

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Patrícia Abranches Geraldo

**Determinação dos ácidos eicosapentaenóico, docosaheptaenóico e araquidônico em
amostras de peixes por eletroforese capilar de zona**

Juiz de Fora

2024

Patrícia Abranches Geraldo

Determinação dos ácidos eicosapentaenóico, docosahexaenóico e araquidônico em amostras de peixes por eletroforese capilar de zona

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Juiz de Fora

2024

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Geraldo, Patrícia Abranches.

Determinação dos ácidos eicosapentaenóico, docosahexaenóico e araquidônico em amostras de peixes por eletroforese capilar de zona / Patrícia Abranches Geraldo. -- 2024.

80 f.

Orientador: Marccone Augusto Leal de Oliveira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2024.

1. Ácidos graxos. 2. Eletroforese capilar. 3. Peixes. I. Oliveira, Marccone Augusto Leal de, orient. II. Título.

Patrícia Abranches Geraldo

Determinação dos ácidos eicosapentaenóico, docosahexaenóico e araquidônico em amostras de peixes por eletroforese capilar de zona

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em 30 de julho de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marccone Augusto Leal de Oliveira – Orientador
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Heitor Daguer
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy
Universidade Estadual de Campinas

Juiz de Fora, 25/07/2024.



Documento assinado eletronicamente por **Heitor Daguer, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Helena Teixeira Godoy, Usuário Externo**, em 30/07/2024, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcene Augusto Leal de Oliveira, Professor(a)**, em 30/07/2024, às 12:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uffj (www2.uffj.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **1886385** e o código CRC **82E41F02**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, aos meus pais, por todo carinho, incentivo e apoio.

Ao meu namorado, Luiz Henrique, por todo amor e paciência. Por ter me acompanhado em todos os momentos deste trabalho, nas conquistas e nas frustrações, nos finais de semana e feriados.

Às minhas amigas, da graduação e de antes, pela amizade e pelos conselhos.

Ao meu orientador, Prof. Marcone, por compartilhar seus conhecimentos e sua expertise no estudo de ácidos graxos.

Aos membros do Grupo de Química Analítica e Quimiometria pela convivência incrível. Em especial, agradeço à Jéssica, Maria Patricia e Olívia por todos os ensinamentos que contribuíram infinitamente para a minha formação e pelos momentos especiais que transcenderam o laboratório.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Leandro Wang Hantao, Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo, Dr. Heitor Daguer e Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy pelas contribuições no exame de qualificação e na defesa da minha dissertação.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pela infraestrutura, ao Programa de Pós-Graduação em Química e aos professores e funcionários que foram essenciais nesta trajetória científica.

Agradeço, por fim, às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo financiamento da pesquisa.

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.”

Marie Curie

RESUMO

Os ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), pertencentes à classe ômega 3, e o ácido araquidônico (AA), pertencente à classe ômega 6, são essenciais para a saúde humana. Esses ácidos graxos podem ser encontrados em abundância em alguns peixes. Assim, de modo a contribuir para a avaliação nutricional e controle de qualidade desses alimentos, esse trabalho propõe o desenvolvimento de um método analítico para a determinação de EPA, DHA e AA em salmão e sardinha por eletroforese capilar de zona com detecção direta no UV. A princípio, foi possível constatar que o AA estava abaixo do limite de detecção e quantificação do método. Deu-se assim prosseguimento às análises relacionadas ao EPA e ao DHA. A metodologia otimizada através do planejamento Box-Behnken 3⁴ consiste em um eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 17 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de metanol e 17% v/v de acetonitrila; um capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 30 °C; e detecção em 200 nm. O preparo das amostras foi realizado por meio de uma reação de hidrólise alcalina, conhecida como saponificação, e o tempo de análise foi menor do que 15 minutos. O método foi validado através de algumas figuras de mérito como linearidade ($r = 0,975$ para EPA e $r = 0,988$ para DHA), precisão (RSD < 8%), exatidão ((101,01 ± 10,55)% e (91,23 ± 9,58)% para EPA e DHA, respectivamente, nas amostras de salmão e (104,30 ± 3,17)% e (93,96 ± 7,05)% nas amostras de sardinha), limite de detecção (0,006 mmol L⁻¹ e 0,003 mmol L⁻¹ para EPA e DHA, respectivamente, nas amostras de salmão e 0,005 mmol L⁻¹ e 0,002 mmol L⁻¹ nas amostras de sardinha) e quantificação (0,019 mmol L⁻¹ e 0,011 mmol L⁻¹ para EPA e DHA, respectivamente, nas amostras de salmão e 0,015 mmol L⁻¹ e 0,007 mmol L⁻¹ nas amostras de sardinha). A quantificação dos ácidos graxos foi realizada através do cálculo do fator de resposta. Em geral, o método desenvolvido por CE foi bem sucedido, fornecendo informações não somente em cunho acadêmico, mas também em vertentes sociais no que tange o direito humanitário de acesso à alimentação de qualidade e com alto poder nutritivo.

Palavras-chave: ácido eicosapentaenóico; ácido docosahexaenóico; ácido araquidônico; peixes; eletroforese capilar.

ABSTRACT

Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids, belonging to the omega 3 class, and arachidonic acid (AA), belonging to the omega 6 class, are essential for human health. These fatty acids can be found in abundance in some fish. To contribute to these foods' nutritional assessment and quality control, this work proposes developing an analytical method for determining EPA, DHA, and AA in salmon and sardines by capillary zone electrophoresis with direct UV detection. At first, it was found that AA was below the method's limits of detection and quantification. This led to further analysis of EPA and DHA. The optimized methodology using Box-Behnken 3⁴ design consists of an electrolyte made up of 40 mmol L⁻¹ of TBS (pH 9), 17 mmol L⁻¹ of Brij® 35, 33% v/v of MeOH and 17% v/v of ACN; TSP capillary of 33.5 cm total length (25 cm effective length), 50 µm internal diameter and 375 µm external diameter; hydrodynamic injection of 25 mbar x 5 s; voltage of 27 kV; cartridge temperature of 30 °C; and detection at 200 nm. The samples were prepared using an alkaline hydrolysis reaction, known as saponification, and the analysis time was less than 15 minutes. The method was validated through some figures of merit such as linearity ($r = 0.9752$ for EPA and $r = 0.9870$ for DHA), precision (RSD < 8%), accuracy ((101.01 ± 10.55)% and (91.23 ± 9.58)% for EPA and DHA, respectively, in the salmon samples and (104.30 ± 3.17)% and (93.96 ± 7.05)% in the sardine samples), the limit of detection (0.006 mmol L⁻¹ and 0.003 mmol L⁻¹ for EPA and DHA, respectively, in the salmon samples and 0.005 mmol L⁻¹ and 0.002 mmol L⁻¹ in the sardine samples) and quantification (0.019 mmol L⁻¹ and 0.011 mmol L⁻¹ for EPA and DHA, respectively, in the salmon samples and 0.015 mmol L⁻¹ and 0.007 mmol L⁻¹ in the sardine samples). The fatty acids were quantified by calculating the response factor. In general, the method developed by CE was successful, providing information not only on an academic level but also on a social level about the humanitarian right of access to quality food with high nutritional value.

Keywords: eicosapentaenoic acid; docosahexaenoic acid; arachidonic acid; fish; capillary electrophoresis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação da estrutura de um AG com 18 átomos de carbono: ácido esteárico.	16
Figura 2 – Representação das estruturas de isômeros (A) trans e (B) cis de AGs com 18 átomos de carbono: (A) ácido eláidico e (B) ácido oleico.	18
Figura 3 – Estrutura molecular do ácido linolênico.	19
Quadro 1 – Classificação dos AGs insaturados.	20
Figura 4 – Estrutura molecular do EPA, 20:5 ω 3.	20
Figura 5 – Estrutura molecular do DHA, 22:6 ω 3.	21
Figura 6 – Estrutura molecular do AA, 20:4 ω 6.	21
Figura 7 – Representação esquemática de um equipamento de CE.	25
Figura 8 – Reação de hidrólise alcalina.	28
Figura 9 – Diagrama de distribuição para os AGs de cadeia longa.	29
Figura 10 – Representação esquemática do mecanismo de separação dos AGs.	30
Quadro 2 – Tabela de análise da variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados, onde n_i é o número de repetições no nível i ; m é o número de níveis distintos da variável x ; $n = \sum n_i$ é o número total de medidas; p é o número de parâmetros do modelo. O índice i indica o nível da variável x ; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x . O segundo somatório das expressões para SQ_r , SQ_{ep} e SQ_t vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. \bar{y} é a média de todos os valores de y ; \bar{y}_i é a média das determinações repetidas no nível i ; e \hat{y}_i é valor previsto pelo modelo.	34
Quadro 3 – Cálculo dos valores de $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ para os testes de falta de ajuste e significância da regressão.	35
Figura 11 – Amostras de peixe em tubo de vidro (A) após a adição da solução metanólica de NaOH 0,5 mol L ⁻¹ para posterior (B) aquecimento e refluxo em banho-maria.	41
Quadro 4 – Sequência realizada para a limpeza do capilar entre corridas.	42
Figura 12 – Eletroferogramas dos padrões analíticos de (A) EPA, (B) DHA e (C) AA com concentração de 1 mmol L ⁻¹	44
Figura 13 – Eletroferograma de uma mistura dos padrões analíticos EPA, DHA e AA com concentração de 1 mmol L ⁻¹	45
Figura 14 – Recorte dos eletroferogramas das amostras de (A) salmão e (B) sardinha diluídas na proporção de 1:10 em MeOH.	46

Figura 15 – Espectro UV-Vis do (A) EPA, do (B) DHA e do (C) AA.....	47
Figura 16 – Eletroferogramas da (A) amostra de salmão diluída 1:10 em MeOH com adição de padrão de (B) EPA, (C) DHA e (D) AA com concentração de 1 mmol L ⁻¹	48
Figura 17 – Eletroferogramas da (A) amostra de sardinha diluída 1:10 em MeOH com adição de padrão de (B) EPA, (C) DHA e (D) AA com concentração de 1 mmol L ⁻¹	50
Figura 18 – Eletroferogramas dos experimentos de 1 a 27, conforme Tabela 6 , para o estudo da otimização das condições eletroforéticas.....	54
Figura 19 – Gráfico de Boxplot para o estudo do efeito da concentração de TBS, da concentração de Brij® 35, da voltagem e da temperatura sob a resolução.	57
Figura 20 – Gráfico de Boxplot para o estudo do efeito da concentração de TBS, da concentração de Brij® 35, da voltagem e da temperatura sob o tempo de análise.	58
Figura 21 – Gráfico de dispersão da resolução em função do tempo de análise.....	59
Figura 22 – Eletroferogramas da amostra de salmão diluída 1:10 em MeOH (A) antes e (B) após a adição de padrão de AA com concentração de 0,5 mmol L ⁻¹	60
Figura 23 – Eletroferogramas da amostra de (A) salmão diluída 3:10 em MeOH e (B) sardinha diluída 1:4 em MeOH com adição do PI com concentração de 1 mmol L ⁻¹	62
Figura 24 – Curvas de calibração para determinação de (A) EPA e (B) DHA.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Níveis e fatores utilizados no planejamento Box-Behnken 3^4 para o estudo da otimização das condições eletroforéticas.	52
Tabela 2 – Matriz de planejamento Box-Behnken 3^4 para o estudo da otimização das condições eletroforéticas.	53
Tabela 3 – Níveis de concentração dos AGs na curva analítica.	63
Tabela 4 – Valores dos sinais de resposta para a implementação do modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.	64
Tabela 5 – Parâmetros de linearidade para a determinação de EPA e DHA por CZE-UV.....	66
Tabela 6 – Valores de RSD para o teste de repetibilidade para o experimento 14.....	67
Tabela 7 – Porcentagem de recuperação média para EPA e DHA nas amostras de salmão e sardinha.....	67
Tabela 8 – Valores de LD e LQ para EPA e DHA nas amostras de salmão e sardinha.	68
Tabela 9 – Resultados da quantificação dos AGs em amostras de salmão e sardinha por CZE-UV.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	ácido araquidônico
ACN	acetonitrila
AGs	ácidos graxos
BGE	eletrólito de fundo
Brij® 35	polioxietileno 23 lauril éter
CE	eletroforese capilar
CZE	eletroforese capilar de zona
DAD	detector de arranjo de diodos
DHA	ácido docosahexaenóico
ECL	comprimento de cadeia equivalente
EOF	fluxo eletrosmótico
EPA	ácido eicosapentaenóico
FAME	ésteres metílicos de ácidos graxos
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura
GC-FID	cromatografia gasosa acoplada à detecção de ionização de chama
GQAQ	Grupo de Química Analítica e Quimiometria
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
LD	limite de detecção
LQ	limite de quantificação
MeOH	metanol
NaOH	hidróxido de sódio
pH	potencial hidrogeniônico
pKa	logaritmo da constante de acidez
PI	padrão interno
RSD	desvio padrão relativo
TBS	tetraborato de sódio
UV-Vis	ultravioleta-visível

LISTA DE SÍMBOLOS

$H_{máxima}$	altura máxima do sinal do analito
$H_{mínima}$	altura mínima do sinal do analito
A_A	área do sinal do analito
A_{A+P}	área do sinal do analito mais padrão analítico
A_P	área do sinal do padrão analítico
A_{AG}	área do sinal do ácido graxo
A_{PI}	área do sinal do padrão interno
q	carga do analito ionizado
\vec{E}	campo elétrico aplicado
a	coeficiente angular
ρ	coeficiente de correlação de Pearson
b	coeficiente linear
C_A	concentração do analito na amostra
ε	constante dielétrica
s	desvio padrão amostral
$S_{ruído}$	desvio padrão da linha base
ε_0	erro aleatório associado à determinação de y
F_D	fator de diluição
F_R	fator de resposta
α_0	fração da espécie não dissociada no equilíbrio
α_1	fração da espécie dissociada no equilíbrio
m	massa de amostra
MM_{AG}	massa molecular do ácido graxo
\bar{x}	média aritmética das medições
MQ_{faj}	média quadrática da falta de ajuste
MQ_{reg}	média quadrática de regressão
MQ_{ep}	média quadrática do erro puro
MQ_r	média quadrática residual
$\vec{\mu}_{ep}$	mobilidade eletroforética
$\vec{\mu}_{obs}$	mobilidade eletroforética observada
$\vec{\mu}_{EOF}$	mobilidade eletrosmótica

ω_3	ômega 3
ω_6	ômega 6
ω_7	ômega 7
ω_9	ômega 9
ζ	potencial zeta
r_i	raio iônico
SQ_{faj}	soma quadrática da falta de ajuste
SQ_{reg}	soma quadrática de regressão
SQ_{ep}	soma quadrática do erro puro
SQ_r	soma quadrática residual
SQ_t	soma quadrática total
y	variável dependente
x	variável independente
\vec{v}_{ep}	velocidade eletroforética
\vec{v}_{EOF}	velocidade eletrosmótica
V	volume
η	viscosidade do eletrólito

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OS ÁCIDOS GRAXOS.....	16
1.1.1	Classificação e estrutura química	17
1.1.2	Nomenclatura.....	18
1.1.3	A família ω e suas funções no organismo humano	19
1.1.3.1	<i>Os AGs pertencentes à família ω e o consumo de peixes</i>	<i>21</i>
1.1.4	Método de referência.....	23
1.2	ELETROFORESE CAPILAR.....	24
1.2.1	Princípios da eletroforese capilar	25
1.2.2	Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar	27
1.3	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	30
1.4	VALIDAÇÃO DE UM PROCEDIMENTO ANALÍTICO	31
1.4.1	Linearidade	32
1.1.4.1	<i>Padronização interna e fator de resposta</i>	<i>35</i>
1.4.2	Precisão.....	36
1.4.3	Exatidão.....	36
1.4.4	Limites de detecção e quantificação.....	37
2	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVO GERAL.....	38
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
3	PARTE EXPERIMENTAL.....	39
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES.....	39
3.2	PREPARO DAS AMOSTRAS	40
3.3	INSTRUMENTAÇÃO	41
3.4	PROCEDIMENTO ANALÍTICO	41
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	43
4.1	DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE EPA, DHA E AA EM AMOSTRAS DE PEIXES POR CZE-UV	43
4.1.1	Detecção e identificação dos AGs em amostras de salmão e sardinha	43
4.1.2	Otimização do método para análise de AGs em amostras de salmão.....	51

4.2	AVALIAÇÃO DE FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE EPA E DHA EM AMOSTRAS DE PEIXES POR CZE-UV	61
4.2.1	Linearidade	61
4.2.2	Precisão	66
4.2.3	Exatidão	67
4.2.4	Limites de detecção e quantificação	68
4.3	QUANTIFICAÇÃO DE EPA E DHA EM AMOSTRAS DE SALMÃO E SARDINHA POR CZE-UV	68
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	69
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A – Créditos de disciplinas para integralização do currículo	76
	ANEXO B – Carga horária dedicada a Atividade Prática Docente (Tutoria) ...	76
	ANEXO C – Artigos publicados e em desenvolvimento durante o Mestrado	77
	ANEXO D – Participação em projetos durante o Mestrado	78
	ANEXO E – Participação em banca de Trabalho de Conclusão de Curso	78

1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos (AGs) são imprescindíveis para o funcionamento de diversos órgãos e sistemas que compõem o organismo humano (CURI et al., 2002). Nesse sentido, nos últimos anos, investigou-se bastante a relação entre AGs e a saúde humana (CURI et al., 2002; LIPUT et al., 2021; SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002).

Um dos motivos para este interesse está relacionado com os resultados de estudos epidemiológicos mostrando que populações de esquimós, grandes consumidores dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), ambos do tipo ômega 3 (ω 3), têm incidência mais baixa de doenças inflamatórias e autoimunitárias (KROMANN; GREEN, 1980), além de estudos clínicos que demonstraram os benefícios da suplementação de óleo de peixe, rico em EPA e DHA, sobre condições agudas e crônicas (HARBIGE, 1998; WU; MEYDANI, 1998).

1.1 OS ÁCIDOS GRAXOS

Muitos ácidos carboxílicos foram isolados pela primeira vez a partir de fontes naturais, principalmente gorduras e, por isso, foram denominados ácidos gordos ou AGs (CURI et al., 2002). Sabe-se que, a estrutura fundamental dos lipídeos é composta por AGs ou por estruturas diretamente relacionadas a eles, como álcoois, aldeídos ou aminas, e que essas substâncias ainda são precursoras na formação dos óleos, das gorduras e das ceras, por exemplo.

Os AGs são ácidos carboxílicos que podem ser representados pela forma geral RCOOH. Na maioria das vezes, o grupo R é uma cadeia carbônica longa e não ramificada, com um número par de átomos de carbono, que pode conter nenhuma, uma ou mais duplas ligações (CURI et al., 2002; DE OLIVEIRA et al., 2014). O grupo carboxila constitui a região polar da molécula, e a cadeia R constitui a região apolar (**Figura 1**) (CURI et al., 2002).

Figura 1 – Representação da estrutura de um AG com 18 átomos de carbono: ácido esteárico.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

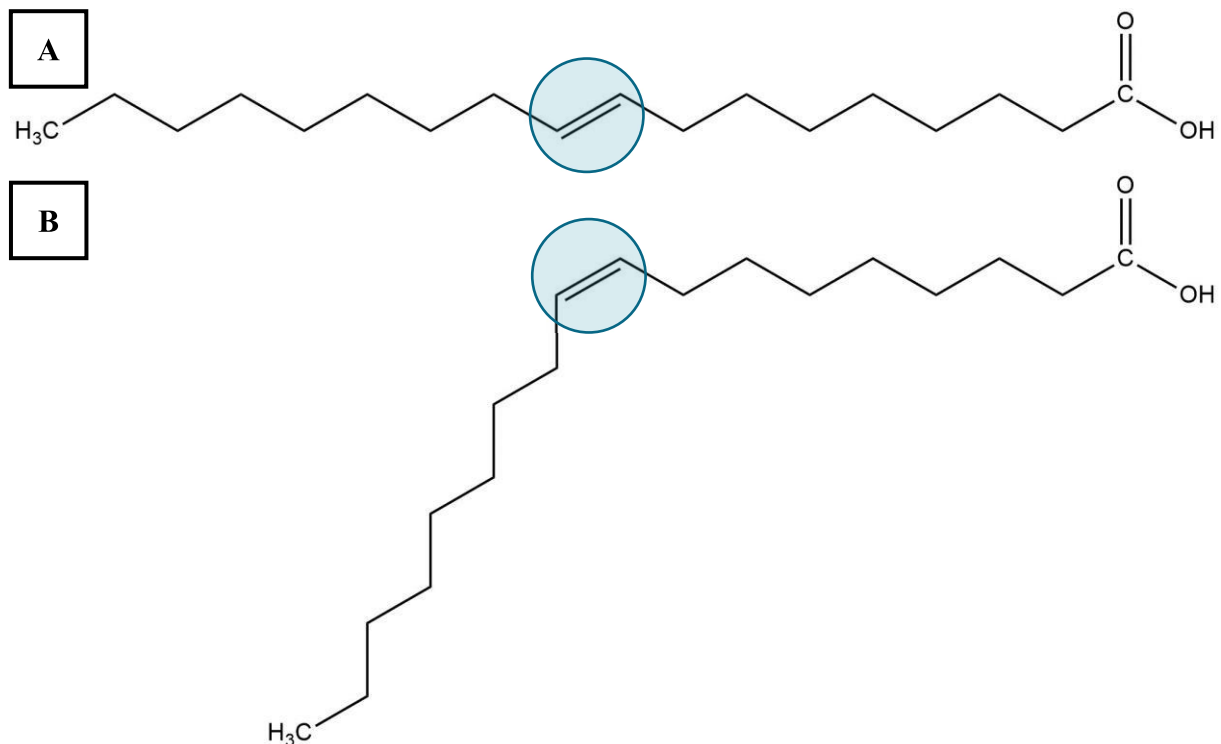
1.1.1 Classificação e estrutura química

O tamanho da cadeia carbônica determina a classificação dos AGs em cadeia curta (dois a quatro átomos de carbono), cadeia média (seis a doze átomos de carbono) e cadeia longa (mais de doze átomos de carbono) (CURI et al., 2002). Para além disso, os AGs também podem ser classificados como saturados (ausência de ligações duplas na cadeia carbônica) ou insaturados (os monoinsaturados contêm uma ligação dupla, enquanto os polinsaturados contêm duas ou mais ligações duplas na cadeia carbônica) (CURI et al., 2002; DE OLIVEIRA et al., 2001, 2014).

