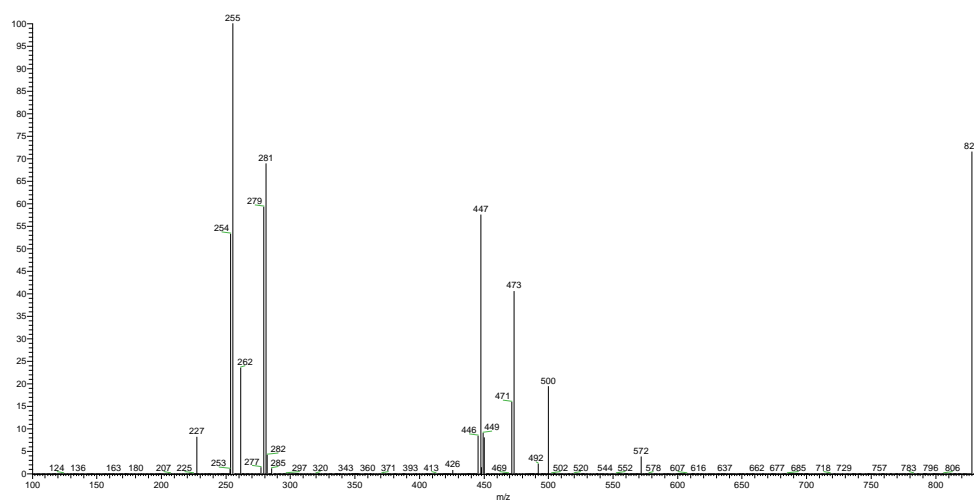


Figura A15. Espectro MS/MS do íon de m/z 828 [M-H].

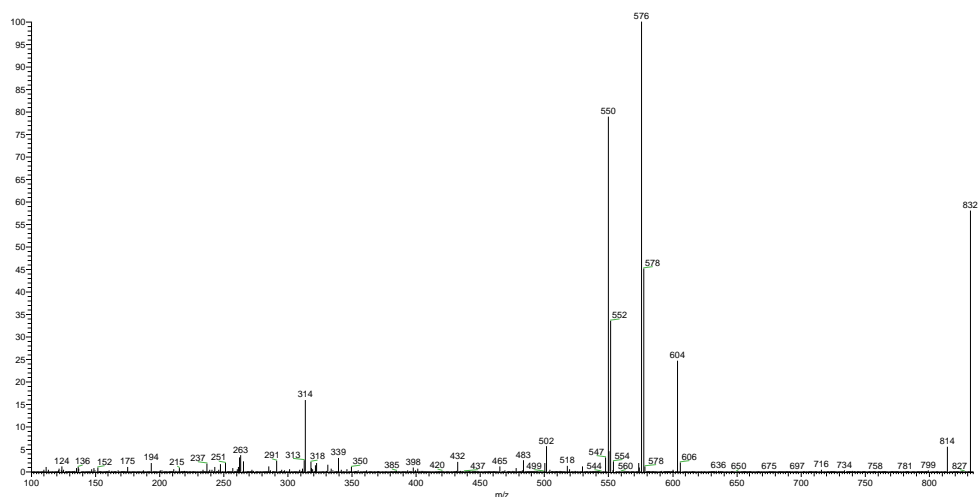


Figura A16. Espectro MS/MS do íon de m/z 832 $[M+H]^+$.

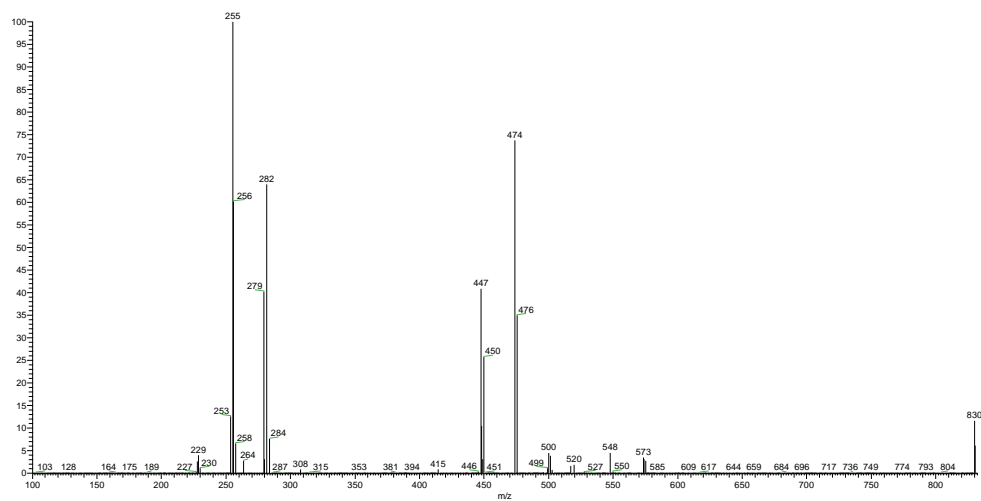


Figura A17. Espectro MS/MS do íon de m/z 828 $[M-H]^-$.