As cadeias carbônicas dos AGs saturados podem adotar muitas conformações, mas tendem a ser completamente estendidas pois isso minimiza as repulsões entre os grupos metileno (-CH₂) vizinhos (SOLOMONS; FRYHLE, 2015). Essa conformação linear, que é mais flexível, permite um empacotamento de maneira mais eficiente em cristais, e uma vez que as atrações decorrentes das forças dispersivas são grandes, os AGs saturados têm pontos de fusão relativamente altos. O mesmo acontece com os AGs insaturados que apresentam configuração *trans* das ligações duplas. Em contraste, a configuração *cis* das ligações duplas dos AGs insaturados impõe um dobramento rígido à cadeia carbônica que interfere no empacotamento do cristal, provocando uma redução nas atrações decorrentes das forças de dispersão entre as moléculas. Assim, os AGs insaturados têm pontos de fusão mais baixos (CURI et al., 2002; SOLOMONS; FRYHLE, 2015).

As características físico-químicas dos AGs estão associadas ao comprimento da cadeia carbônica, ao número e à posição das ligações duplas, e às configurações dos isômeros *cis-trans* (**Figura 2**). A este respeito, os AGs são solúveis em solventes orgânicos, fracamente solúveis em água na sua forma não dissociada e moderadamente hidrofílicos como sais (DE OLIVEIRA et al., 2001, 2014). Ademais, o entendimento da estrutura química dos AGs é essencial para o estudo do seu metabolismo e funções no corpo humano (CURI et al., 2002).

Figura 2 – Representação das estruturas de isômeros (A) *trans* e (B) *cis* de AGs com 18 átomos de carbono: (A) ácido elaídico e (B) ácido oleico.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

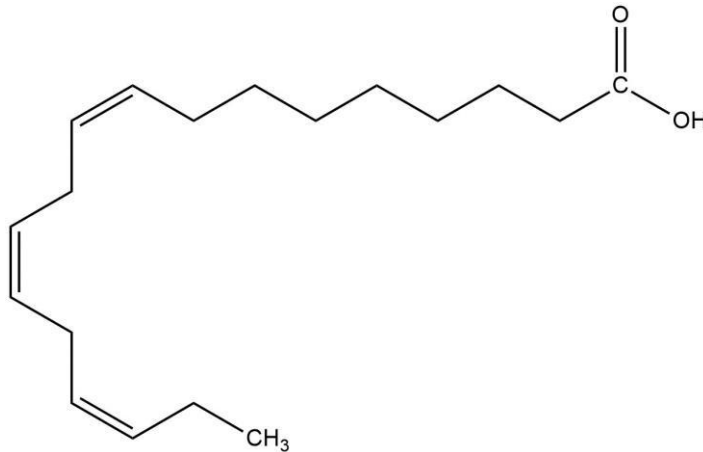
1.1.2 Nomenclatura

Os AGs podem ser identificados por um nome comum, que é geralmente derivado da fonte de origem do ácido, ou por um nome sistemático, que se baseia nas regras de nomenclatura estabelecidas internacionalmente pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*) (CURI et al., 2002). Destacam-se como nomes comuns, por exemplo, o ácido acético (principal constituinte do vinagre, do latim *acetum*), o ácido palmítico (do óleo da palma), o ácido oleico (do óleo de oliva), os ácidos linoleico e linolênico (do óleo da linhaça), o ácido fórmico (do latim *formica*, formiga, parcialmente responsável pela irritação causada pela mordida do inseto) e o ácido butírico (do latim *butirum*, manteiga).

Os nomes sistemáticos dos AGs se iniciam pela palavra ‘ácido’, seguido por um prefixo referente ao número de carbonos da maior cadeia carbônica que contenha a carboxila e, por fim, o sufixo ‘óico’. Os átomos de carbono podem ser numerados a partir da carboxila ou a partir do carbono mais distante da carboxila, possibilitando que a nomenclatura seja abreviada (CURI et al., 2002). Desse modo, o ácido linolênico (**Figura 3**), por exemplo, pode ser escrito como

9,12,15-18:3 ou 18:3 $\Delta^{9,12,15}$, onde o número 18 indica o número de carbonos, o número 3 indica o número de duplas ligações e os números 9, 12 e 15 indicam a posição dessas insaturações, adotando o sistema de numeração partindo da carboxila.

Figura 3 – Estrutura molecular do ácido linolênico.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1.1.3 A família ω e suas funções no organismo humano

Os termos $\omega 3$ e ômega 6 ($\omega 6$), assim como ômega 7 ($\omega 7$) e ômega 9 ($\omega 9$), são utilizados para indicar a posição da primeira ligação dupla presente na estrutura ao numerar a cadeia carbônica partindo do carbono mais distante da carboxila (CURI et al., 2002; VOET et al., 2014). Assim, o ácido linolênico também poderia ser escrito como 18:3 $\omega 3$ pois o terceiro carbono é parte de uma ligação dupla (SOLOMONS; FRYHLE, 2015). Esse sistema de numeração possibilita que diferentes AGs sejam agrupados em classes de acordo com a posição da primeira insaturação na estrutura (**Quadro 1**). Destaca-se ainda que, os AGs de uma determinada classe não podem ser biologicamente convertidos em AGs de uma classe diferente (CURI et al., 2002).

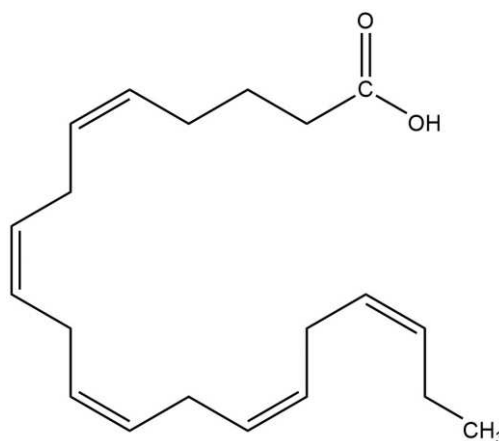
Quadro 1 – Classificação dos AGs insaturados.

Classe	AG parental
$\omega 3$	ácido linolênico, 18:3 $\omega 3$
$\omega 6$	ácido linoleico, 18:2 $\omega 6$
$\omega 7$	ácido oleico, 18:1 $\omega 7$
$\omega 9$	ácido palmitoleico, 16:1 $\omega 9$

Fonte: CURI et al., 2002.

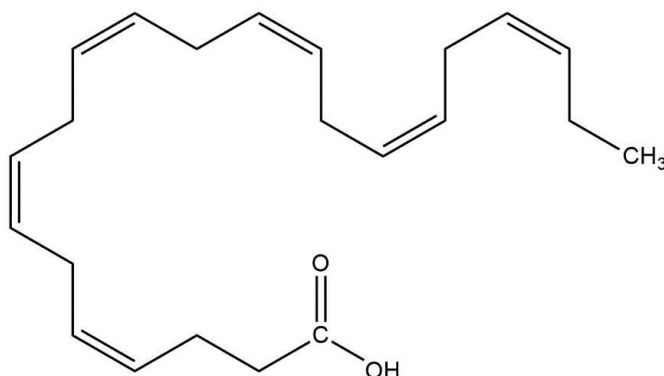
Quase todos os AGs pertencentes à família ω podem ser sintetizados pelo organismo humano, exceto os AGs parentais, que devem ser obtidos na dieta (CURI et al., 2002; KISH-TRIER et al., 2016). Uma vez ingeridos, estes ácidos podem ser convertidos em AGs com cadeias carbônicas maiores através de reações de alongamento e dessaturação.

O ácido linolênico, por exemplo, pode ser convertido em EPA (**Figura 4**) e, posteriormente, em DHA (**Figura 5**), que são fundamentais para a manutenção da estrutura das membranas celulares, função cerebral, transmissão de impulsos nervosos, além de cruciais na regulação de processos metabólicos, de transporte e de excreção (AMORIM et al., 2020; VOET; VOET; PRATT, 2014; BERG et al., 2021). Estudos recentes buscaram avaliar a relação entre a suplementação desses AGs na dieta e as doenças cardiovasculares (RODRIGUEZ et al., 2022), a obesidade e o câncer (D'ANGELO; MOTTI; MECCARIELLO, 2020), a fecundidade (STANHISER et al., 2022), o crescimento de crianças e adolescentes (PARASANNANAVAR et al., 2021) e transtornos mentais, como a depressão (YONEZAWA et al., 2020), por exemplo.

Figura 4 – Estrutura molecular do EPA, 20:5 $\omega 3$.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

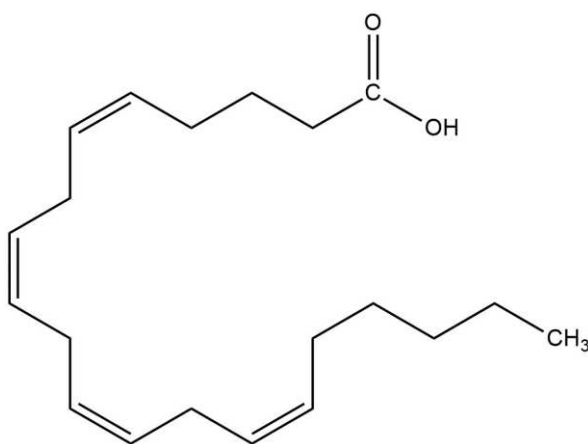
Figura 5 – Estrutura molecular do DHA, 22:6 ω 3.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O ácido linoleico, por sua vez, pode ser convertido em ácido araquidônico (AA) (**Figura 6**), que é essencial para o crescimento, o desenvolvimento neurológico, a visão, a resposta imunológica e a inflamação (CURI et al., 2002; HARAYAMA; SHIMIZU, 2020). Este AG é encontrado em abundância em óleos vegetais e em alimentos como ovos e carnes magras, por exemplo (MARTIN et al., 2006; HANNA; HAFEZ, 2018).

Figura 6 – Estrutura molecular do AA, 20:4 ω 6.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1.1.3.1 Os AGs pertencentes à família ω e o consumo de peixes

Por muito tempo, o ser humano ocidental sobreviveu através de uma dieta que continha uma razão entre a ingestão diária de alimentos fonte de ω 6 e ω 3 (ω 6: ω 3) de 1-2:1, ou seja, as proporções de ambos os tipos de AGs eram bem próximas. No entanto, nos últimos cinquenta anos, essa razão se alterou para 10-20:1, reflexo de uma alimentação que inclui quantidades

significativas de óleos vegetais e um alto consumo de produtos industrializados (BENJAMIM et al., 2019; HERTER-AEBERLI et al., 2019; MANCE et al., 2011).

Existem evidências de que essa ingestão consideravelmente maior de AGs $\omega 6$ tenha impactos negativos sobre a saúde devido a uma alteração no equilíbrio inflamatório. Isso acontece porque os AGs $\omega 3$ e $\omega 6$ competem entre si pela mesma enzima, de modo que suas quantidades relativas podem interferir em seus respectivos metabolismos. Então, por exemplo, um excesso de $\omega 6$ reduz o metabolismo do $\omega 3$, o que acaba comprometendo o sistema imunológico (CHAROENWOODHIPONG et al., 2020; LEMOINE et al., 2020). Diversos pesquisadores propõem que o aumento de doenças da civilização pode estar relacionado a essa mudança para uma dieta mais "pró-inflamatória" (HERTER-AEBERLI et al., 2019).

Neste cenário, visando o equilíbrio na razão entre esses AGs na dieta, a busca por alimentos ricos em AGs $\omega 3$ aumentou consideravelmente nos últimos anos. Dentre estes alimentos, destacam-se os peixes.

Os peixes se destacam de outros alimentos de origem animal por serem ricos em AGs $\omega 3$, como EPA e DHA, apresentarem proteínas de alto valor nutritivo, além de vitaminas (A, B₁₂ e D) e minerais (cálcio, ferro, zinco e iodo) (FAO, 2020; PHILIBERT et al., 2006). Ademais, têm sido utilizados para a alimentação e a subsistência pelo homem há milênios, seja através da pesca extrativa, seja através da aquicultura, que surgiu há aproximadamente 2 mil anos, com o monocultivo de carpas em pequenas represas (BORGHESI et al., 2013).

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, do inglês, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*), em 2022, a produção mundial de animais aquáticos foi de 83%, o que equivale a 185,4 milhões de toneladas. Deste total, 94,4 milhões de toneladas foram provenientes da aquicultura e 91 milhões de toneladas foram provenientes da pesca extrativa. Pela primeira vez, a aquicultura ultrapassou a pesca extrativa na produção de animais aquáticos, representando 51% do total mundial. Além disso, 89% da produção total de animais aquáticos foram destinados a usos alimentícios e o restante foi destinado a usos não alimentícios, principalmente farinha e óleo de peixe. No Brasil, a produção de animais aquáticos foi de 1,496 milhões de toneladas, sendo que, deste total, 758 mil toneladas foram provenientes da pesca extrativa e 738 mil toneladas foram provenientes da aquicultura (FAO, 2020).

O consumo mundial aparente de animais aquáticos, em 2022, foi de 162,5 milhões de toneladas em 2022, sendo observado um crescimento médio anual de 3% ao ano desde 1961, o que supera o crescimento de todas as carnes terrestres combinadas, que foi estimado em 2,7%

ao ano no mesmo período. Ademais, o consumo *per capita* aumentou de 9,1 kg por ano em 1961 para 20,6 kg por ano em 2022 (FAO, 2020).

Neste cenário, a qualidade dos peixes como alimento é indiscutível, sendo avaliada por parâmetros sensoriais, como cor, maciez, sabor, suculência e odor; parâmetros funcionais, como pH e a capacidade de retenção de água; e parâmetros nutricionais, como a quantidade de deposição de gordura, os teores de proteínas, vitaminas e minerais, e o perfil de AGs (BORGHESI et al., 2013). Tudo isso é altamente dependente da composição química do peixe, que é influenciada por fatores genéticos, como espécie e etapa de desenvolvimento; fatores ambientais, como temperatura e sazonalidade; e, especialmente, fatores nutricionais, visto que a composição corporal do peixe é um reflexo da dieta consumida pelo animal (DE SOUZA; ANIDO; TOGNON, 2007; VISENTAINER, 2005).

Foi constatado, por exemplo, que a diferença existente no teor de AGs $\omega 3$ e $\omega 6$ entre espécies marinhas e de água doce é devido as diferentes espécies de fitoplâncton contidos na dieta destes peixes. Além disso, também foi constatado uma variação da composição lipídica entre os peixes provenientes da pesca extrativa e da aquicultura, que possuem uma dieta controlada, seja em função dos custos, seja em função dos valores nutricionais do peixe para o consumidor (BORGHESI et al., 2013; DE SOUZA; ANIDO; TOGNON, 2007; NAVARRO et al., 2010; SUÁREZ-MAHECHA et al., 2002; VISENTAINER, 2005).

Assim, considerando que o consumo de peixe vem sendo associado a um estilo de vida saudável, principalmente devido aos seus teores de AGs, julga-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos eficientes para determiná-los nesses alimentos. Neste trabalho, nós optamos por estudar duas espécies marinhas: o salmão e a sardinha. Além de serem facilmente encontrados na nossa região, estes peixes se destacam por apresentarem preços de aquisição bem diferentes. Nosso intuito foi fornecer informações relevantes para a tomada de decisão no que tange a qualidade e o custo destes alimentos.

1.1.4 Método de referência

O método de referência empregado para a determinação de AGs é a cromatografia gasosa acoplada à detecção de ionização de chama (GC-FID, do inglês, *gas chromatography coupled to flame ionization detection*), oferecendo excelente separação dos analitos e sensibilidade para as análises (AOCS, 2005; AOCS, 2002; ZOTOV; BESSONOV; RISNIK, 2022).

Como por definição essa técnica é aplicável a compostos voláteis, etapas adicionais ao preparo de amostra são necessárias. Assim, a derivatização, que consiste na conversão dos grupos carboxílicos em grupos mais voláteis, como ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês, *fatty acid methyl ester*), é obrigatória, principalmente em análises de AGs de cadeia longa, que apresentam baixa volatilidade. No entanto, essa etapa agrega riscos que podem comprometer a qualidade dos resultados, como a conversão dos AGs em FAME não atingir o rendimento de 100%, a ocorrência de alterações químicas devido a presença de diferentes isômeros de posição e/ou geométricos que modificam o perfil de AGs, assim como a perda de AGs voláteis caso precauções apropriadas sejam omitidas (AMORIM et al., 2019a, 2019b). Além disso, longas colunas específicas podem ser necessárias, resultando em tempos de análise mais longos (GERALDO et al., 2024; OSTERMANN et al., 2014; ZOTOV; BESSONOV; RISNIK, 2022). Considerando este cenário, métodos alternativos para a determinação de AGs vêm sendo propostos, oferecendo exatidão e precisão compatíveis com o método oficial, além de um preparo de amostra mais simples, mesmo em amostras que apresentem complexidade relevante (AMORIM et al., 2019b).

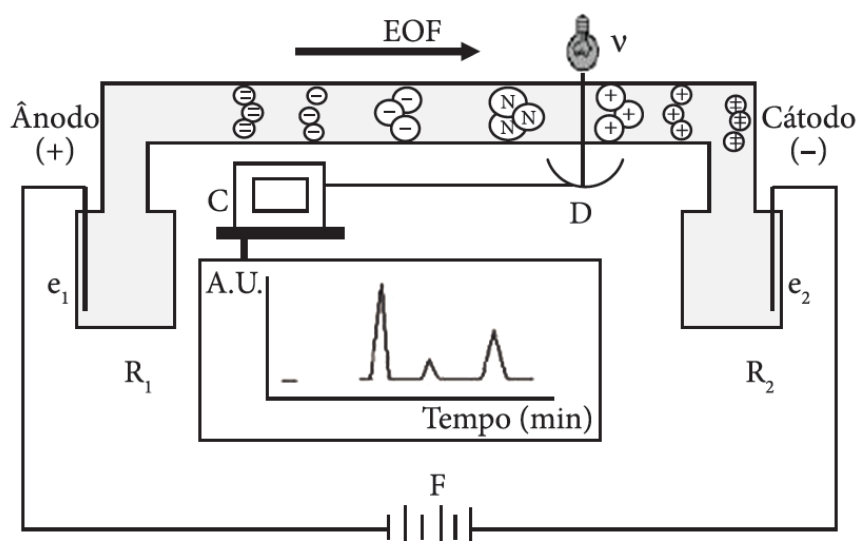
1.2 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese capilar (CE, do inglês, *capillary electrophoresis*) vem se destacando na comunidade científica, desde a década de 1990, como uma alternativa na determinação da composição de AGs em diversos tipos de amostras, inclusive em alimentos e em matrizes biológicas (AMORIM et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2014; GERALDO et al., 2024). Quando comparada a outras técnicas, apresenta algumas vantagens como curto tempo de análise, além de serem necessários pequenos volumes de amostra e de solventes orgânicos, o que vai ao encontro aos princípios que descrevem a Química Verde (QUEIROZ & JARDIM, 2001; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

A CE é uma técnica de separação, que opera em meio líquido, baseada na migração diferenciada de compostos neutros, íons solvatados ou espécies ionizáveis, mediante a aplicação de um campo elétrico à um tubo de dimensões capilares preenchido com solução eletrolítica (BAKER, 1995; SKOOG et al., 2006). Para isso, apresenta uma instrumentação simples (**Figura 7**), consistindo em, basicamente, um sistema de injeção, o tubo capilar onde ocorre a separação, reservatórios para as soluções (R_1 e R_2), um par de eletrodos (e_1 e e_2), uma fonte de alta tensão (F), um detector (D) e um computador (C) para controle, aquisição e

tratamento dos dados (SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012).