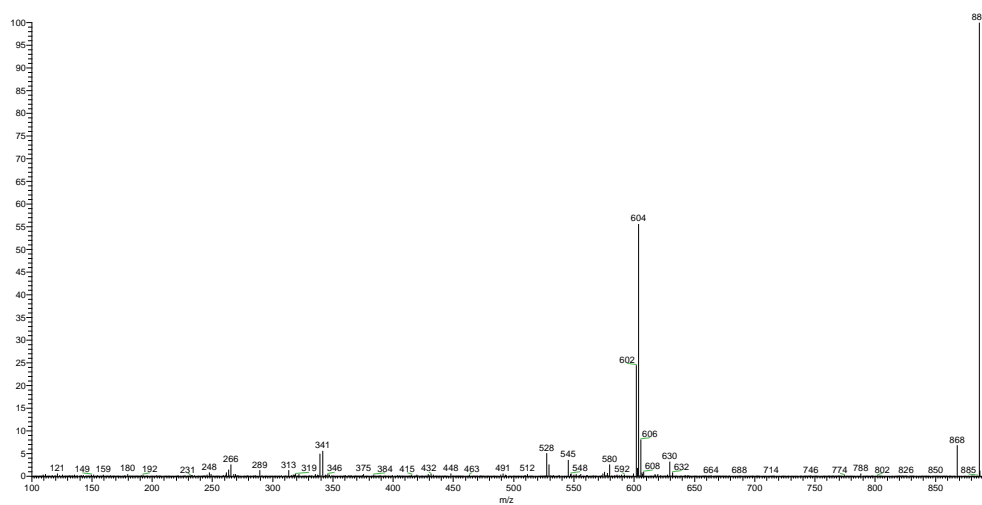


Figura A18. Espectro MS/MS do íon de m/z 886 $[M+H]^+$.

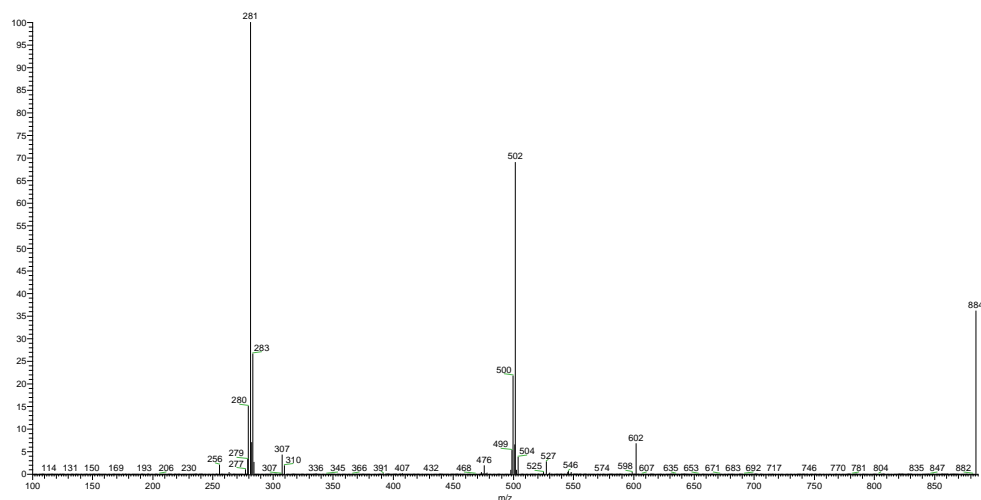


Figura A19. Espectro MS/MS do íon de m/z 884 [M-H].

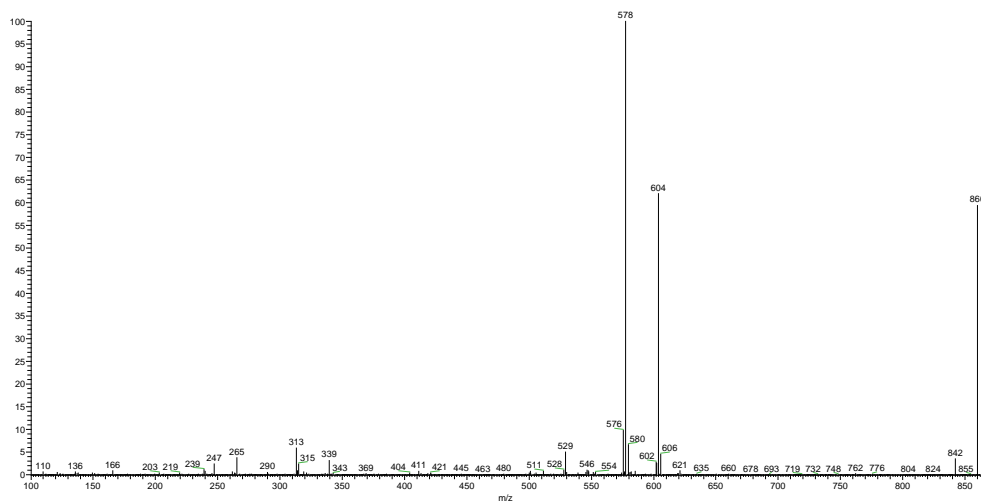


Figura A20. Espectro MS/MS do íon de m/z 860 [M+H]⁺.

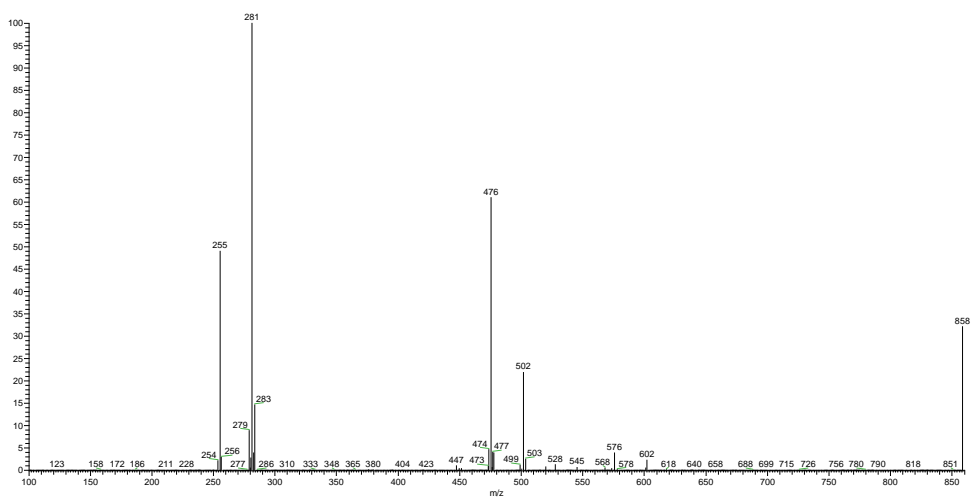


Figura A21. Espectro MS/MS do íon de m/z 858 [M-H].

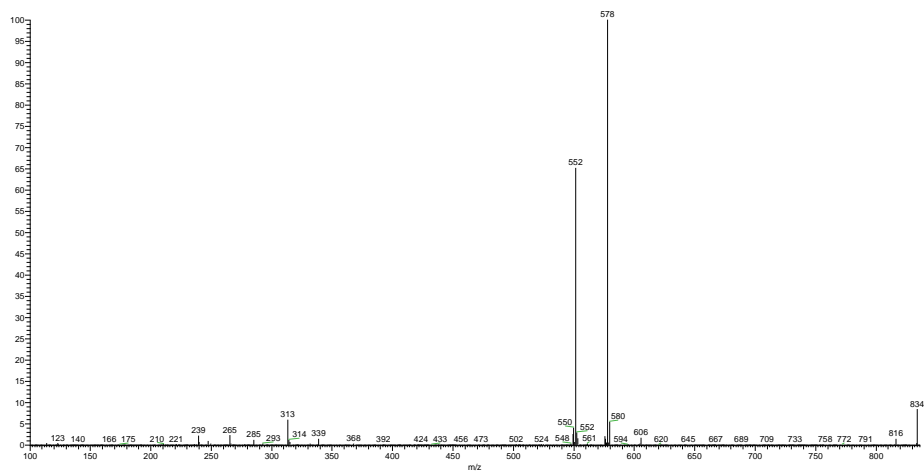


Figura A22. Espectro MS/MS do íon de m/z 834 $[M+H]^+$.

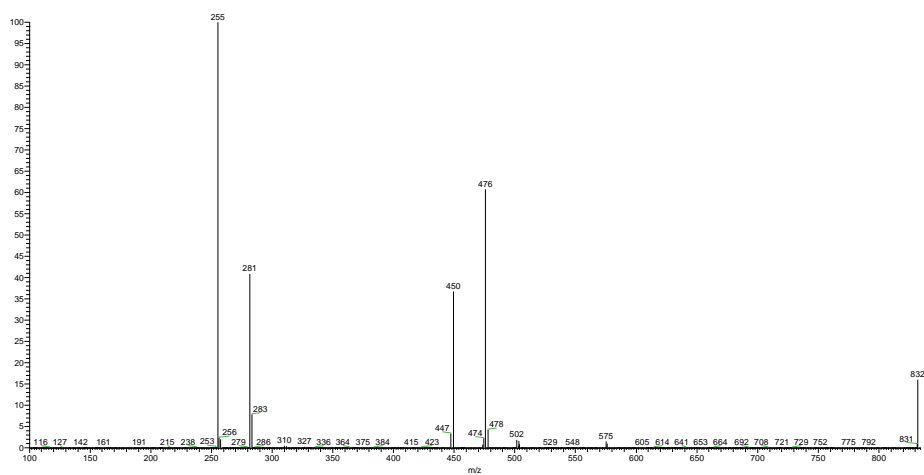


Figura A23. Espectro MS/MS do íon de m/z 832 $[M-H]^-$.

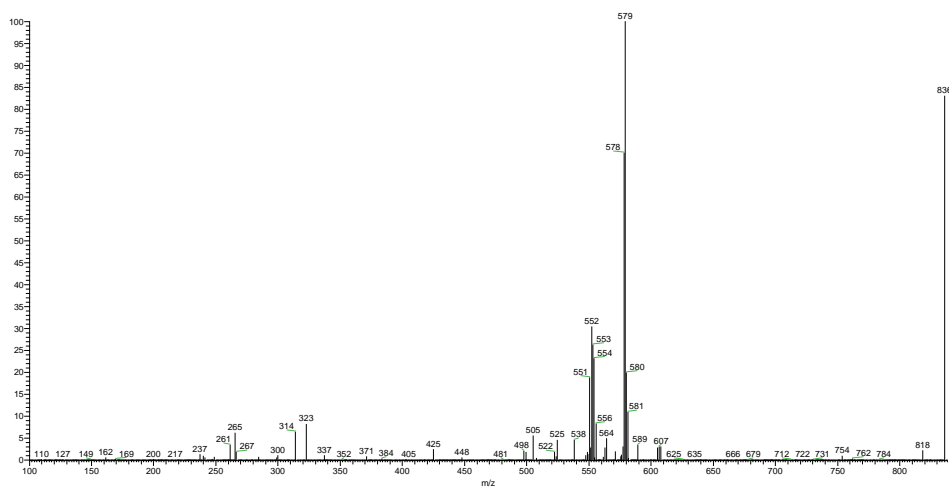


Figura A24. Espectro MS/MS do íon de m/z 836 $[M+H]^+$.