Figura 7 – Representação esquemática de um equipamento de CE.



Fonte: SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012.

Existem diversos modos de operação em CE, como a cromatografia eletrocínica micelar, a eletroforese capilar em gel, a cromatografia eletrocínica e a isotacoforese capilar. No entanto, o mais utilizado é a eletroforese capilar de zona (CZE, do inglês, *capillary zone electrophoresis*), que permite a separação simultânea de cátions, ânions ou espécies ionizáveis em uma mesma corrida. Nesse modo de operação, o detector mais utilizado é o espectrofotométrico de absorção no ultravioleta-visível (UV-Vis), mas outros detectores são compatíveis com a técnica (BAKER, 1995; QUEIROZ; JARDIM, 2001; TAVARES, 1997; VAZ; DE OLIVEIRA; DE OLIVEIRA, 2015).

1.2.1 Princípios da eletroforese capilar

O funcionamento de um equipamento de CE envolve, geralmente, a aplicação de alta voltagem no interior de um capilar de diâmetro reduzido, que possui uma alta resistência elétrica, gerando corrente em seu interior (BAKER, 1995; QUEIROZ; JARDIM, 2001). O preenchimento do capilar é feito com uma solução tampão ou de eletrólitos, denominada eletrólito de fundo (BGE, do inglês, *background electrolyte*) e suas extremidades imersas na mesma solução, juntamente com os eletrodos, a fim de fechar o circuito (QUEIROZ; JARDIM,

2001). Ademais, o capilar é mantido dentro de um cartucho sob temperatura constante, para minimizar os efeitos térmicos.

Os capilares mais utilizados em CE são os de sílica fundida, caracterizada pela presença de vários grupos silanóis (-SiOH), que apresentam caráter ácido (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Esses grupos são ionizados a grupos silanoato (-SiO⁻) quando entram em contato com a solução de eletrólito com pH elevado, e com isso, a superfície interna do capilar se torna carregada negativamente. Essa superfície atrai os cátions do eletrólito, formando uma camada denominada camada fixa. Como esses cátions não são suficientes para neutralizar a superfície do capilar, forma-se uma segunda camada de cátions próxima à primeira, denominada camada móvel, gerando uma dupla camada difusa (BAKER, 1995; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

Quando um campo elétrico é aplicado tangencialmente à superfície do capilar, os cátions que compõem a camada móvel são atraídos em direção ao catodo. Como esses íons transportam moléculas de água, por estarem solvatados, a solução de eletrólito é arrastada, causando o que se chama de fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês, *electroosmotic flow*) (QUEIROZ; JARDIM, 2001; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). A magnitude do EOF pode ser expressa em termos de velocidade (\vec{v}_{EOF}), em cm s⁻¹, ou de mobilidade ($\vec{\mu}_{EOF}$), em cm² V⁻¹ s⁻¹, como pode ser visto na **Equação 1** e **Equação 2**, respectivamente.

$$\vec{v}_{EOF} = \left(\frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \right) \vec{E} \quad (1)$$

$$\vec{\mu}_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (2)$$

onde ε é a constante dielétrica; η é a viscosidade do eletrólito; \vec{E} é o campo elétrico aplicado; e ζ é o potencial zeta, sendo determinado essencialmente pela carga da superfície do capilar, que é dependente do potencial hidrogeniônico (pH) do eletrólito.

A separação dos analitos acontece pela diferença da velocidade de migração entre eles na presença de um campo elétrico (SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Essa velocidade, denominada velocidade eletroforética (\vec{v}_{ep}) (**Equação 3**), é dependente da mobilidade eletroforética ($\vec{\mu}_{ep}$) (**Equação 4**), intrínseca a cada analito, e do campo elétrico aplicado. Assim, quanto maior a razão carga/raio, ou seja, quanto menor e mais carregada a espécie, maior a $\vec{\mu}_{ep}$

do íon para um dado campo elétrico e eletrólito usado, resultando em uma velocidade maior (BAKER, 1995; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

$$\vec{v}_{ep} = \vec{\mu}_{ep}\vec{E} \quad (3)$$

$$\vec{\mu}_{ep} = \frac{q}{6\pi\eta r_i} \quad (4)$$

onde \vec{E} é o campo elétrico aplicado; q é a carga do analito ionizado; η é a viscosidade da solução; e r_i é o raio iônico.

A ordem de detecção dos analitos será definida pela mobilidade eletroforética observada ($\vec{\mu}_{obs}$), que é a soma vetorial entre $\vec{\mu}_{EOF}$ e $\vec{\mu}_{ep}$ (**Equação 5**). Sob condições normais, o EOF é do ânodo para o catodo. Assim, ânions serão conduzidos em direção ao catodo uma vez que o fluxo gerado pode ser consideravelmente maior que as mobilidades eletroforéticas (QUEIROZ; JARDIM, 2001; SPUDEIT; DOLZAN; MICKE, 2012). Por migrarem na mesma direção, ânions, neutros e cátions serão detectados na mesma corrida: cátions migram mais rápido, sofrendo atração pelo catodo, neutros são arrastados na \vec{v}_{EOF} e não são separados e ânions migram mais lentamente, sofrendo atração pelo ânodo, mas são arrastados pelo EOF em direção ao catodo (BAKER, 1995; QUEIROZ; JARDIM, 2001).

$$\vec{\mu}_{obs} = \vec{\mu}_{EOF} + \vec{\mu}_{ep} \quad (5)$$

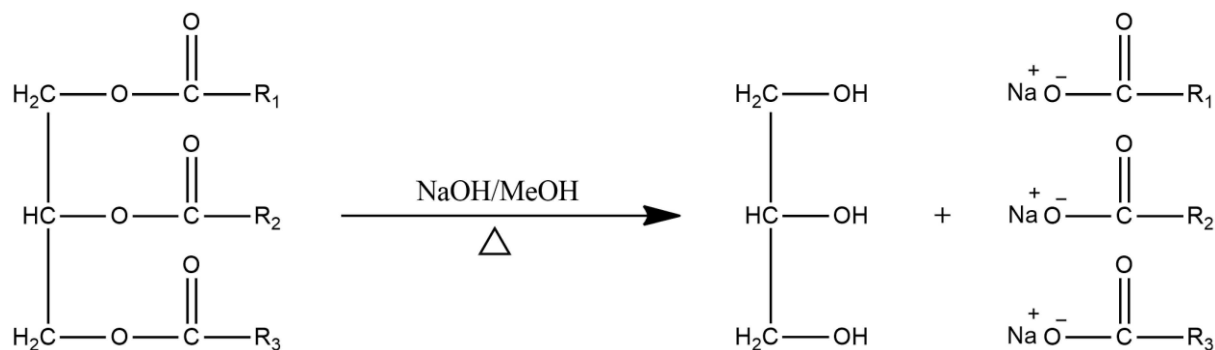
Ao alcançarem o detector, ocorre um aumento do sinal medido que é registrado no formato de picos. A visualização desses picos é possível em um gráfico de sinal em função do tempo de migração, chamado eletroferograma (QUEIROZ; JARDIM, 2001). A natureza deste sinal varia com o tipo de detector empregado na análise.

1.2.2 Análise de ácidos graxos por eletroforese capilar

Geralmente, os AGs estão presentes nas amostras na forma de triacilglicerídeos. Assim, é necessária a dissociação de AGs do glicerol para analisá-los na forma livre. Para isso, é realizada uma reação de hidrólise alcalina, conhecida como saponificação (**Figura 8**). Nessa reação, é adicionada à amostra uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) dissolvido em

metanol (MeOH), formando os respectivos sais de AGs, que são espécies carregadas negativamente em solução (DUARTE et al., 2020; BARRA, 2014), condição necessária para uma separação eficiente por CE.

Figura 8 – Reação de hidrólise alcalina.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nesse sentido, é imprescindível ter conhecimento sobre a faixa de pH em que essas espécies se apresentam na forma carregada para que se mantenham assim durante as análises. Por possuir baixa solubilidade em água, não é possível medir o logaritmo da constante de acidez (pKa) real dessas substâncias. Contudo, é comumente considerado um valor de pKa aparente para essas situações. O valor frequentemente estabelecido pela literatura para os AGs de cadeia longa é de aproximadamente 5 (DE OLIVEIRA et al., 2014).

Uma ferramenta para avaliar o comportamento das espécies em solução é o diagrama de distribuição, que descreve a composição de uma solução em função do pH, sendo possível prever a fração da espécie que está não dissociada (α_0) e dissociada (α_1) no equilíbrio. Ambas as frações são calculadas utilizando uma expressão obtida através da combinação entre a constante de equilíbrio e o balanço de massa, dadas pela **Equação 6** e pela **Equação 7** (SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2012).

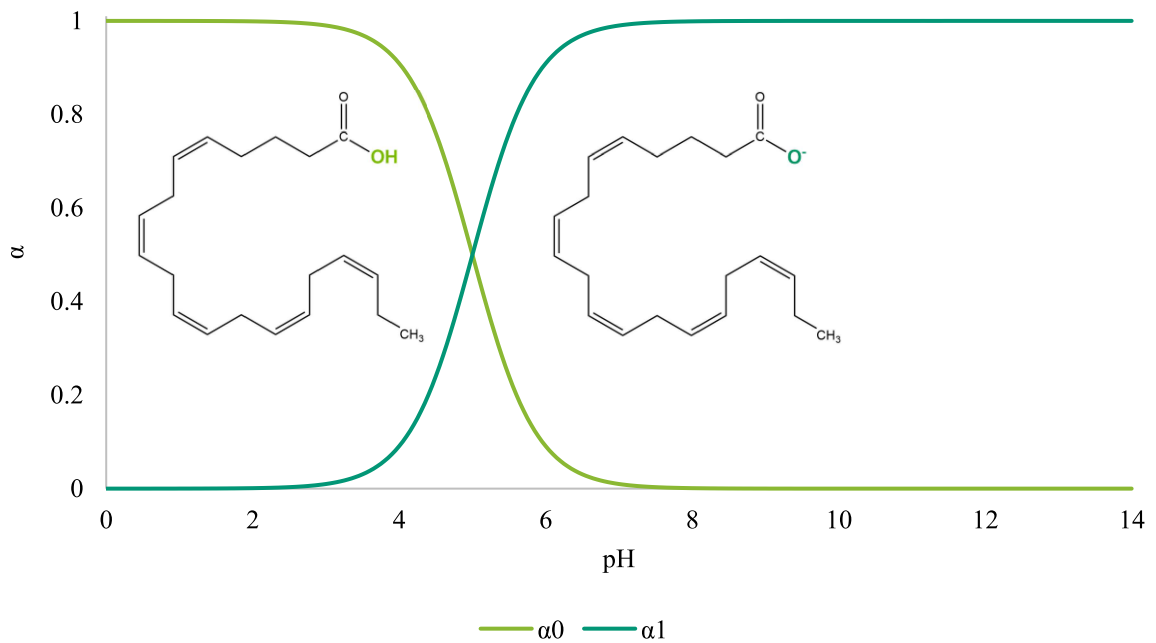
$$\alpha_0 = \frac{10^{-pH}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \quad (6)$$

$$\alpha_1 = \frac{10^{-pKa}}{10^{-pH} + 10^{-pKa}} \quad (7)$$

Tomando o valor de pKa aparente igual a 5, é possível obter uma boa aproximação do comportamento dos AGs em solução através do diagrama de distribuição (**Figura 9**). Observa-se que, quando o pH é menor que o pKa, ou seja, menor do que 5, a forma predominante dos

AGs é neutra. No entanto, à medida que o pH do meio aumenta, a fração de espécies aniônicas também aumenta. Assim, para valores de pH acima de 7, é possível garantir que todas as espécies estejam desprotonadas.

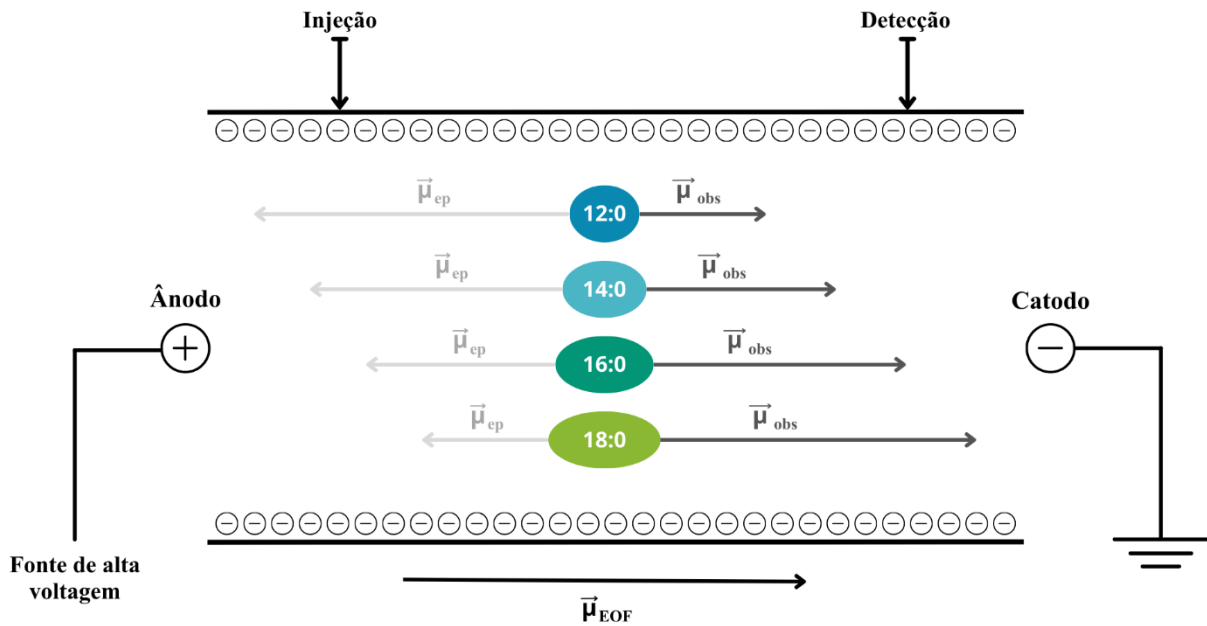
Figura 9 – Diagrama de distribuição para os AGs de cadeia longa.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Na separação dos AGs, a $\vec{\mu}_{ep}$ dos analitos está na direção oposto ao EOF pois as espécies carregadas negativamente tendem a migrar em direção ao ânodo (**Figura 10**). No entanto, a $\vec{\mu}_{EOF}$ é direcionada para o catodo. Assim, esses analitos, que apresentam uma mobilidade mais baixa, são arrastados pelo fluxo, alcançando o detector.

Figura 10 – Representação esquemática do mecanismo de separação dos AGs.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Geralmente, os AGs são monocarboxílicos. Desse modo, possuem a mesma carga de ionização. Portanto, os diferentes tamanhos, que resultam em diferentes raios de solvatação, proporcionam a separação desses AGs, que atingem o detector em diferentes momentos. Assim, os AGs com os maiores raios de solvatação migram primeiro, pois têm a maior $\vec{\mu}_{obs}$. A ordem de migração dos AGs que possuem insaturações pode ser prevista pelo cálculo do comprimento de cadeia equivalente (ECL, do inglês, *equivalent chain length*) (**Equação 8**), inicialmente proposto para técnicas cromatográficas (AMORIM et al., 2021).

$$ECL = NC - 2N(C = C) \quad (8)$$

onde NC é o número de carbonos da cadeia carbônica e $N(C = C)$ é o número de insaturações presentes na estrutura do AG.

1.3 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

Durante o desenvolvimento de um método por CE algumas variáveis precisam ser otimizadas, como a composição e a concentração do eletrólito, bem como as condições instrumentais, incluindo a voltagem aplicada, a temperatura do cartucho, a quantidade de amostra injetada e o comprimento e diâmetro do capilar. Com base nisso, o planejamento de

experimentos é estabelecido como um instrumento poderoso neste processo (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001; GERALDO et al., 2024).

O planejamento de experimentos é uma abordagem sistemática para definir e conduzir experimentos de modo a otimizar a obtenção de informações com o mínimo de recursos e esforços aplicados. Nesse sentido, o delineamento do planejamento pode ser realizado de várias maneiras. A maneira mais simples é o planejamento fatorial, onde todas as combinações possíveis dos k níveis de N variáveis são investigadas, resultando em N^k experimentos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). Essa é a ferramenta mais indicada quando se deseja determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma outra variável de interesse.

Muitas vezes, essa abordagem não é ideal pois o aumento da complexidade do sistema estudado acarreta um aumento do número de experimentos que devem ser realizados. Como alternativa, podem ser feitas simplificações nos modelos para a aplicação de planejamentos fatorial fracionados ou a metodologia de superfície de resposta (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001). O planejamento Box-Behnken, por exemplo, é uma metodologia de superfície de resposta na qual não há necessidade de realizar experimentos nos pontos extremos do espaço experimental. O número de experimentos é, portanto, menor do que o de um planejamento fatorial completo. Para isso, cada variável é estudada em 3 níveis: baixo (-1), médio (0) e alto (+1), com o número total de experimentos determinado por $2n(n - 1) + C_0$, onde C_0 é o número de réplicas no ponto central para avaliar a variabilidade experimental (FERREIRA et al., 2007).

1.4 VALIDAÇÃO DE UM PROCEDIMENTO ANALÍTICO

A validação de método é o processo que demonstra que um método analítico é aceitável para a finalidade a que se destina. É um modo de garantir que os dados gerados são confiáveis e interpretáveis sobre a amostra (BRASIL, 2017; HARRIS, 2012; RIBANI et al., 2004).

Os parâmetros de desempenho analítico ou figuras de mérito considerados para a validação de métodos de separação incluem, quando aplicável, a linearidade e a faixa de aplicação, a seletividade, a precisão, a exatidão, o limite de detecção (LD), o limite de quantificação (LQ) e a robustez (INMETRO, 2017; RIBANI et al., 2004). Neste trabalho, avaliou-se linearidade, precisão, exatidão, LD e LQ. A definição de cada um destes parâmetros será abordada nas seções seguintes.

1.4.1 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico de fornecer resultados que são diretamente proporcionais à concentração do analito em uma amostra dentro de uma faixa específica (HARRIS, 2012; PIMENTEL; NETO, 1996; RIBANI et al., 2004). Como a concentração de um analito não é uma grandeza física observável, é necessário realizar medidas de outras grandezas para obtê-la. A calibração, portanto, consiste em encontrar uma função que relacione as medidas realizadas com a concentração procurada (PIMENTEL; NETO, 1996).

Normalmente, o processo de calibração envolve duas etapas: a etapa descritiva e a etapa preditiva. A etapa descritiva, considerada a etapa lenta, consiste em realizar medidas em uma série de padrões analíticos com concentrações conhecidas, a fim de construir um modelo matemático que relacione a grandeza medida com a concentração do analito. A etapa preditiva, por sua vez, consiste em utilizar esse modelo matemático para prever as concentrações de outras amostras, a partir de seus respectivos sinais analíticos (PIMENTEL; NETO, 1996).

Este modelo matemático, muitas vezes, pode ser expresso como uma equação de reta chamada de curva analítica, que descreve uma relação linear entre uma variável aleatória y , que corresponde ao sinal ou a resposta dada por um instrumento, e uma variável x , que corresponde a concentração da espécie química de interesse, como mostra a **Equação 9** (PIMENTEL; NETO, 1996; RIBANI et al., 2004).

$$y = ax + b + \varepsilon_0 \quad (9)$$

onde a e b são denominados coeficiente angular e coeficiente linear da curva analítica, respectivamente, e ε_0 é o erro aleatório associado à determinação de y .

O método dos mínimos quadrados é o modo mais utilizado para se ajustar um modelo matemático a um conjunto de dados por minimizar a soma dos quadrados das diferenças entre os valores observados e os valores previstos. Estas diferenças são denominadas resíduos. Em resumo, é possível obter corretamente uma máxima proximidade entre a curva analítica e os pontos experimentais e, conseqüentemente, estimar os coeficientes a e b , assim como o coeficiente de correlação r . Este último parâmetro permite uma avaliação da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais (PIMENTEL; NETO, 1996; RIBANI et al., 2004).

O tratamento estatístico dos resultados obtidos com o método dos mínimos quadrados requer que algumas suposições sobre a natureza dos erros associados às medidas sejam válidas.

A primeira suposição diz que os únicos erros nas medidas são devidos a flutuações no sinal analítico (variável y). Assim, caso a concentração (variável x) esteja sujeita a erros, estes devem ser desprezíveis quando comparados com os erros em y . Isto é satisfeito quando os padrões analíticos são preparados com o máximo de cuidado. A segunda suposição diz que os erros aleatórios devem ter variância constante, o que é conhecido como homoscedasticidade. Para verificar se essa hipótese é satisfeita, testes estatísticos como o de Cochran são utilizados após realizar determinações de réplicas autênticas em um mesmo conjunto de padrões ou amostras. A terceira suposição diz que os erros aleatórios não são correlacionados, ou seja, são independentes. Isso é verificado pelo teste de Durbin-Watson, por exemplo. Para não violar essa suposição, é necessário preparar os padrões analíticos separadamente e de maneira semelhante em cada nível de concentração. É válido destacar que, a recomendação é de que a linearidade seja estabelecida com a utilização de, no mínimo, cinco níveis de concentração, em triplicata. Ademais, a resposta analítica dos padrões deve ser medida de forma aleatória, de modo a evitar a associação de possíveis desvios sistemáticos a determinadas concentrações. Por fim, a última suposição diz que os erros devem seguir uma distribuição normal. Para verificar se essa hipótese é satisfeita, testes estatísticos como o de Shapiro-Wilk são utilizados (PIMENTEL; NETO, 1996; RIBANI et al., 2004).

A validade do modelo matemático e a significância estatística da curva analítica ajustada podem ser testadas por meio da análise de variância (**Quadro 2**) (PIMENTEL; NETO, 1996; RIBANI et al., 2004). Assim, são estabelecidas duas hipóteses: a hipótese nula diz que a equação da reta é adequada para descrever os dados e a hipótese alternativa diz que a equação da reta não é adequada. Em seguida, são realizados dois testes. O teste da falta de ajuste verifica se existe uma relação linear dentro de cada nível de concentração e o teste da significância da regressão verifica a existência de uma relação linear significativa entre as variáveis x e y (PIMENTEL; NETO, 1996).

Quadro 2 – Tabela de análise da variância para o ajuste de um modelo pelo método dos mínimos quadrados, onde n_i é o número de repetições no nível i ; m é o número de níveis distintos da variável x ; $n = \sum n_i$ é o número total de medidas; p é o número de parâmetros do modelo. O índice i indica o nível da variável x ; o índice j refere-se às medidas repetidas da variável y em um dado nível de x . O segundo somatório das expressões para SQ_r , SQ_{ep} e SQ_t vai de $j = 1$ até $j = n_i$. Os outros somatórios vão de $i = 1$ até $i = m$. \bar{y} é a média de todos os valores de y ; \bar{y}_i é a média das determinações repetidas no nível i ; e \hat{y}_i é valor previsto pelo modelo.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade (v)	Média quadrática
Regressão	$SQ_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$p - 1$	$MQ_{reg} = SQ_{reg}/(p - 1)$
Residual	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	$n - p$	$MQ_r = SQ_r/(n - p)$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	$m - p$	$MQ_{faj} = SQ_{faj}/(m - p)$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	$n - m$	$MQ_{ep} = SQ_{ep}/(n - m)$
Total	$SQ_t = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	$n - 1$	

Fonte: ADRIANO et al., 2024; PIMENTEL; NETO, 1996.

A interpretação dos resultados de ambos os testes está relacionada com os valores de $F_{calculado}$, $F_{tabelado}$, conforme ilustra o **Quadro 3**, e o estabelecimento das hipóteses. Assim, para não rejeitarmos a hipótese nula, ou seja, para que o modelo possa ser utilizado para a quantificação de analitos em amostras, é necessário que $F_{calculado}$ seja menor do que o $F_{tabelado}$ no teste da falta de ajuste, e que o $F_{calculado}$ seja maior do que o $F_{tabelado}$ no teste da significância da regressão, indicando que há ausência de falta de ajuste no modelo e que existe uma relação linear significativa entre as variáveis x e y (PIMENTEL; NETO, 1996; RIBANI et al., 2004).

Quadro 3 – Cálculo dos valores de $F_{calculado}$ e $F_{tabelado}$ para os testes de falta de ajuste e significância da regressão.

Falta de ajuste	Significância de regressão
$F_{calculado} = MQ_{faj}/MQ_{ep}$	$F_{calculado} = MQ_{reg}/MQ_r$
$F_{tabelado} = F_{vfaj,vep}$	$F_{tabelado} = F_{vreg,vr}$

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

1.1.4.1 Padronização interna e fator de resposta

A quantificação dos analitos pode ser realizada através de diferentes métodos, como a padronização externa, a padronização interna, a superposição de matriz e a adição de padrão (SKOOG et al., 2006; HARRIS, 2012; RIBANI et al., 2004). Considerando o efeito de matriz, devido à complexidade das amostras de salmão e sardinha estudadas, optou-se por utilizar neste trabalho a padronização interna.

O método de padronização interna consiste em adicionar uma quantidade conhecida de uma substância de referência, denominada padrão interno (PI), a todos padrões, amostras e brancos. A calibração envolve, então, colocar em um gráfico a razão entre o sinal do analito e o sinal do PI em função da concentração do analito nos padrões. Assim, essa razão para as amostras é usada para obter a concentração do analito a partir da curva de calibração (SKOOG et al., 2006; SKOOG; HOLLER; NIEMAN, 2002).

Ademais, comprovada a validade do modelo matemático e a significância estatística da curva analítica ajustada por meio da análise de variância, o coeficiente a pode ser utilizado como fator de resposta (F_R) na **Equação 10** para quantificar os AGs de interesse (AMORIM et al., 2020).

$$\% AG = \frac{[PI] \times V \times MM_{AG} \times F_D \times A_{AG}}{A_{PI} \times F_R \times m} \quad (10)$$

onde $[PI]$ é a concentração do padrão interno; V é o volume, em litros; MM_{AG} é a massa molecular do ácido graxo; F_D é o fator de diluição; A_{AG} é a área do sinal do ácido graxo; A_{PI} é a área do sinal do padrão interno; e m é a massa de amostra, em gramas.

1.4.2 Precisão

A precisão representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes e repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (RIBANI et al., 2004). É avaliada pela estimativa do desvio padrão relativo (RSD, do inglês, *relative standard deviation*), calculado pela **Equação 11**.

$$RSD (\%) = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (11)$$

onde s é o desvio padrão amostral; e \bar{x} é a média aritmética das medições.

A precisão pode ser considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Neste trabalho, considerou-se apenas a repetibilidade, que representa a concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição (RIBANI et al., 2004).

1.4.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico representa o grau de concordância entre os resultados individuais em um determinado ensaio e um valor de referência (RIBANI et al., 2004). Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão são a análise de materiais de referência certificados, a comparação de um método em desenvolvimento e um método de referência, ensaios de recuperação e adição de padrão (HARRIS, 2012; RIBANI et al., 2004). Neste trabalho, ensaios de recuperação foram realizados com este propósito.

A recuperação, neste caso, consiste em fortificar a amostra com o padrão analítico do analito em três níveis de concentração: alto (correspondente ao nível A da curva analítica), intermediário (correspondente ao nível C da curva analítica) e baixo (correspondente ao nível E da curva analítica). A porcentagem de recuperação é dada pela **Equação 12** (RIBANI et al., 2004).

$$Recuperação (\%) = \frac{A_{A+P} - A_A}{A_P} \quad (12)$$

onde A_{A+P} corresponde à área do analito na amostra após a adição do padrão; A_A corresponde à área do analito na amostra; e A_P corresponde à área da espécie de interesse no padrão.

1.4.4 Limites de detecção e quantificação

O LD é a menor concentração do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. Por sua vez, o LQ é a menor concentração do analito presente na amostra que pode ser determinada, também sob condições experimentais estabelecidas. Ambos podem ser determinados pelo método visual, pelo método da relação sinal-ruído ou pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica (FARIA et al., 2008; RIBANI et al., 2004). Neste trabalho utilizou-se o método da relação sinal-ruído por meio da **Equação 13** e da **Equação 14**.

$$LD \text{ (mmol L}^{-1}\text{)} = \frac{3 \times s_{\text{ruído}} \times C_A}{(H_{\text{máxima}} - H_{\text{mínima}})} \quad (13)$$

$$LQ \text{ (mmol L}^{-1}\text{)} = \frac{10 \times s_{\text{ruído}} \times C_A}{(H_{\text{máxima}} - H_{\text{mínima}})} \quad (14)$$

onde $s_{\text{ruído}}$ corresponde ao desvio padrão da linha base; C_A corresponde à concentração do analito na amostra; $H_{\text{máxima}}$ corresponde à altura máxima do sinal do analito; e $H_{\text{mínima}}$ corresponde à altura mínima do sinal do analito.

2 OBJETIVOS

Nesta seção serão apresentados o objetivo geral desse trabalho, bem como os objetivos específicos.

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e otimizar um método por eletroforese capilar de zona com detecção direta no UV para separação simultânea dos ácidos eicosapentaenóico (EPA), docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA) em amostras de espécies marinhas, como salmão e sardinha.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) verificar a detecção dos ácidos graxos utilizando um método de referência;
- b) identificar os sinais encontrados nas amostras de salmão e sardinha através da adição de padrão de EPA, DHA e AA pelo método “*on column*”;
- c) otimizar o preparo de amostra e a fase pré-analítica;
- d) utilizar a quimiometria através da aplicação de planejamento de experimentos para a otimização do método desenvolvido e do eletrólito de corrida;
- e) otimizar a limpeza do capilar entre as corridas;
- f) avaliar algumas figuras de mérito para validação do método otimizado;
- g) quantificar EPA, DHA e AA em amostras de salmão e sardinha.

3 PARTE EXPERIMENTAL

Nesta seção serão apresentados os materiais necessários para a realização dos experimentos, os protocolos para preparo das amostras e as condições instrumentais utilizadas para as análises.

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes e padrões utilizados foram de grau analítico. Acetonitrila P.A. (ACN), MeOH P.A., polioxietileno 23 lauril éter (Brij® 35) e NaOH P.A. foram obtidos na Neon Comercial (Suzano, São Paulo, Brasil). Tetraborato de sódio (TBS) e os padrões analíticos dos ácidos 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico (EPA), *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (DHA) e araquidônico (AA) foram obtidos na Sigma-Aldrich (Cotia, São Paulo, Brasil). A água foi purificada por deionização (Sistema Milli-Q, Mollipores, Bedford, USA).

As soluções estoque dos padrões de AGs foram preparadas em MeOH e armazenadas em tubos *falcon* de 15 mL em congelador sob temperatura de -18 °C até o momento das análises, nas concentrações de 6,61 mmol L⁻¹ para o EPA, 15,22 mmol L⁻¹ para o DHA e 6,57 mmol L⁻¹ para o AA. No dia da realização das análises, essas soluções foram diluídas em MeOH para a concentração de interesse diretamente nos *vials* de injeção.

As soluções estoque de TBS, na concentração de 120 mmol L⁻¹, e de Brij® 35, na concentração de 100 mmol L⁻¹, foram preparadas em água deionizada e armazenadas em temperatura ambiente. Ambas foram utilizadas para o preparo da solução de eletrólito, contendo 40 mmol L⁻¹ de TBS, 17 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN, também preparado em água deionizada e armazenado em geladeira sob temperatura de 4 °C até o momento das análises.

A solução de NaOH utilizada para o condicionamento inicial e limpeza entre corridas do capilar foi preparada em água deionizada, nas concentrações de 0,2 mol L⁻¹ e 1 mol L⁻¹, e armazenada em temperatura ambiente.

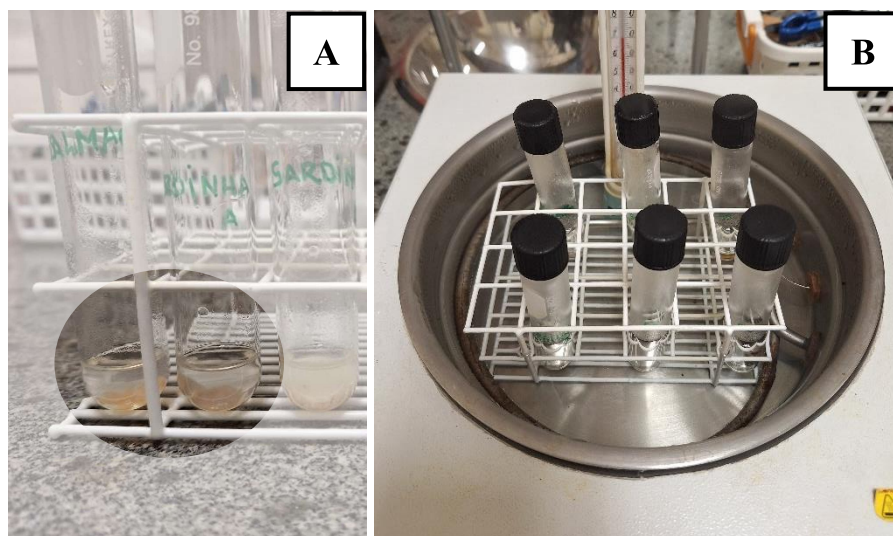
A solução metanólica de NaOH utilizada para a saponificação das amostras foi preparada em MeOH, na concentração de 0,5 mol L⁻¹, e também armazenada em temperatura ambiente.

3.2 PREPARO DAS AMOSTRAS

Os peixes utilizados para o desenvolvimento do método foram adquiridos em um supermercado local da cidade de Juiz de Fora, no estado de Minas Gerais, Brasil. Realizou-se a compra de filés de salmão com pele frescos, por R\$ 78,99 o quilo, e sardinhas inteiras frescas, por R\$ 14,90 o quilo. As amostras foram embaladas e transportadas sem refrigeração para o laboratório do Grupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ). No laboratório, após retirar a pele do salmão e separar a porção comestível da sardinha, resultando nos músculos de ambos os peixes, as amostras foram trituradas com o auxílio de um processador de alimentos até a formação de uma pasta uniforme. Em seguida, dividiu-se esta pasta uniforme em porções menores em sacos plásticos adequados para o congelamento de alimentos, que foram rotulados com os dados de identificação da espécie do peixe e data da compra, e armazenados em congelador sob temperatura de $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$.

No momento das análises, as amostras foram descongeladas. Na extração dos AGs mediada por reação de hidrólise alcalina, uma massa de 0,5 gramas da pasta foi pesada e colocada em um tubo de vidro. Em seguida, adicionou-se 4 mL de solução metanólica de NaOH $0,5\text{ mol L}^{-1}$ (**Figura 11A**). As amostras foram colocadas sob aquecimento de $60\text{-}65\text{ }^{\circ}\text{C}$ e refluxo em banho-maria por 25 minutos (**Figura 11B**). Por fim, uma alíquota do sobrenadante foi retirada, filtrada e diluída em MeOH para a concentração de interesse diretamente nos *vials* de injeção. Este procedimento se baseou no trabalho desenvolvido por BARRA et al. (2014), cujo objetivo foi determinar AGs em fígados de ratos submetidos a uma determinada dieta utilizando CZE-UV.

Figura 11 – Amostras de peixe em tubo de vidro (A) após a adição da solução metanólica de NaOH 0,5 mol L⁻¹ para posterior (B) aquecimento e refluxo em banho-maria.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

3.3 INSTRUMENTAÇÃO

Os experimentos por CE foram realizados em um equipamento modelo 7100 CE (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), equipado com detector de arranjo de diodos (DAD, do inglês, *diode array detector*) e *software* para aquisição e tratamento de dados (ChemStation versão A.06.01), disponível no Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da UFJF.

As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (25 mbar durante 5 s), o sistema foi operado sob polaridade normal, com aplicação de voltagem constante de 27 kV, e a temperatura do cartucho foi mantida em 30 °C. Foi utilizado um capilar de sílica fundida revestido com poliimida (TSP) de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de diâmetro interno e 375 µm de diâmetro externo. As análises foram realizadas em comprimento de onda de 200 nm.

3.4 PROCEDIMENTO ANALÍTICO

Para a primeira utilização do capilar, realizou-se um condicionamento com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 20 minutos, água deionizada por 10 minutos e solução de eletrólito por 15 minutos.

A limpeza do capilar entre as corridas precisou ser otimizada. Nos métodos encontrados na literatura para a análise AGs por CE, geralmente a limpeza consistia apenas em um *flush* de NaOH, seguido de um *flush* de água e de eletrólito. No entanto, devido à complexidade das amostras estudadas, julgou-se necessário a adição de um *flush* de HCl e de MeOH:ACN nas mesmas proporções do eletrólito, conforme ilustrado no **Quadro 4**.

Quadro 4 – Sequência realizada para a limpeza do capilar entre corridas.

Função	Parâmetro
<i>Flush</i>	30 s (Inlet: NaOH 0,2 mol L ⁻¹ Outlet: Lixo)
<i>Flush</i>	30 s (Inlet: Água deionizada Outlet: Lixo)
<i>Flush</i>	30 s (Inlet: HCl 1 mol L ⁻¹ Outlet: Lixo)
<i>Flush</i>	30 s (Inlet: Água deionizada Outlet: Lixo)
<i>Flush</i>	30 s (Inlet: MeOH:ACN 33:17% v/v Outlet: Lixo)
<i>Flush</i>	30 s (Inlet: Água deionizada Outlet: Lixo)
<i>Flush</i>	120 s (Inlet: BGE Outlet: Lixo)

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Ao final da sequência de análises do dia, o capilar foi condicionado com solução de NaOH 1 mol L⁻¹ por 10 minutos e água deionizada por mais 10 minutos, sendo mantido no cartucho fora do equipamento de CE.

As micropipetas foram recalibradas frequentemente para evitar erros adicionais na liberação das soluções, de modo a não prejudicar a precisão e exatidão das análises.

As vidrarias utilizadas foram lavadas em banho ultrassônico por 15 minutos em detergente Extran® MA 02 Neutro e, em seguida, por 15 minutos em água e álcool etílico comercial 70%. Por fim, as mesmas foram enxaguadas por 3 vezes com água deionizada e colocadas para secar em temperatura ambiente.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os *softwares* Microsoft Excel, R versão 4.3.2 e Origin Pro foram utilizados para o tratamento estatístico dos dados, desenvolvimento e testagem de modelos, além da elaboração de gráficos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados e as discussões sobre o trabalho desenvolvido.