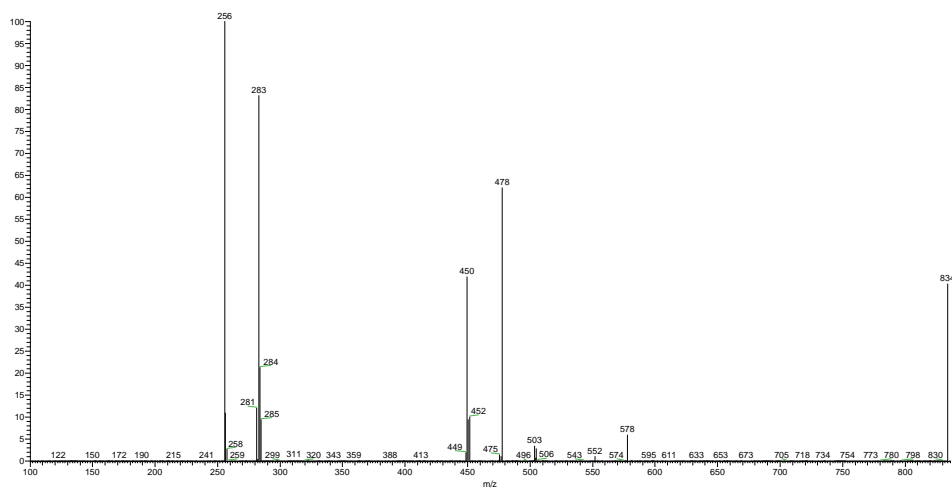


Figura A25. Espectro MS/MS do íon de m/z 834 [M-H]⁻.

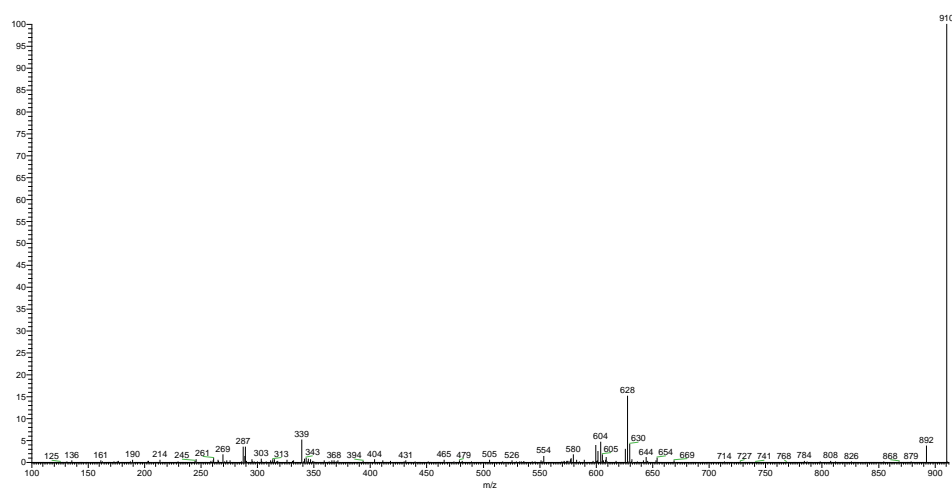


Figura A26. Espectro MS/MS do íon de m/z 910 [M+H]⁺.

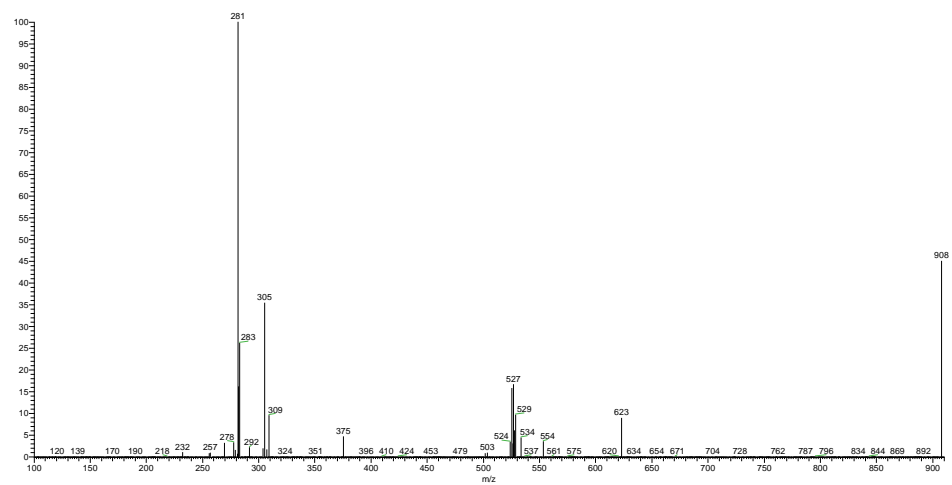


Figura A27. Espectro MS/MS do íon de m/z 908 [M-H]⁻.

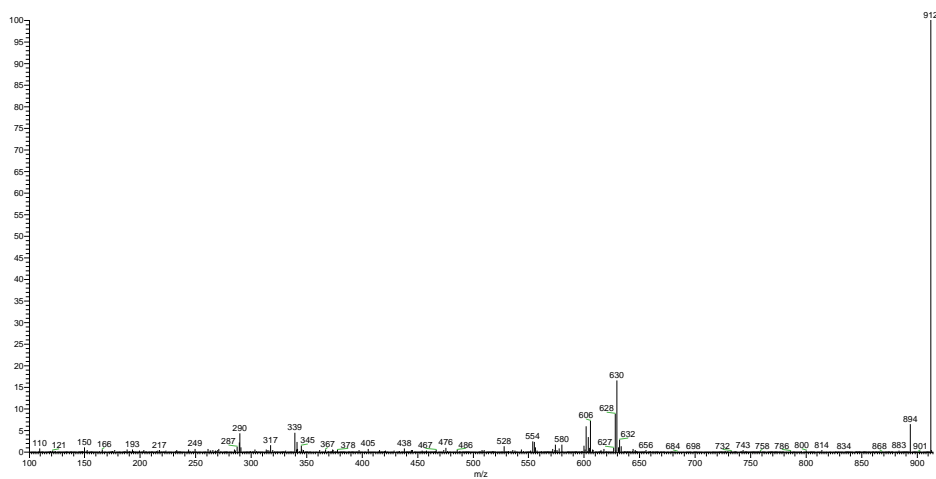


Figura A28. Espectro MS/MS do íon de m/z 912 $[M+H]^+$.

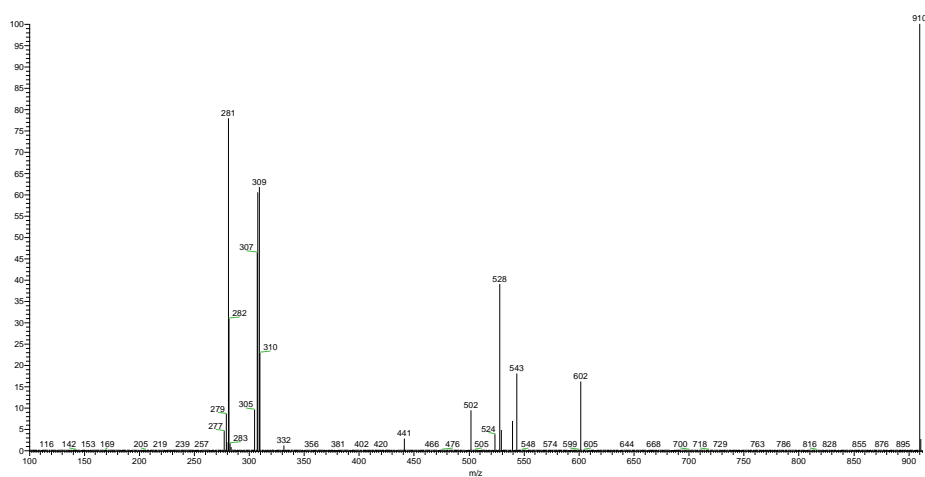


Figura A29. Espectro MS/MS do íon de m/z 910 $[M-H]^-$.

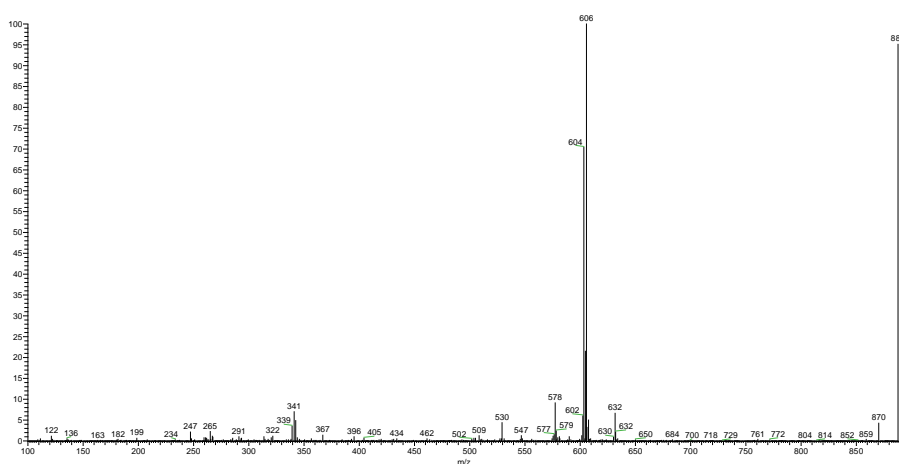


Figura A30. Espectro MS/MS do íon de m/z 888 $[M+H]^+$.

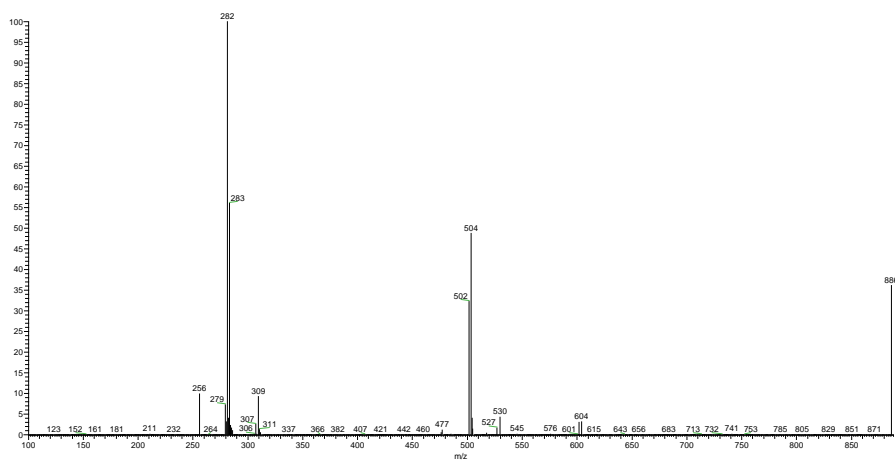


Figura A31. Espectro MS/MS do íon de m/z 886 [M-H]⁻.

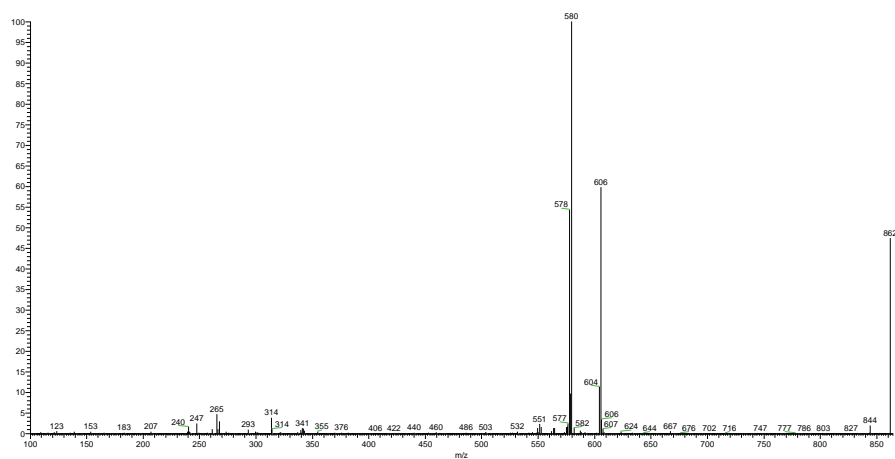


Figura A32. Espectro MS/MS do íon de m/z 862 [M+H]⁺.