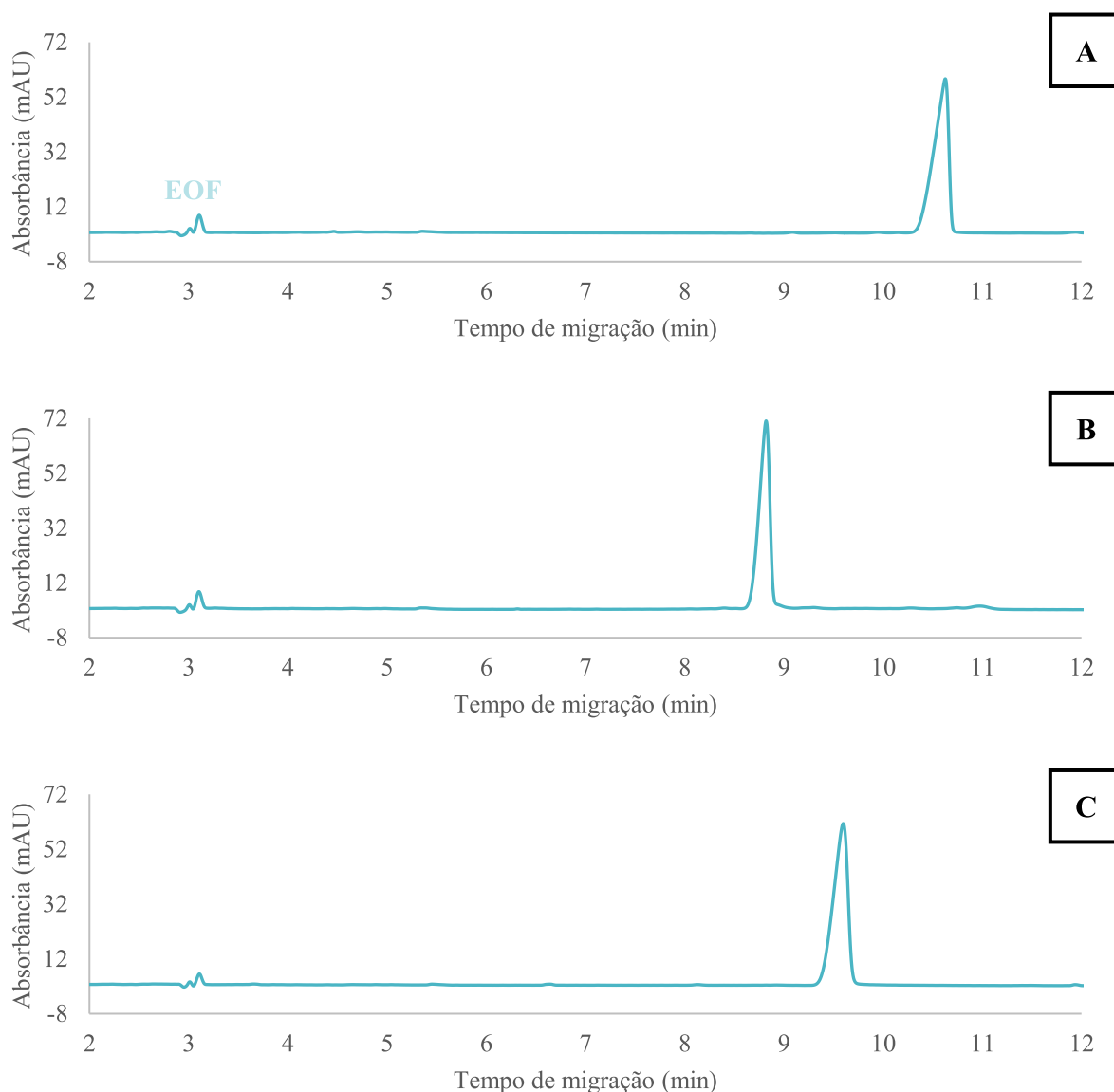
4.1 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE EPA, DHA E AA EM AMOSTRAS DE PEIXES POR CZE-UV

A escolha das condições experimentais utilizadas nas análises iniciais baseou-se no trabalho desenvolvido por AMORIM et al. (2020), cujo objetivo foi desenvolver e otimizar um método para a determinação de EPA e DHA em cápsulas de óleo de peixe. O eletrólito utilizado consistia em 30 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 12 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN. Nesta composição, a solução tampão de TBS é a substância que define o pH aparente do eletrólito, garantindo que os AGs estejam na forma aniônica; a solução de Brij® 35, que é um surfactante neutro, é utilizada para discriminar as espécies que sofrem comigração, auxiliando na separação de compostos com ligação do tipo *cis*; e os solventes orgânicos MeOH e ACN são adicionados para melhorar a solubilidade dos analitos, evitando a formação de bolhas e interrupção na corrente.

4.1.1 Detecção e identificação dos AGs em amostras de salmão e sardinha

A fim de verificar se os analitos seriam detectados nas condições utilizadas por AMORIM et al. (2020), foram injetados padrões analíticos de EPA, DHA e AA com concentração de 1 mmol L⁻¹. Os eletroferogramas obtidos nessa análise podem ser vistos a seguir, na **Figura 12**.

Figura 12 – Eletroferogramas dos padrões analíticos de (A) EPA, (B) DHA e (C) AA com concentração de 1 mmol L⁻¹.



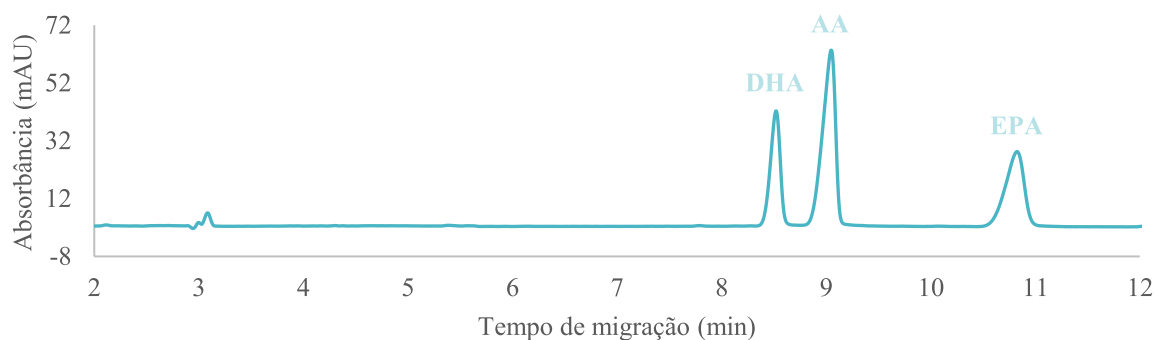
Condições experimentais: Eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 12 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de d.i. e 375 µm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 27 °C; e detecção em 200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nessas condições experimentais, observou-se um sinal referente ao EPA (**Figura 12A**) em 10,63 minutos, ao DHA (**Figura 12B**) em 8,82 minutos e ao AA (**Figura 12C**) em 9,60 minutos. Como os tempos de migração dos analitos foram bem próximos, julgou-se necessário realizar uma injeção simultânea a fim de verificar como esses AGs se comportariam em uma mesma corrida, entendimento fundamental para as análises de amostras reais. A **Figura 13**

mostra o eletroferograma obtido para uma mistura de EPA, DHA e AA com concentrações individuais de 1 mmol L⁻¹.

Figura 13 – Eletroferograma de uma mistura dos padrões analíticos EPA, DHA e AA com concentração de 1 mmol L⁻¹.

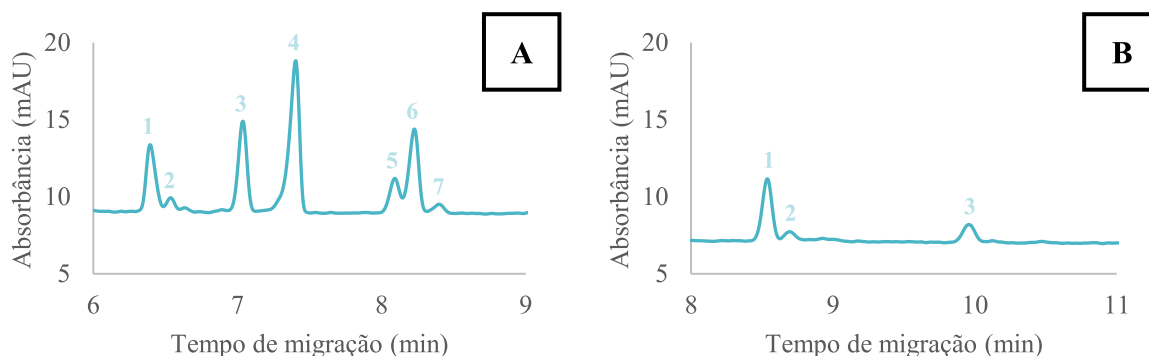


Condições experimentais: Eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 12 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de d.i. e 375 µm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 27 °C; e detecção em 200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Ao serem injetados simultaneamente, os sinais referentes ao EPA, ao DHA e ao AA apareceram em 10,83, 8,52 e 9,05 minutos, respectivamente. Pensou-se assim que o método proposto por AMORIM et al. (2020) seria eficaz em detectar de modo simultâneo e distintivo os três analitos, podendo ser utilizado nas análises qualitativas e quantitativas deste trabalho. Nesse momento, portanto, decidiu-se utilizar as mesmas condições experimentais para as análises desses AGs em amostras de salmão e sardinha. A fim de facilitar a visualização dos sinais presentes em ambas as amostras, foram feitos recortes das regiões de interesse nos eletroferogramas obtidos, como pode ser observado na **Figura 14**.

Figura 14 – Recorte dos eletroferogramas das amostras de **(A)** salmão e **(B)** sardinha diluídas na proporção de 1:10 em MeOH.



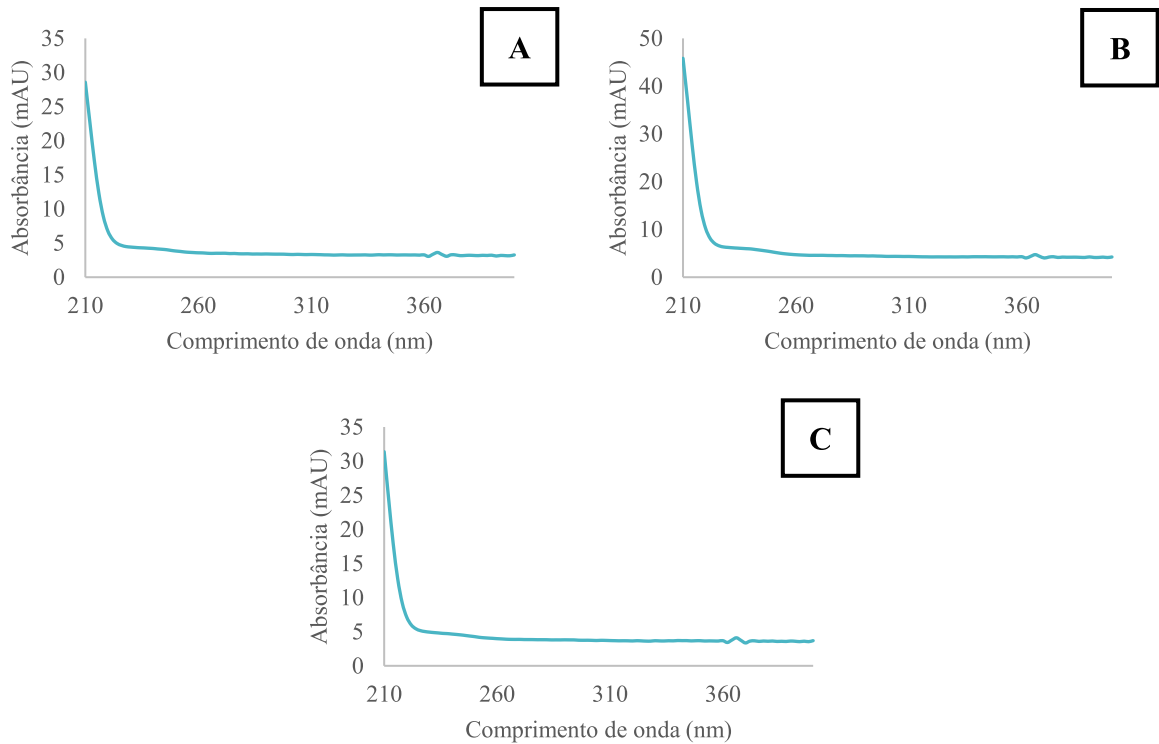
Condições experimentais: Eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 12 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 μm de d.i. e 375 μm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 27 °C; e detecção em 200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A princípio, foi possível observar sete sinais na amostra de salmão em 6,39, 6,54, 7,04, 7,40, 8,09, 8,23, 8,40 minutos (**Figura 14A**) e três sinais na amostra de sardinha em 8,54, 8,70 e 9,96 minutos (**Figura 14B**). Destaca-se ainda que, ao analisar o perfil do eletroferograma da amostra de salmão, foi possível notar a presença de uma comigração, ou seja, uma sobreposição dos sinais numerados como ‘5’ e ‘6’, mostrando que o método desenvolvido por AMORIM et al., (2020) não é eficaz em separar completamente essas espécies.

Concluída a etapa de detecção, é fundamental ter conhecimento sobre a identidade dos sinais encontrados para garantir a confiabilidade e assertividade das análises posteriores. Assim, para verificar se algum dos sinais observados eram referentes aos AGs de interesse, pensou-se em, inicialmente, comparar o perfil dos espectros UV-Vis de EPA, DHA e AA com os espectros dos sinais presentes nas amostras. No entanto, como pode ser percebido na **Figura 15**, o perfil de absorção desses AGs não apresentam uma região seletiva ou distintiva que possibilite a identificação inequívoca das espécies estudadas.

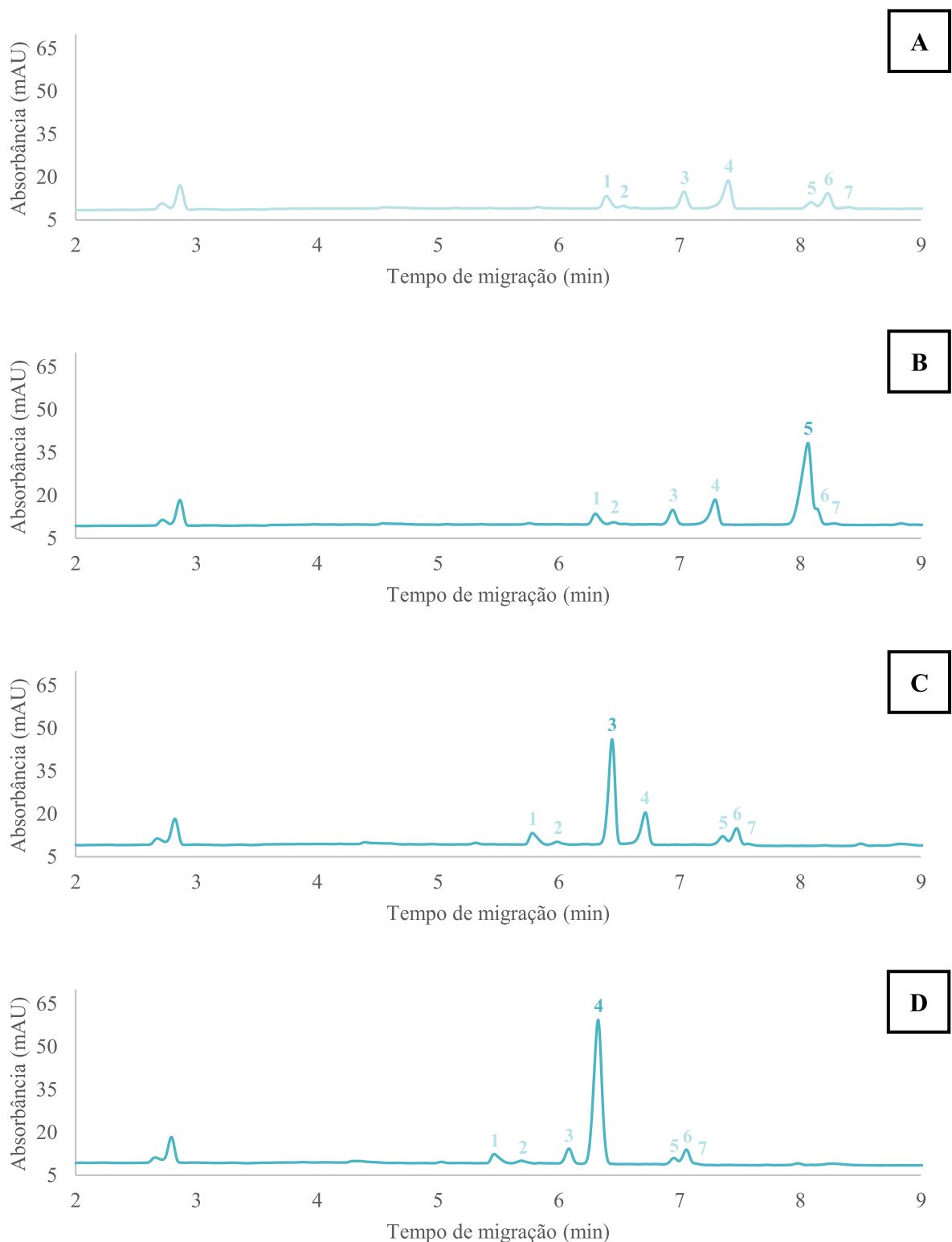
Figura 15 – Espectro UV-Vis do (A) EPA, do (B) DHA e do (C) AA.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Realizou-se assim, a adição de uma quantidade conhecida de cada um dos AGs às duas amostras de peixes. Desse modo, os sinais que sofressem aumento de intensidade poderiam ser identificados como sendo os analitos em questão. Os eletroferogramas obtidos para as amostras de salmão e sardinha com adição dos padrões analíticos dos AGs individuais, com concentração de 1 mmol L^{-1} , se encontram na **Figura 16** e **Figura 17**, respectivamente.

Figura 16 – Eletroferogramas da (A) amostra de salmão diluída 1:10 em MeOH com adição de padrão de (B) EPA, (C) DHA e (D) AA com concentração de 1 mmol L⁻¹.



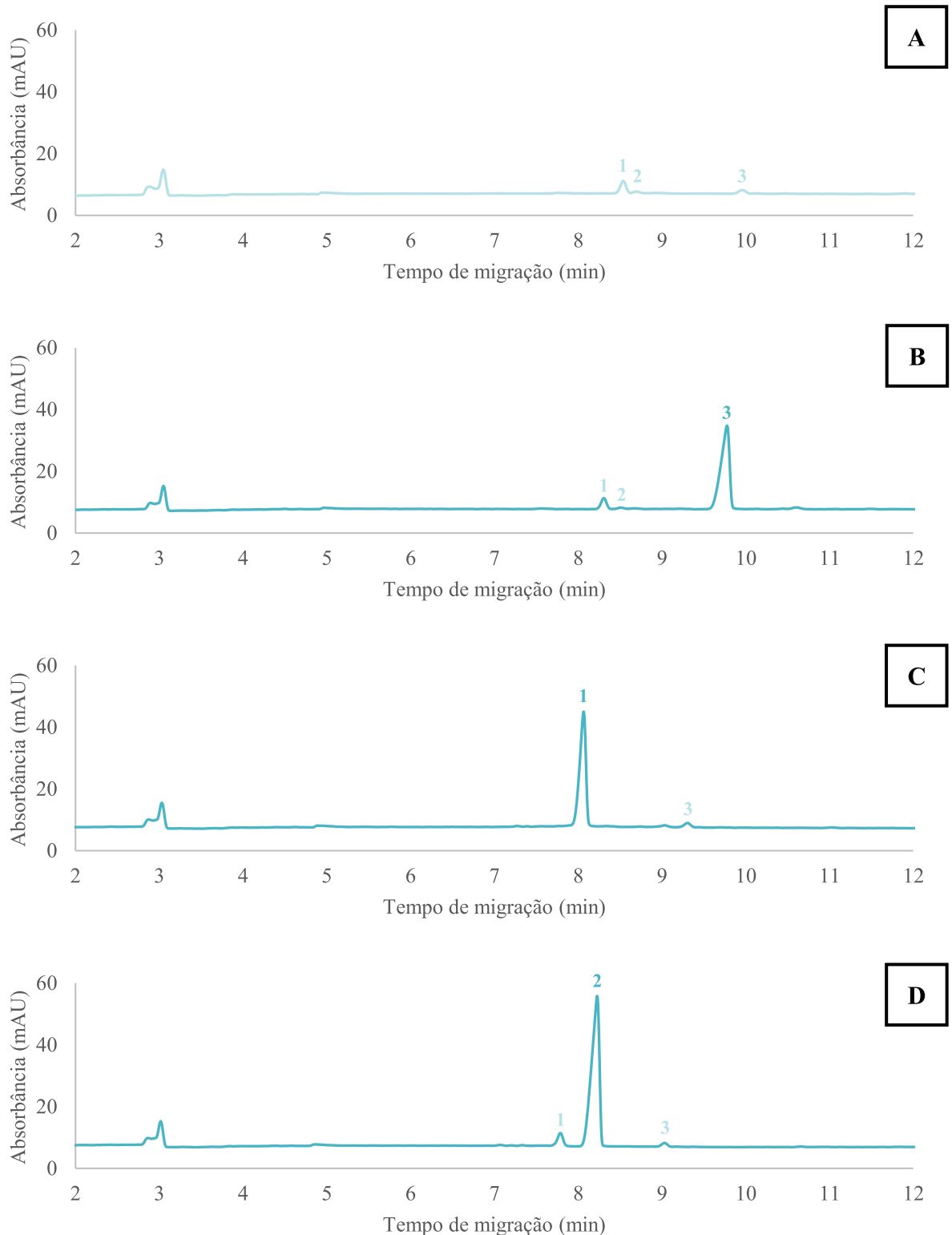
Condições experimentais: Eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 12 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de

comprimento efetivo), 50 μm de d.i. e 375 μm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 27 °C; e detecção em 200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Para as amostras de salmão, a **Figura 16** nos mostra que o sinal que aparece em 8,09 minutos (**Figura 16A**), identificado como '5', apresentou maior intensidade após a adição de EPA 1 mmol L^{-1} (**Figura 16B**); o sinal que aparece em 7,04 minutos, identificado como '3', apresentou maior intensidade após a adição de DHA 1 mmol L^{-1} (**Figura 16C**); e que o sinal que aparece em 7,40 minutos, identificado como '4', apresentou maior intensidade após a adição de AA 1 mmol L^{-1} (**Figura 16D**). Desse modo, existiam evidências de que os sinais '5', '3' e '4' se referiam ao EPA, ao DHA e ao AA, respectivamente.

Figura 17 – Eletroferogramas da (A) amostra de sardinha diluída 1:10 em MeOH com adição de padrão de (B) EPA, (C) DHA e (D) AA com concentração de 1 mmol L⁻¹.