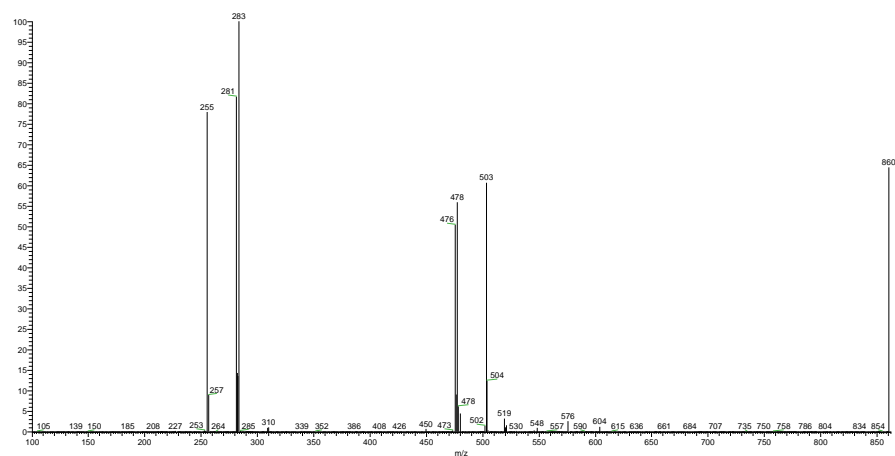


Figura A33. Espectro MS/MS do íon de m/z 860 [M-H]⁻.

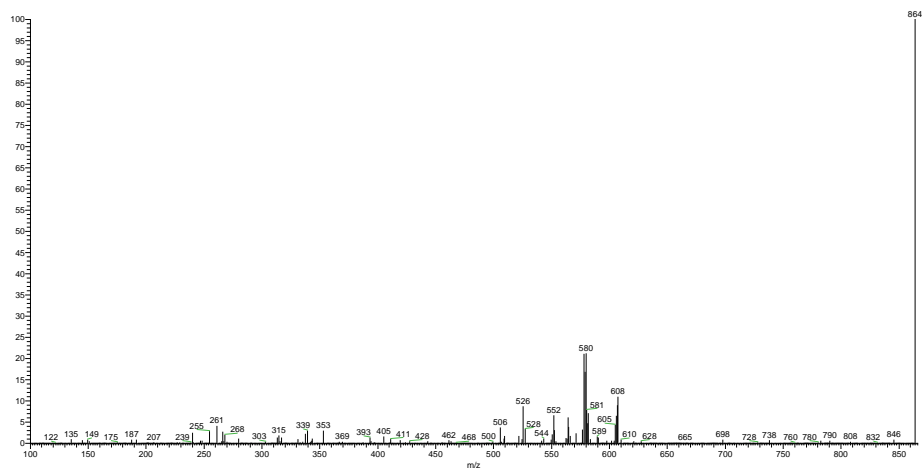


Figura A34. Espectro MS/MS do íon de m/z 864 $[M+H]^+$.

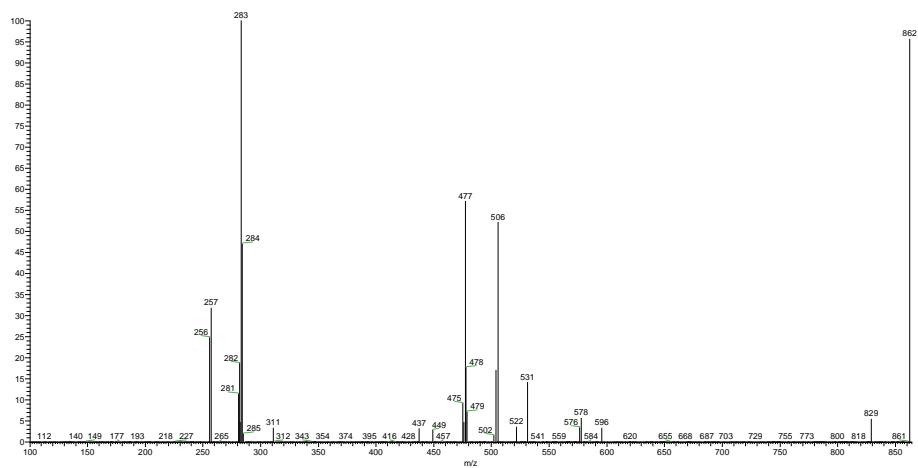


Figura A35. Espectro MS/MS do íon de m/z 862 $[M-H]^-$.

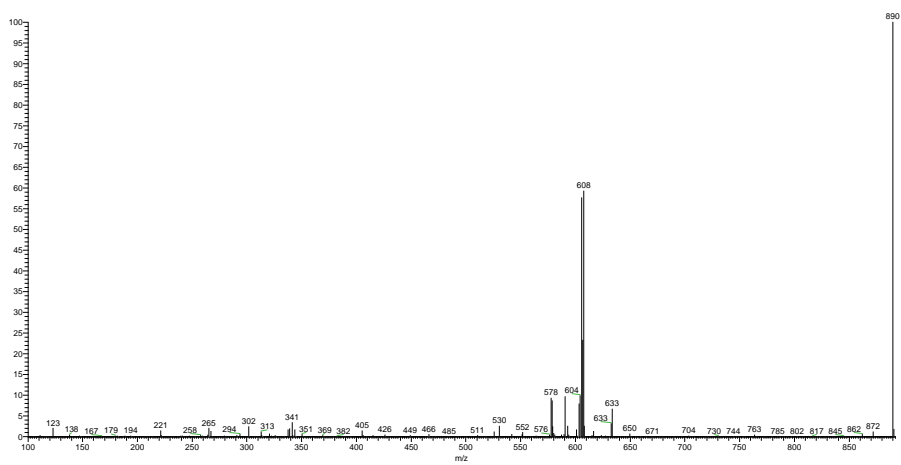


Figura A36. Espectro MS/MS do íon de m/z 890 $[M+H]^+$.