Condições experimentais: Eletrólito composto por 30 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 12 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de

comprimento efetivo), 50 μm de d.i. e 375 μm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 27 °C; e detecção em 200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Observações semelhantes foram realizadas para as amostras de sardinha (**Figura 17**). O sinal que aparece em 9,96 minutos (**Figura 17A**), identificado como '3', apresentou maior intensidade após a adição de EPA mmol L^{-1} (**Figura 17B**); o sinal que aparece em 8,54 minutos, identificado como '1', apresentou maior intensidade após a adição de DHA 1 mmol L^{-1} (**Figura 17C**); e que o sinal que aparece em 8,70 minutos, identificado como '2', apresentou maior intensidade após a adição de AA 1 mmol L^{-1} (**Figura 17D**). Desse modo, existem evidências de que os sinais '3', '1' e '2' se referiam ao EPA, ao DHA e ao AA, respectivamente.

É válido destacar que, nessas análises, a injeção do padrão de EPA, DHA e AA 1 mmol L^{-1} nas amostras de salmão e sardinha foi feita “*on-column*”, ou seja, os padrões não foram adicionados às amostras manualmente, mas sim instrumentalmente como parte do método definido para a análise. Esse modo de injeção apresenta vantagens como o aumento da reprodutibilidade, da precisão e da frequência analítica, além de reduzir o contato do analista com as amostras, diminuir os erros sistemáticos e permitir a reutilização das soluções para outras análises (MOREIRA et al., 2023).

Até aqui, foi possível detectar e identificar EPA, DHA e AA em amostras de salmão e sardinha utilizando o método proposto por AMORIM et al. (2020). No entanto, percebeu-se que esse método não seria eficaz para as análises almejadas neste trabalho por não proporcionar uma separação completa do EPA nas amostras de salmão, visto que esse AG estava comigrando com uma outra espécie, desconhecida até o momento. Portanto, as próximas etapas deste trabalho envolvem o uso de ferramentas quimiométricas, como o planejamento de experimentos, para a otimização do método o que, em teoria, permitiria alcançar uma melhor resolução eletroforética para os sinais encontrados.

4.1.2 Otimização do método para análise de AGs em amostras de salmão

Com a finalidade de otimizar a separação de EPA e a espécie desconhecida, foi realizado um planejamento Box-Behnken 3^4 contendo quatro fatores e três níveis, com triplicata no ponto central, totalizando 27 experimentos. Os fatores considerados no estudo foram a concentração de TBS, a concentração de Brij® 35, a voltagem aplicada e a temperatura do cartucho. Estes dois últimos parâmetros instrumentais estão diretamente ligadas ao fluxo eletrosmótico e à

viscosidade do eletrólito, respectivamente. Foram mantidos constantes, portanto, a proporção dos solventes orgânicos, MeOH e ACN, a dimensão do capilar, o modo de injeção da amostra e o comprimento de onda. Quanto aos níveis, análises preliminares haviam nos indicado que um aumento da concentração de TBS e de Brij® 35 proporcionavam uma melhor resolução entre o par crítico EPA/espécie desconhecida. Por conta disso, nós optamos por utilizar as concentrações do método desenvolvido por AMORIM et al. (2020) como nível baixo. Como nós gostaríamos de avaliar tanto o aumento quanto a diminuição da voltagem aplicada e a temperatura do cartucho, os valores destes fatores do método de referência foram utilizadas como nível intermediário. A **Tabela 1** relaciona os níveis utilizados para cada um dos fatores estudados.

Tabela 1 – Níveis e fatores utilizados no planejamento Box-Behnken 3⁴ para o estudo da otimização das condições eletroforéticas.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
X ₁ – Concentração de TBS (mmol L ⁻¹)	30	35	40
X ₂ – Concentração de Brij® 35 (mmol L ⁻¹)	12	17	22
X ₃ – Voltagem aplicada (kV)	24	27	30
X ₄ – Temperatura do cartucho (°C)	24	27	30

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Para auxiliar na escolha da melhor condição de análise, utilizou-se como resposta do planejamento a resolução entre o par crítico EPA/espécie desconhecida (**Equação 15**) e o tempo de análise. A **Tabela 2** mostra a matriz deste planejamento, bem como a resolução calculada e o tempo de análise, e a **Figura 18** ilustra os eletroferogramas obtidos em cada experimento realizado.

$$Resolução = \frac{2(tempo_{EPA} - tempo_X)}{(largura_{EPA} - largura_X)} \quad (15)$$

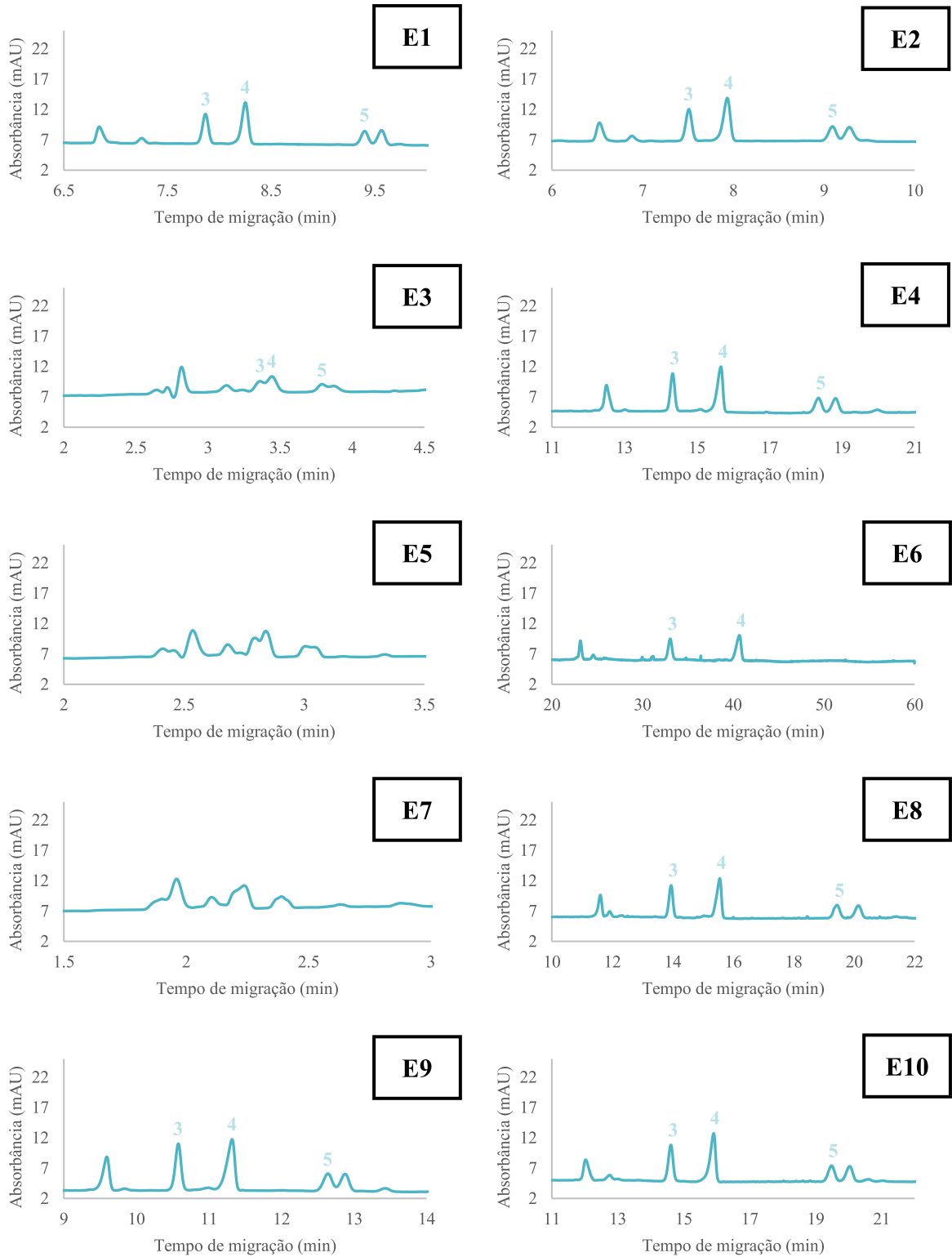
onde $tempo_{EPA}$ e $tempo_X$ se referem ao tempo de migração de EPA e da espécie desconhecida, respectivamente; e $largura_{EPA}$ e $largura_X$ se referem a largura dos sinais dessas espécies.

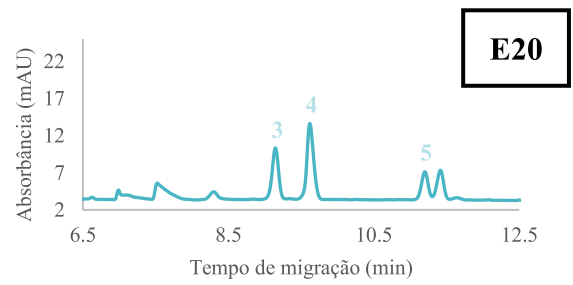
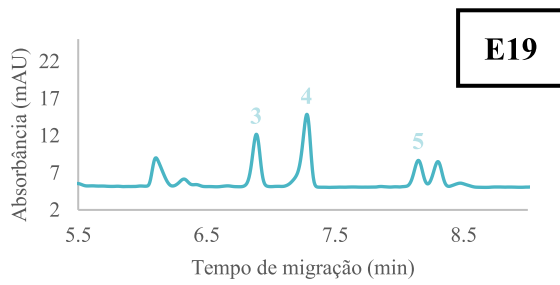
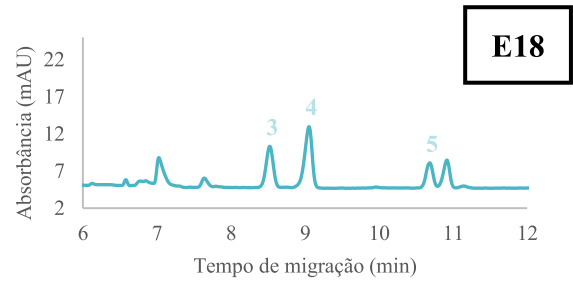
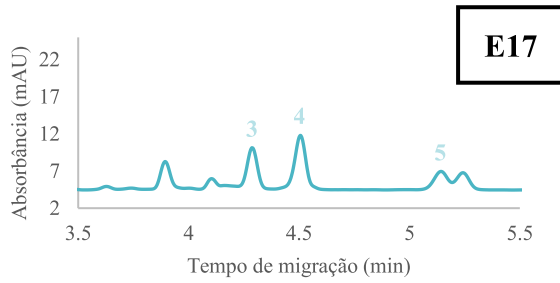
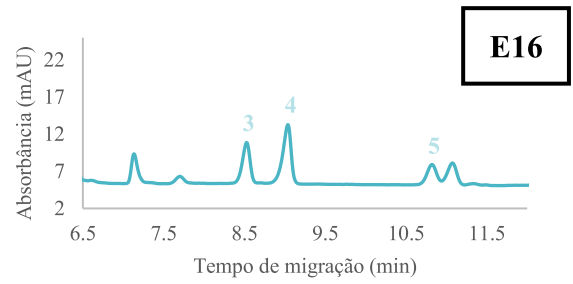
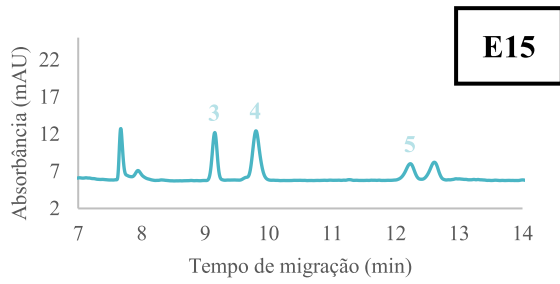
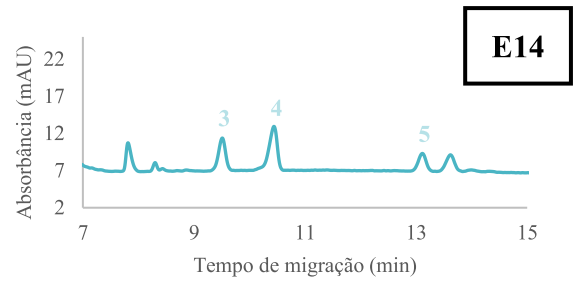
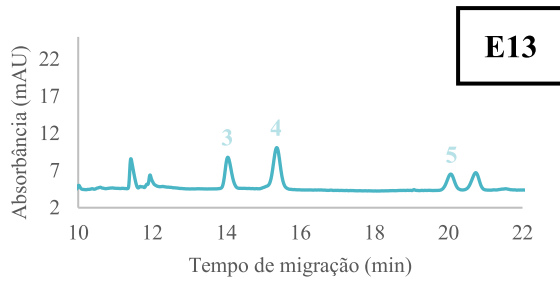
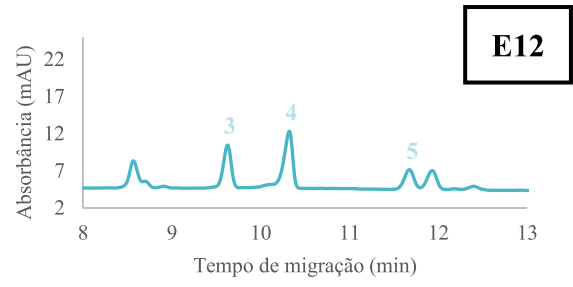
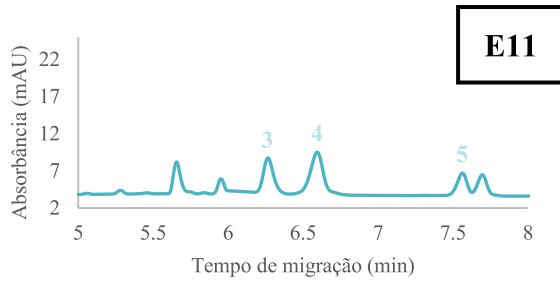
Tabela 2 – Matriz de planejamento Box-Behnken 3^4 para o estudo da otimização das condições eletroforéticas.

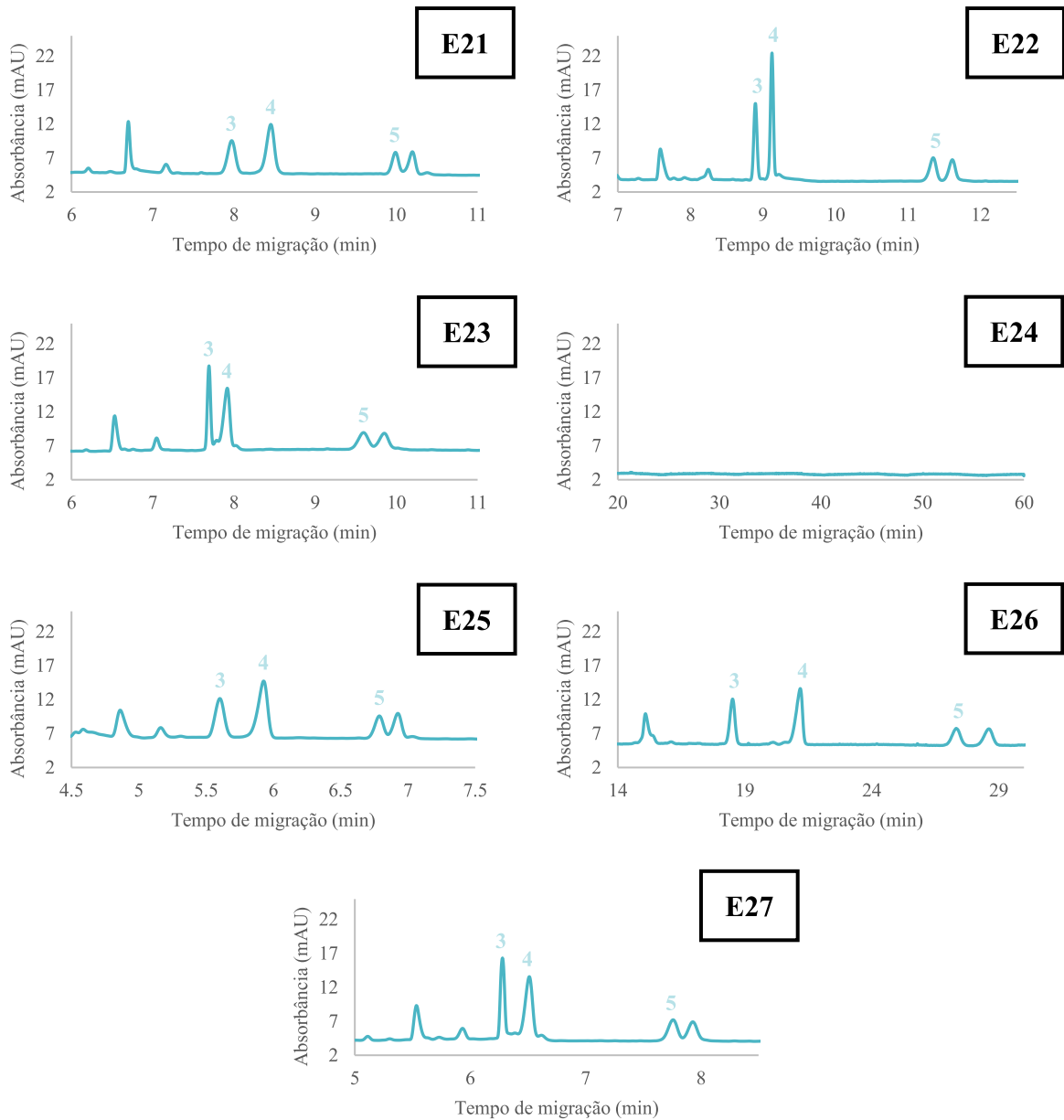
Experimento	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Resolução	Tempo de análise (min)
1	-1	0	-1	0	0,86	9,66
2	-1	0	+1	0	0,80	9,42
3	0	+1	+1	0	0,52	3,98
4	0	-1	-1	0	0,89	19,09
5	0	+1	-1	0	-	-
6	+1	0	-1	0	-	-
7	0	+1	0	+1	-	-
8	0	0	-1	+1	1,17	20,45
9	-1	-1	0	0	0,74	13,06
10	0	0	+1	-1	0,91	20,33
11	-1	0	0	-1	0,60	7,87
12	0	-1	+1	0	0,83	12,08
13	+1	0	0	-1	1,05	21,06
14	+1	0	0	+1	1,13	13,84
15	+1	0	+1	0	0,93	12,79
16	-1	+1	0	0	0,85	11,23
17	-1	0	0	+1	0,60	5,36
18	0	0	0	0	0,95	11,03
19	0	-1	0	+1	0,88	8,39
20	0	-1	0	-1	0,88	11,54
21	0	0	0	0	0,91	10,30
22	0	0	-1	-1	0,92	11,78
23	+1	+1	0	0	0,71	10,11
24	0	+1	0	-1	-	-
25	0	0	+1	+1	0,86	7,00
26	+1	-1	0	0	1,21	29,05
27	0	0	0	0	0,68	8,10

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 18 – Eletroferogramas dos experimentos de 1 a 27, conforme **Tabela 2**, para o estudo da otimização das condições eletroforéticas.







Sinais atribuídos pela adição de padrão: (3) DHA; (4) AA; (5) EPA.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

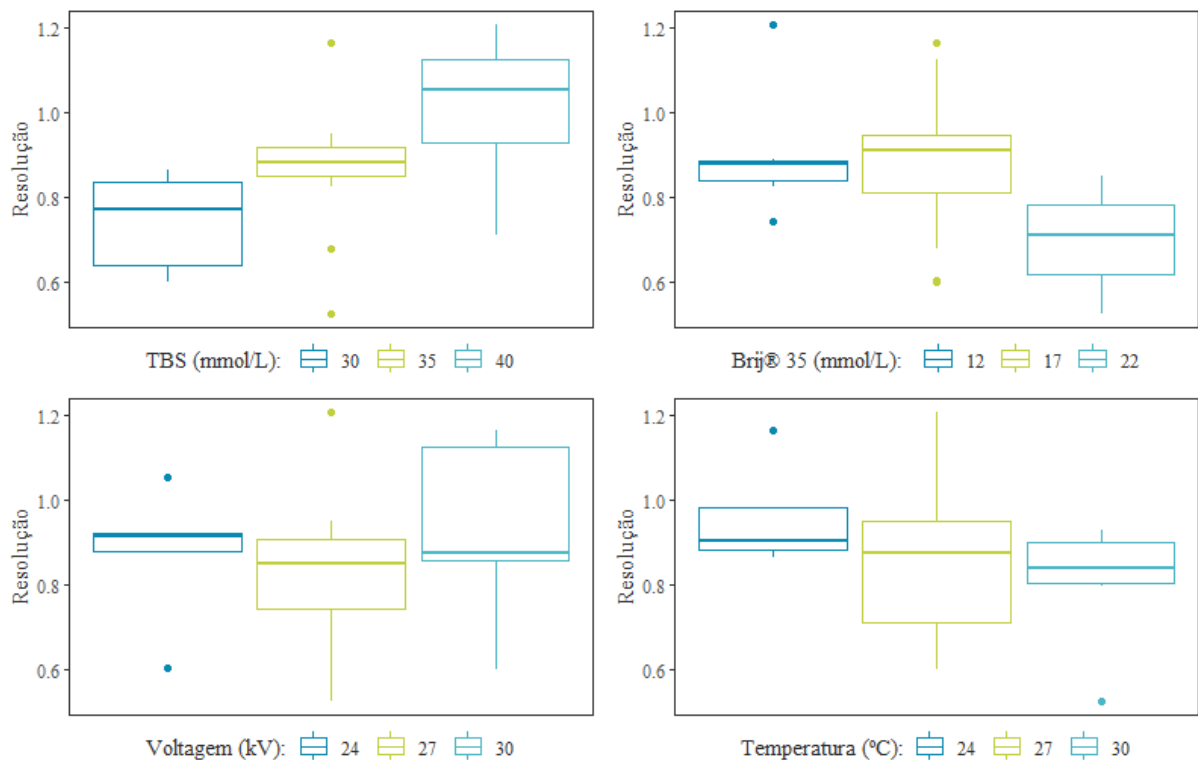
Antes de prosseguirmos, é válido mencionar que, inicialmente, optou-se por descartar os experimentos 5, 6 e 7 devido à baixíssima eficiência na separação eletroforética, impossibilitando o cálculo da resolução. Além disso, o experimento 24 também foi descartado pois nem todos os analitos tinham alcançado a janela de detecção em um período de uma hora.