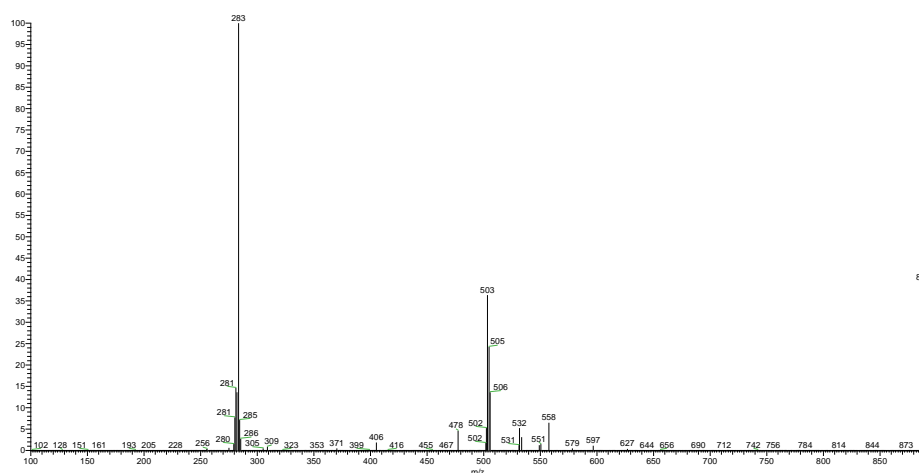


Figura A37. Espectro MS/MS do íon de m/z 888 [M-H]-.

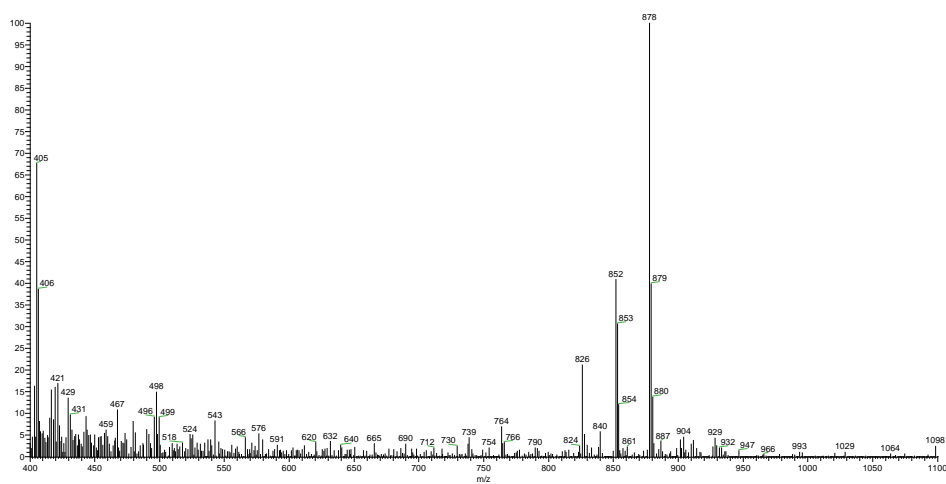


Figura A38. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 1.

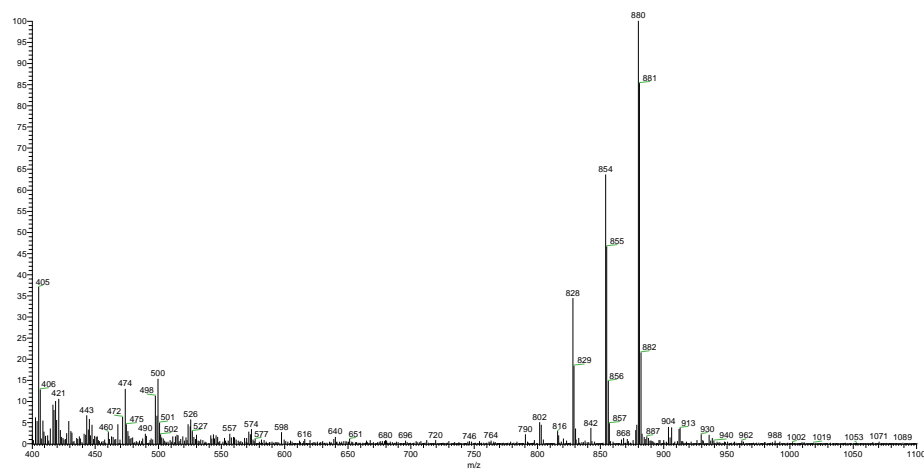


Figura A39. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 2.

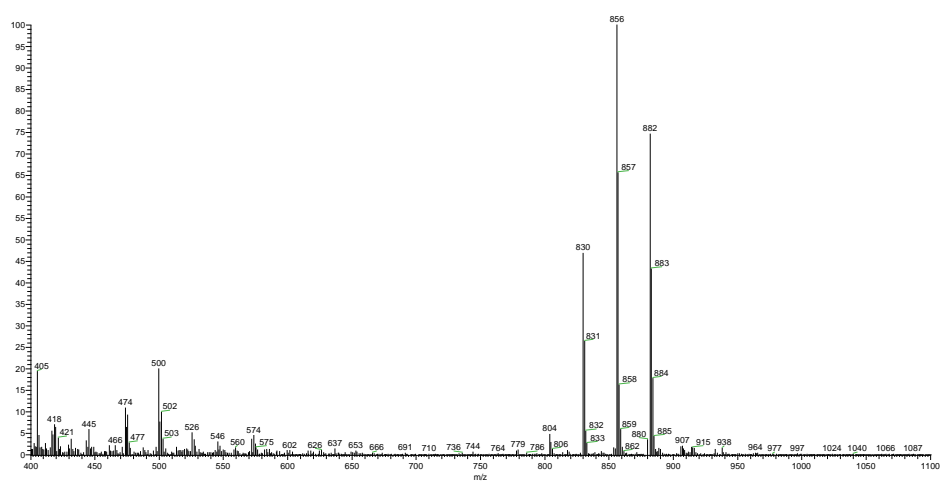


Figura A40. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 3.