A partir do planejamento Box-Behnken ³⁴, foi possível obter informações sobre o efeito de cada um dos fatores estudados sob a resolução entre o par crítico EPA/espécie desconhecida e sob o tempo de análise. A interpretação dessas informações se basearam na análise da distribuição desses valores em cada um dos níveis de concentração de TBS, concentração de

Brij® 35, voltagem e de temperatura. Ademais, os valores de correlação (ρ), utilizados quando se quer saber se duas variáveis possuem algum tipo de relação e qual é a intensidade dessa relação, foram calculados, de modo a corroborar ainda mais com a interpretação realizada.

A **Figura 19** mostra a distribuição dos valores de resolução entre o par crítico EPA/espécie desconhecida encontrados em cada nível dos fatores estudados. É possível notar que, de modo geral, variar a voltagem aplicada ($\rho = 0,10$) e a temperatura do cartucho ($\rho = -0,28$) não ocasiona em uma alteração expressiva em relação a mediana dos valores de resolução observados. Para os dois fatores, a correlação é considerada bem fraca e fraca, respectivamente. Ademais, o aumento da concentração de Brij® 35 ($\rho = -0,31$) faz com que a resolução, que aumentou até certo ponto, diminua. Por conta disso, este fator também apresenta uma correlação fraca. Por outro lado, pode-se observar claramente que há um aumento de resolução com o aumento da concentração de TBS ($\rho = 0,53$). Este fator apresenta uma correlação considerada moderada.

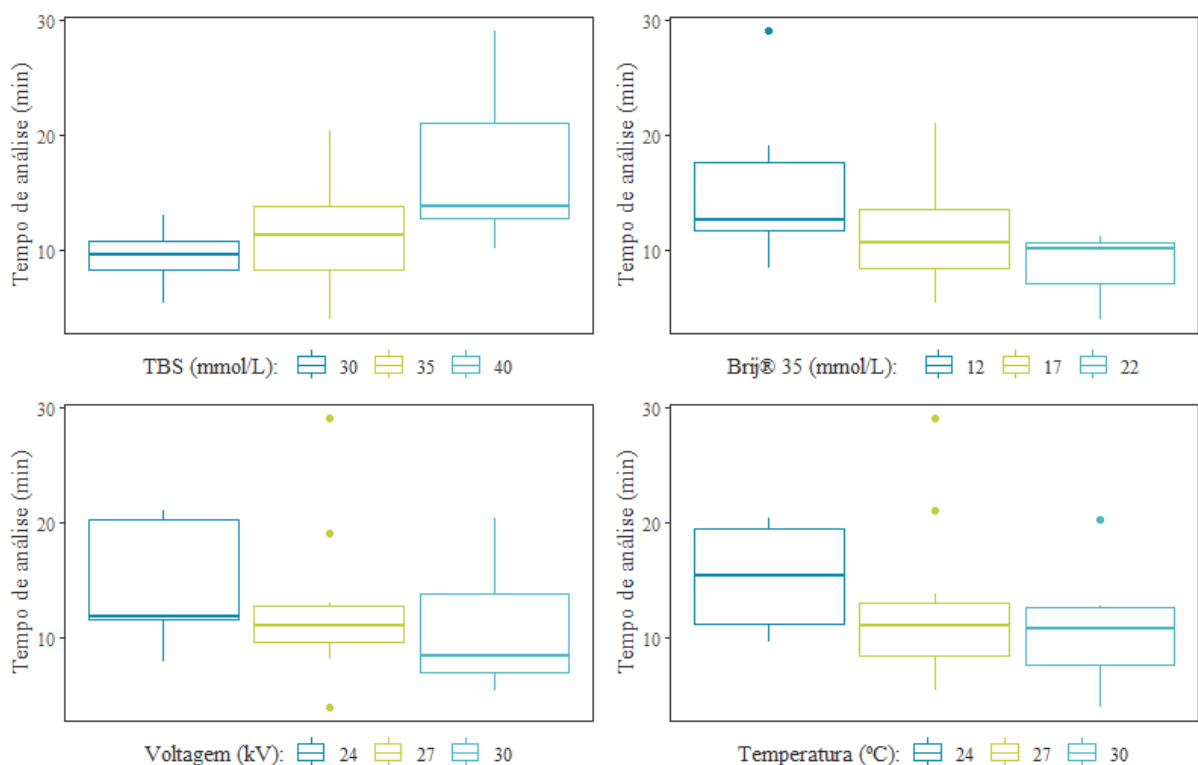
Figura 19 – Gráfico de Boxplot para o estudo do efeito da concentração de TBS, da concentração de Brij® 35, da voltagem e da temperatura sob a resolução.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A **Figura 20**, por sua vez, mostra a distribuição do tempo de análise em cada nível dos fatores estudados. Nota-se que, de modo geral, o aumento da concentração de Brij® 35 ($\rho = -0,38$), da voltagem aplicada ($\rho = -0,20$) e da temperatura do cartucho ($\rho = -0,24$) gera uma ligeira diminuição do tempo de análise. Os três fatores apresentam uma correlação considerada fraca. Mais uma vez, a concentração de TBS apresenta uma correlação moderada, visto que o aumento deste fator ocasiona em um aumento do tempo de análise.

Figura 20 – Gráfico de Boxplot para o estudo do efeito da concentração de TBS, da concentração de Brij® 35, da voltagem e da temperatura sob o tempo de análise.



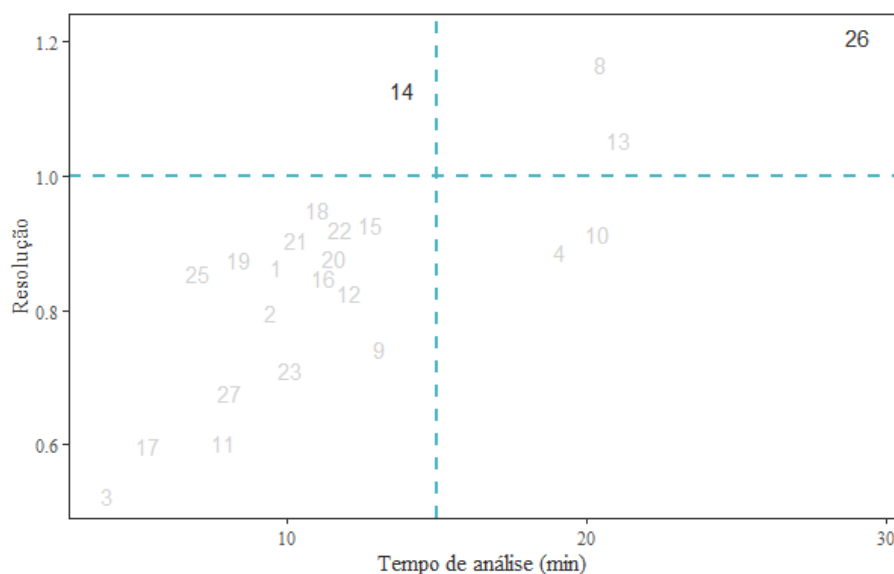
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

A interpretação das informações descritas até aqui foi realizada considerando o efeito dos fatores estudados isoladamente sob a resolução e sob o tempo de análise. No entanto, é válido destacar que, além de a resposta de um experimento ser influenciada pelos fatores isolados, há também a influência de efeitos resultantes da associação de dois ou mais fatores. Ademais, em certos casos, alguns fatores podem ter um impacto mais significativo na resposta do que outros. Isso explica, em parte, a presença de alguns pontos discrepantes, que são aqueles que estão mais distantes da mediana. Esses pontos podem ser interpretados como sendo

situações em que outros fatores influenciaram mais na resposta observada do que o fator destacado no gráfico Boxplot em questão.

Ademais, essa interpretação auxilia na escolha da melhor condição de análise dentre as testadas no planejamento Box-Behnken 3^4 . A priori, foi constatado que a resolução variou de 0,52 a 1,21. Como pode ser observado na **Figura 21**, os experimentos 8, 13, 14 e 26 foram os únicos que apresentaram uma resolução satisfatória, ou seja, maior do que 1, sendo possível notar claramente a separação completa de EPA e espécie desconhecida. Ainda na **Figura 21**, é possível perceber que o tempo de análise variou bastante entre eles. O experimento 26, apesar de apresentar a maior resolução, é, de todos, o experimento mais longo, enquanto o experimento 14 apresenta um tempo de análise menor do que 15 minutos.

Figura 21 – Gráfico de dispersão da resolução em função do tempo de análise.



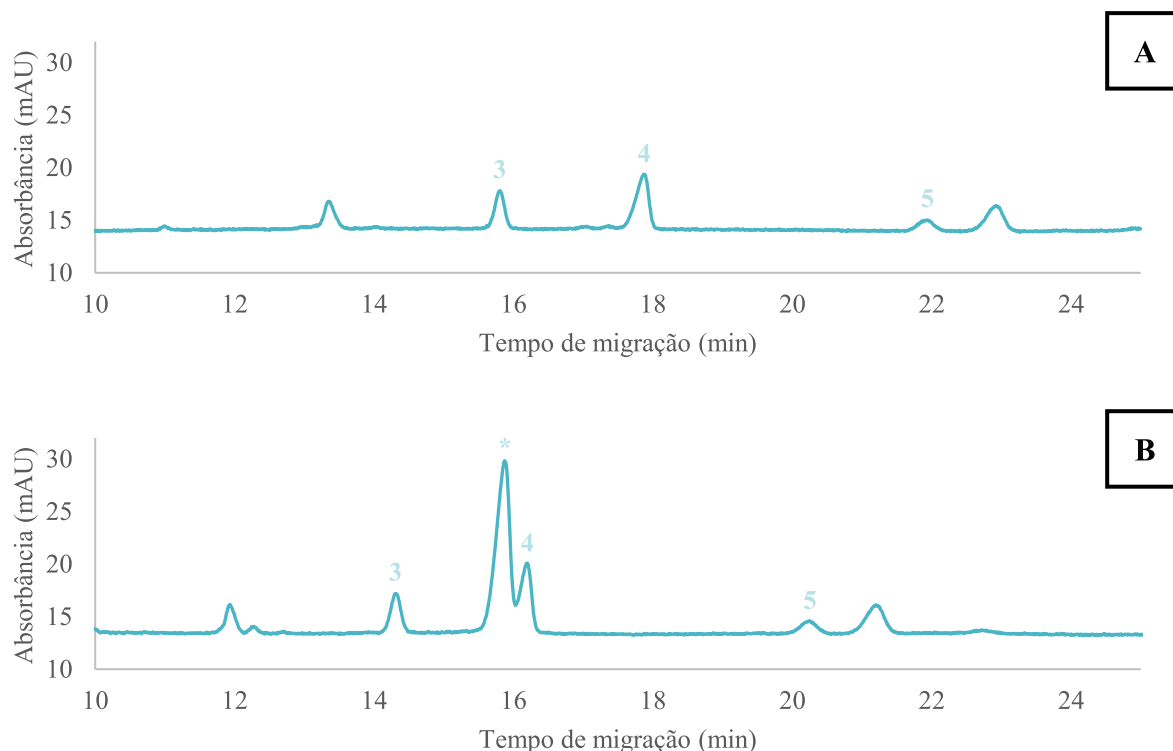
Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Nesse momento, ao se observar mais atentamente os eletroferogramas dos experimentos 14 e 26, percebeu-se que o perfil do sinal identificado como ‘4’ nas amostras de salmão se alterava. Vale lembrar que, este sinal aumentou de intensidade após a adição de padrão de AA em análises anteriores a otimização do método. Esta alteração também foi percebida em outros experimentos do planejamento. Em alguns experimentos, como no experimento 14, o sinal ‘4’ se apresentava como um único sinal. Em outros, como no experimento 26, havia o aparecimento de um sinal de baixíssima intensidade bem próximo do sinal ‘4’.

Suspeitando-se de que o sinal do AA fosse, portanto, o sinal de baixa intensidade, decidiu-se adicionar o padrão analítico deste AG nas amostras de salmão nas condições

experimentais do experimento 26. Assim, como pode ser percebido na **Figura 22**, a suspeita foi confirmada. Como é reportado na literatura, a composição de AGs dos peixes marinhos é caracterizada por altas proporções de $\omega 3$ e baixíssimas proporções de $\omega 6$ (DE SOUZA; ANIDO; TOGNON, 2007).

Figura 22 – Eletroferogramas da amostra de salmão diluída 1:10 em MeOH (A) antes e (B) após a adição de padrão de AA com concentração de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.



Condições experimentais: Eletrólito composto por 40 mmol L^{-1} de TBS (pH 9), 12 mmol L^{-1} de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), $50 \mu\text{m}$ de d.i. e $375 \mu\text{m}$ de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de $27 \text{ }^\circ\text{C}$; e detecção em 200 nm. **Sinais:** (3) DHA; (*) AA; (4) AG não identificado; (5) EPA.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Em função da baixa intensidade do sinal, não é possível construir uma curva analítica para a quantificação do AA. Deste modo, a concentração deste AG foi estimada pelo método de adição de padrão *single point* (CARDONE; PALERMO; SYBRANDT, 1980; NEVES et al., 2018). Os valores encontrados foram de $0,004$ e $0,003 \text{ mmol L}^{-1}$ para as amostras de salmão e sardinha, respectivamente. Constatou-se que ambas as concentrações estavam abaixo do LD do método, que foi de $0,012 \text{ mmol L}^{-1}$, e do LQ, de $0,040 \text{ mmol L}^{-1}$. Como os valores estimados

se encontram abaixo dos limites determinados para o método, a confiabilidade destas medidas é prejudicada pois nessas condições o sinal do analito se confunde com o ruído instrumental inerente às análises.

Nesse sentido, por mais que o experimento 26 tenha apresentado a maior eficiência de separação, separando os três AGs de interesse inicialmente, o experimento 14 foi escolhido por apresentar uma excelente separação de EPA e DHA em um tempo menor de análise. As condições experimentais do método otimizado, que será utilizado neste trabalho, portanto, consistem em um eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 17 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de d.i. e 375 µm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 30 °C; e detecção em 200 nm.

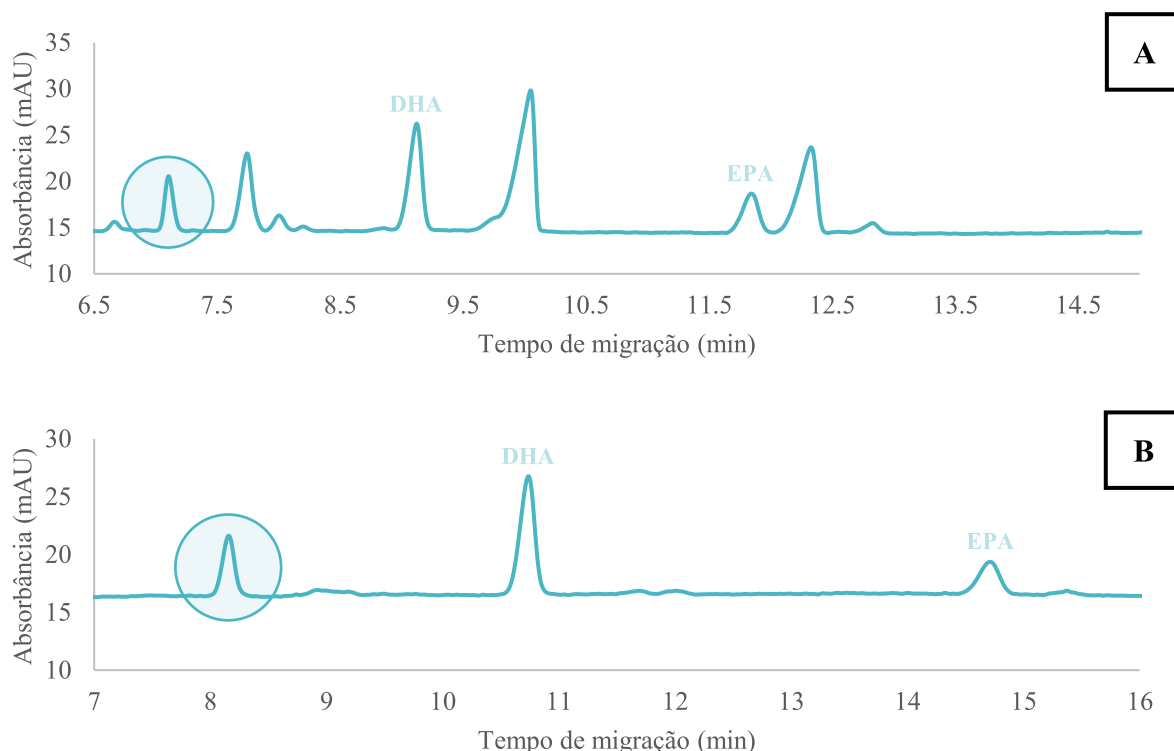
4.2 AVALIAÇÃO DE FIGURAS DE MÉRITO DO MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE EPA E DHA EM AMOSTRAS DE PEIXES POR CZE-UV

Nesta seção serão avaliados os parâmetros linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação do método desenvolvido.

4.2.1 Linearidade

A quantificação dos analitos baseou-se no cálculo de um F_R para cada AG, utilizando o ácido eláidico (AE) como PI. Para a escolha do PI mais adequado, as amostras de salmão e sardinha foram injetadas com adição de padrões analíticos de diferentes AGs disponíveis no laboratório. O AE se mostrou promissor por ser uma espécie similar aos analitos e que não comigrava com nenhuma outra espécie presente em ambas as amostras (**Figura 23**). É válido mencionar ainda que, há evidências de que, durante essas análises, a identidade do sinal identificado como '6' nas amostras de salmão, que comigrava com o EPA antes da otimização do método, tenha sido finalmente revelada pois observou-se um aumento de intensidade deste sinal após a adição do padrão analítico de ácido linolênico.

Figura 23 – Eletroferogramas da amostra de (A) salmão diluída 3:10 em MeOH e (B) sardinha diluída 1:4 em MeOH com adição do PI com concentração de 1 mmol L⁻¹.



Condições experimentais: Eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 17 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de d.i. e 375 µm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 30 °C; e detecção em 200 nm.

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Para calcular o F_R , foram construídas curvas de calibração com triplicatas autênticas em cinco níveis de concentração variando de 0,10 a 0,30 mmol L⁻¹ com incrementos de 0,05 mmol L⁻¹ para o EPA, e de 0,10 a 0,50 mmol L⁻¹ com incrementos de 0,10 mmol L⁻¹ para o DHA. A concentração do AE foi fixada em 1 mmol L⁻¹ em todos os níveis, como pode ser observado na **Tabela 3**.

Tabela 3 – Níveis de concentração dos AGs na curva analítica.