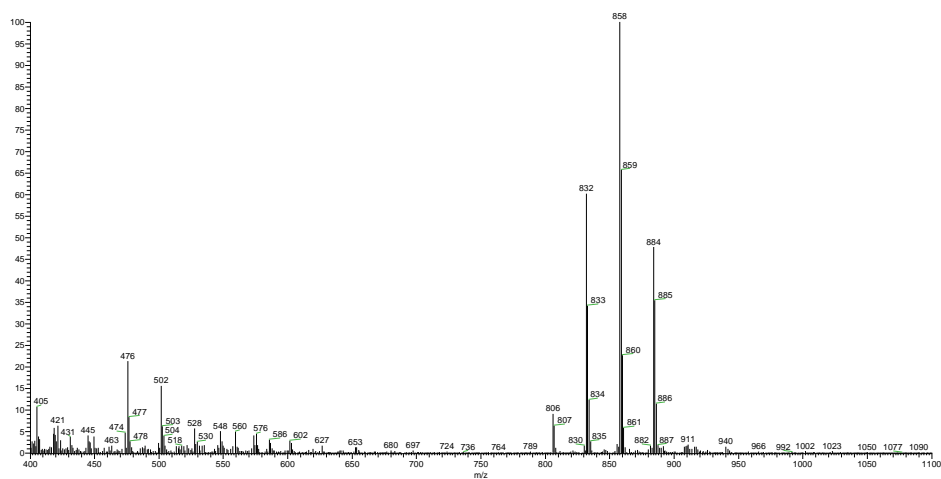


Figura A41. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 4.

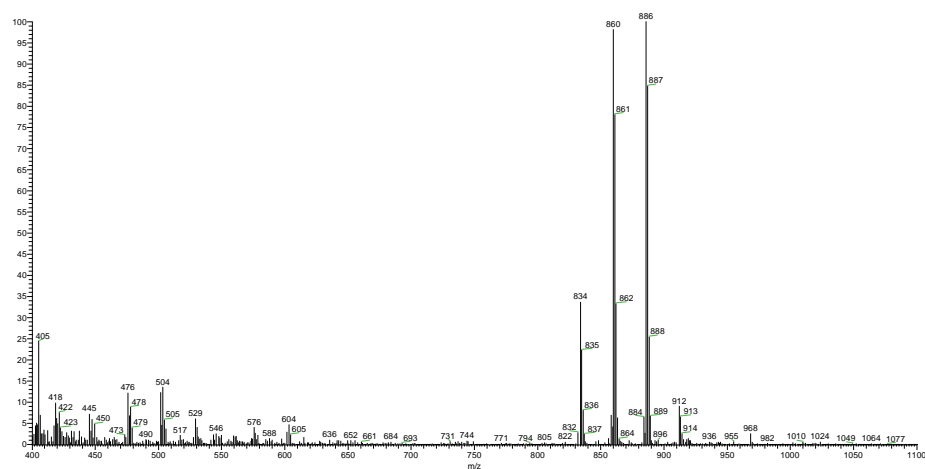


Figura A42. Espectro de HPLC-APCI-MS (modo negativo) pico 5.

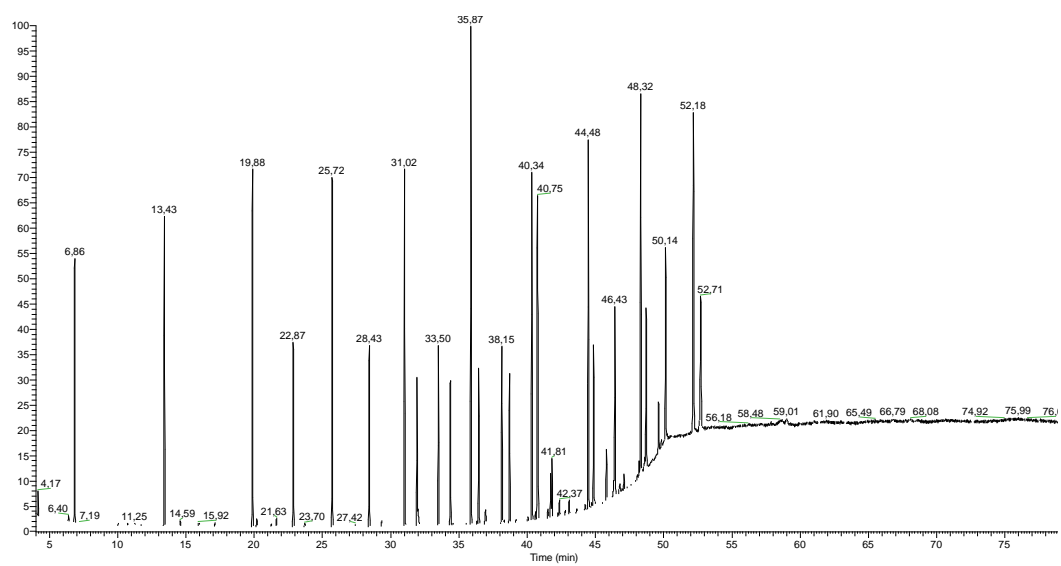


Figura A43. Cromatograma do mix de FAMES.