Nível de concentração	AE (mmol L ⁻¹)	EPA (mmol L ⁻¹)	DHA (mmol L ⁻¹)
A	1,00	0,30	0,50
B	1,00	0,25	0,40
C	1,00	0,20	0,30
D	1,00	0,15	0,20
E	1,00	0,10	0,10

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

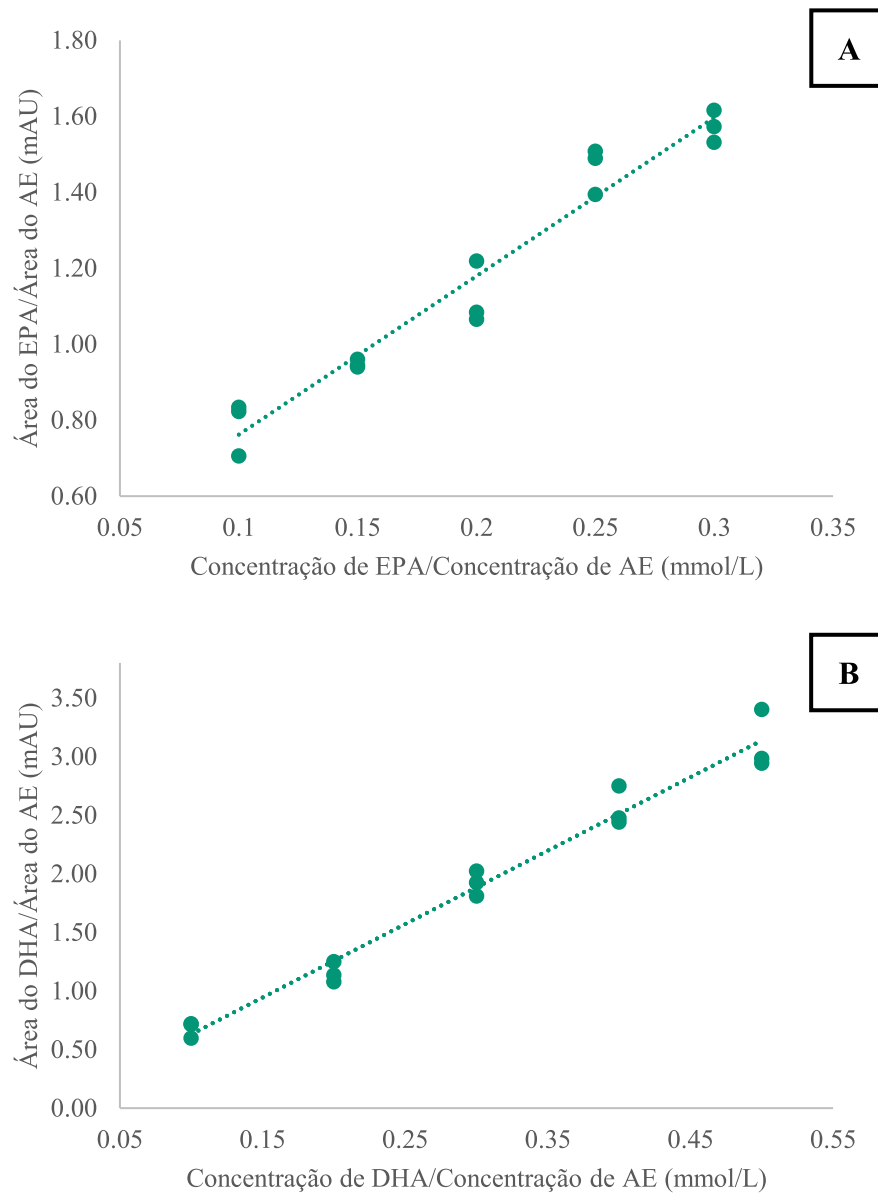
A **Tabela 4** apresenta os sinais de resposta, ou seja, a razão entre o sinal de cada analito e o PI em cada réplica, para a implementação do modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados. Em seguida, a **Figura 24** ilustra as curvas de calibração obtidas para a determinação de EPA (**Figura 24A**) e DHA (**Figura 24B**).

Tabela 4 – Valores dos sinais de resposta para a implementação do modelo de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados.

Nível de concentração	Área do EPA/Área do AE (mAU)	Área do DHA/Área do AE (mAU)
	1,62	2.95
A	1,57	2.99
	1,53	3.40
	1,49	2.48
B	1,39	2.44
	1,51	2.75
	1,22	2.02
C	1,07	1.93
	1,08	1.81
	0,96	1.25
D	0,94	1.14
	0,94	1.08
	0,82	0.60
E	0,71	0.72
	0,83	0.72

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

Figura 24 – Curvas de calibração para determinação de (A) EPA e (B) DHA.



Fonte: Elaborada pela autora (2024).

O método dos mínimos quadrados foi utilizado para a obtenção das equações das curvas analíticas, bem como os coeficientes de correlação para cada AG (**Tabela 5**). Nota-se que, os valores dos coeficientes de correlação obtidos foram próximos de 1,0, indicando que existe uma relação linear entre as variáveis x e y . Ademais, os pressupostos de homoscedasticidade, autocorrelação e normalidade foram verificados pelo teste de Cochran, pelo teste de Durbin-Watson e pelo teste de Shapiro-Wilk, respectivamente. Constatou-se que os erros aleatórios possuem variância constante ($C_{calculado} < C_{tabelado}$), sendo considerados homocedásticos, são

independentes ($p_{valor} > 0,05$), e que apresentam uma distribuição normal ($W_{calculado} > W_{tabelado}$).

Como os pressupostos não foram violados, a validade dos modelos matemáticos e a significância estatística das curvas analíticas ajustadas puderam ser testadas por meio da análise de variância. Constatou-se que os modelos poderiam ser utilizados para a quantificação de EPA e DHA em amostras de peixes uma vez que não houve evidência de falta de ajuste ($F_{calculado} < F_{tabelado}$) e que a linearidade entre as variáveis x e y foi considerada significativa ($F_{calculado} > F_{tabelado}$).

Tabela 5 – Parâmetros de linearidade para a determinação de EPA e DHA por CZE-UV.

	EPA	DHA
Equação da reta	$y = (4,175 \pm 0,263)x + (0,345 \pm 0,056)$	$y = (6,268 \pm 0,270)x + (0,004 \pm 0,090)$
Coeficiente de correlação	$r = 0,975$	$r = 0,988$
Teste de Cochran	$C_{calculado} = 0,397$	$C_{calculado} = 0,551$
	$C_{tabelado} = 0,684$	$C_{tabelado} = 0,684$
Teste de Durbin-Watson	$p_{valor} = 0,321$	$p_{valor} = 0,129$
Teste de Shapiro-Wilk	$W_{calculado} = 0,977$	$W_{calculado} = 0,949$
	$W_{tabelado} = 0,881$	$W_{tabelado} = 0,881$
Teste da falta de ajuste	$F_{calculado} = 3,03$	$F_{calculado} = 0,72$
	$F_{tabelado} = 3,71$	$F_{tabelado} = 3,71$
Teste da significância da regressão	$F_{calculado} = 252,23$	$F_{calculado} = 537,89$
	$F_{tabelado} = 4,67$	$F_{tabelado} = 4,67$

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2.2 Precisão

Para avaliar a repetibilidade do método, as amostras de salmão diluída 1:10 em MeOH e de sardinha diluídas 1:2 em MeOH foram injetadas seis vezes, sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto período de tempo.

Como pode ser percebido na **Tabela 6**, os valores de RSD, calculados pela **Equação 11**, foram menores do que 8% tanto para a área dos sinais dos AGs quanto para o tempo de migração em ambas as amostras, indicando que o método apresenta boa precisão.

Tabela 6 – Valores de RSD para o teste de repetibilidade para o experimento 14.

	Amostras de salmão		Amostras de sardinha	
	RSD – Área dos sinais (%)	RSD – Tempo de migração (%)	RSD – Área dos sinais (%)	RSD – Tempo de migração (%)
EPA	2,83	1,99	7,83	5,33
DHA	6,33	0,68	5,91	2,03

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2.3 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada por meio de ensaios de recuperação com fortificação das amostras de salmão e sardinha com padrões analíticos de EPA e DHA nas concentrações do nível intermediário da curva analítica em triplicata. A **Tabela 7** apresenta as concentrações e as porcentagens de recuperação médias determinadas para os AGs, calculadas a partir da **Equação 12**. Os resultados encontrados são aceitáveis visto que a recuperação se manteve bem próxima de 100%, com precisão menor do que $\pm 15\%$ (RIBANI et al., 2004).

Tabela 7 – Porcentagem de recuperação média para EPA e DHA nas amostras de salmão e sardinha.

	Amostras de salmão	Amostras de sardinha
	Recuperação (%)	Recuperação (%)
EPA – 0,20 mmol L ⁻¹	101,01 \pm 10,55	104,30 \pm 3,17
DHA – 0,30 mmol L ⁻¹	91,23 \pm 9,58	93,96 \pm 7,05

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.2.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação, avaliados pela relação sinal-ruído e calculados pela **Equação 13** e **Equação 14**, estão listados na **Tabela 8**. Nota-se que, todos os valores para ambos os AGs foram menores do que as concentrações do primeiro nível de concentração da curva analítica, mostrando a sensibilidade do método proposto.

Tabela 8 – Valores de LD e LQ para EPA e DHA nas amostras de salmão e sardinha.

	Amostras de salmão		Amostras de sardinha	
	LD (mmol L ⁻¹)	LQ (mmol L ⁻¹)	LD (mmol L ⁻¹)	LQ (mmol L ⁻¹)
EPA	0,006	0,019	0,005	0,015
DHA	0,003	0,011	0,002	0,007

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

4.3 QUANTIFICAÇÃO DE EPA E DHA EM AMOSTRAS DE SALMÃO E SARDINHA POR CZE-UV

Para quantificar EPA e DHA nas amostras de salmão e sardinha, utilizou-se o coeficiente a da curva analítica construída para cada AG como F_R na **Equação 10**. Ambas as amostras foram injetadas sob as condições otimizadas em triplicatas autênticas e as médias dos resultados encontrados podem ser vistos na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Resultados da quantificação dos AGs em amostras de salmão e sardinha por CZE-UV.

	Amostras de salmão	Amostras de sardinha
EPA (mg/100 g)	259,20 ± 7,85	213,42 ± 5,23
DHA (mg/100 g)	414,99 ± 25,00	408,00 ± 9,62

Fonte: Elaborada pela autora (2024).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo desenvolveu um método por CE para a determinação de EPA e DHA em amostras de salmão e sardinha, alcançando resultados significativos tanto no âmbito científico quanto no social. A identificação destes AGs no perfil lipídico das espécies marinhas estudadas evidencia a riqueza nutricional e destaca a importância de métodos analíticos precisos para a avaliação da qualidade desses alimentos.

Um dos desafios enfrentados durante o desenvolvimento do método foi a comigração do EPA com o ácido linolênico. Assim, a utilização do planejamento Box-Behnken 3⁴ para otimização das condições experimentais foi crucial para resolver a resolução deste par crítico, destacando a relevância da concentração de TBS tanto na resolução quanto no tempo de análise. Esse resultado ressalta a importância da escolha e ajuste adequado dos parâmetros experimentais em CE para alcançar uma separação rápida e eficiente dos AGs.

Dois métodos distintos se destacaram ao longo do estudo. O primeiro método apresentou alta eficiência de separação, permitindo confirmar a presença do AA como um componente minoritário no perfil lipídico das amostras. No entanto, não foi possível determinar a concentração deste AG pois se encontrava abaixo do limite de detecção e de quantificação do método. O segundo método, por sua vez, possibilitou a separação de EPA e DHA em menos de 15 minutos.

A metodologia otimizada, através do planejamento Box-Behnken 3⁴, consiste, portanto, em um eletrólito composto por 40 mmol L⁻¹ de TBS (pH 9), 17 mmol L⁻¹ de Brij® 35, 33% v/v de MeOH e 17% v/v de ACN; capilar TSP de 33,5 cm de comprimento total (25 cm de comprimento efetivo), 50 µm de d.i. e 375 µm de d.e.; injeção hidrodinâmica de 25 mbar x 5 s; voltagem de 27 kV; temperatura do cartucho de 30 °C; e detecção em 200 nm. O método foi validado através de algumas figuras de mérito, como linearidade, precisão, exatidão e os limites de detecção e quantificação, confirmando a aplicabilidade do método para a análise das amostras e assegurando a confiabilidade dos resultados obtidos.

Do ponto de vista científico, o desenvolvimento desse método por CE representa um avanço significativo para análise de AGs. A eficiência, a simplicidade do preparo de amostra e o baixo consumo de reagentes fazem com que esta técnica de separação seja promissora para análises de rotina e futuras pesquisas na área de lipídios.

Em resumo, o método desenvolvido não apenas avança o conhecimento científico sobre a composição lipídica de salmão e sardinha, mas também possui implicações práticas e sociais

significativas. Proporciona uma ferramenta confiável para a análise de AGs $\omega 3$, contribuindo para a indústria alimentícia e promovendo escolhas alimentares mais informadas e saudáveis.

Por fim, vale destacar que, o trabalho realizado limitou-se ao desenvolvimento do método que permite o estudo aprofundado desses analitos nas amostras de salmão e sardinha. Os resultados alcançados não devem ser tomados como representativos para a população dessas duas espécies. Para isso, seria necessária uma amostragem maior considerando fatores bióticos e sazonais, o que foge do escopo proposto.

REFERÊNCIAS

- ADRIANO, L. H. et al. Tutorial para aplicação didática de planejamentos de misturas utilizando LibreOffice e RStudio. **Química Nova**, 2024.
- AMORIM, T. L. et al. A validated capillary electrophoresis method for fatty acid determination in encapsulated vegetable oils supplements. **LWT**, v. 114, 2019a.
- AMORIM, T. L. et al. A fast and validated capillary zone electrophoresis method for the determination of selected fatty acids applied to food and cosmetic purposes. **Analytical Methods**, v. 11, n. 43, p. 5607–5612, 2019b.
- AMORIM, T. L. et al. Fast capillary electrophoresis method for determination of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids in marine oils omega-3 supplements. **Journal of Chromatography A**, v. 1613, 2020.
- AMORIM, T. L. et al. Capillary electromigration methods for fatty acids determination in vegetable and marine oils: A review. **Electrophoresis**, v. 42, n. 3, p. 289–304, 2021.
- AOCS, **Official Method 996.06, Fatty acids in oils and fats**, 2005.
- AOCS, **Official Method CE 1f96, Determination of cis and trans fatty acids in hydrogenated and refined oils and fats by capillary GLC**, 2002.
- BAKER, D. R. **Capillary Electrophoresis (Techniques in Analytical Chemistry)**. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995.
- BARRA, P. M. C. et al. Study of fatty acids profile in biological sample by capillary zone electrophoresis associate to chemometric approach. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 4, p. 675–685, 2014.
- BENJAMIM, C. J. R. et al. O consumo de ômega 3 e 6 e a sua relação com doenças crônicas não transmissíveis. **Revista E-Ciência**, v. 6, n. 2, 2019.
- BERG, J. M. et al. **Bioquímica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021.
- BORGHESI, R. et al. **Influência da Nutrição sobre a Qualidade do Pescado: Especial Referência aos Ácidos Graxos**. Corumbá: Embrapa Pantanal; Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2013.
- BRASIL. Resolução RDC Nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.
- CARDONE, M. J.; PALERMO, P. J.; SYBRANDT, L. B. Potential error in single-point-ratio calculations based on linear calibration curves with a significant intercept. **Analytical Chemistry**, v. 52, n. 8, p. 1187–1191, 1980.
- CHAROENWOODHIPONG, P. et al. Dietary Omega Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Patient-Reported Outcomes in Systemic Lupus Erythematosus: The Michigan Lupus

Epidemiology and Surveillance Program. **Arthritis Care and Research**, v. 72, n. 7, p. 874–881, 2020.

CURI, R. et al. **Entendendo a gordura: os ácidos graxos**. São Paulo, Brazil: Manole; 2002.

D'ANGELO, S.; MOTTI, M. L.; MECCARIELLO, R. ω -3 and ω -6 Polyunsaturated Fatty Acids, Obesity and Cancer. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2751, 2020.

DE OLIVEIRA, M. A. L. et al. Factorial design of electrolyte systems for the separation of fatty acids by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 924, 2001.

DE OLIVEIRA, M. A. L. et al. 20 years of fatty acid analysis by capillary electrophoresis. **Molecules**, 2014.

DE SOUZA, S. M. G.; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 na nutrição de peixes-fontes e relações. *Revista de Ciências Agroveterinárias*, v. 6, n. 1, p. 63-71, 2007.

DUARTE, L. M. et al. A CZE-UV Method for Saturated and Unsaturated Fatty Acids Determination in Hops. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 78, n. 1, p. 32–40, 2020.

FARIA, A. F. et al. Validation of a Capillary Zone Electrophoresis Method for the Determination of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Moxifloxacin and Ofloxacin in Pharmaceutical Formulations. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 19, n. 3, p. 389-396, 2008.

FERREIRA, S. L. C. et al. Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods. **Analytica Chimica Acta**, v. 597, n. 2, p. 179–186, 2007.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2020**, 2020.

GERALDO, P. A. et al. Fatty acids analysis by capillary electrophoresis: Fundamentals, advantages and applications. **Electrophoresis**, v. 45, n. 1–2, p. 35–54, 2024.

HANNA, V. S.; HAFEZ, E. A. A. Synopsis of arachidonic acid metabolism: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 23–32, 2018.

HARAYAMA, T.; SHIMIZU, T. Roles of polyunsaturated fatty acids, from mediators to membranes. **Journal of Lipid Research**, v. 61, n. 8, p. 1150–1160, 2020.

HARBIGE, L. S. Dietary n-6 and n-3 fatty acids in immunity and autoimmune disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 555-562, 1998.

HARRIS, D. C. **Analítica Química Quantitativa**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.

HERTER-AEBERLI, I. et al. Validation of a food frequency questionnaire to assess intake of n-3 polyunsaturated fatty acids in switzerland. **Nutrients**, v. 11, n. 8, 2019.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos**. Inmetro. Rio de Janeiro, 2018.

KISH-TRIER, E. et al. Quantitation of total fatty acids in plasma and serum by GC-NCI-MS. **Clinical Mass Spectrometry**, v. 2, p. 11–17, 2016.

KROMANN, N.; GREEN, A. Epidemiological Studies in the Upernavik District, Greenland: Incidence of Some Chronic Diseases 1950–1974. **Acta Medica Scandinavica**, v. 208, n. 1–6, p. 401–406, 1980.

LEMOINE, C. et al. Relationship between Omega-3 and Omega-6 Fatty Acid Intake and Chronic Obstructive Pulmonary Disease Morbidity. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 17, n. 3, p. 378–381, 2020.

LIPUT, K. P. et al. Effects of dietary n–3 and n–6 polyunsaturated fatty acids in inflammation and cancerogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.

MANCE, T. C. et al. The role of omega6 to omega3 ratio in development and progression of age-related macular degeneration. **Collegium antropologicum**, v. 35 Suppl 2, p. 307–10, 2011.

MARTIN, C. A. A. et al. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: importance and occurrence in foods. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 6, p. 761-770, 2006.

MOREIRA, O. B. O. et al. Determination of creatinine in urine and blood serum human samples by CZE-UV using on-column internal standard injection. **Talanta**, v. 258, p. 124465, 2023.

NAVARRO, R. D. et al. Nutrição e alimentação de reprodutores de peixes. **Revista Augustus**, n. 30, 2010.

NETO, B. DE. B.; SCARMINIO, I. SPACINO.; BRUNS, R. EDWARD. **Como fazer experimentos pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Editora da Unicamp, 2001.

NEVES, L. N. O. et al. Lactulose determination in UHT milk by CZE-UV with indirect detection. **Food Chemistry**, v. 258, p. 337–342, 2018.

OSTERMANN, A. I. et al. Determining the fatty acid composition in plasma and tissues as fatty acid methyl esters using gas chromatography - a comparison of different derivatization and extraction procedures. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 91, n. 6, p. 235–241, 2014.

PARASANNANAVAR, D. et al. Omega-3 polyunsaturated fatty acid intake and plasma fatty acids of school going Indian children - a cross-sectional study. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 170, p. 102294, 2021.

PATRÍCIA MENDONÇA DE CASTRO BARRA. **Determinação de ácidos graxos em amostras alimentícias e biológicas utilizando eletroforese capilar de zona**. Juiz de Fora: Universidade Federal de Juiz de Fora, 2014.

- PHILIBERT, A. et al. **Fish intake and serum fatty acid profiles from freshwater fish. Am J Clin Nutr.** v. 84, p. 1299-307, 2006.
- PIMENTEL, M. F.; NETO, B. DE B. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v. 19, n. 3, p. 268–277, 1996.
- QUEIROZ, S. C. DO N.; JARDIM, I. C. S. F. Eletroforese Capilar. **Chemkeys**, 2001.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.
- RODRIGUEZ, D. et al. Update on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on Cardiovascular Health. **Nutrients**, v. 14, n. 23, p. 5146, 2022.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 8. ed. São Paulo: Thompson, 2006.
- SKOOG, D. A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**. 5. ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), 2002.
- SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C. B. **Química Orgânica**. Rio de Janeiro: LTC, 2015.
- SPUDEIT, D. A.; DOLZAN, M. D.; MICKE, G. A. Conceitos básicos em eletroforese capilar. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 287–297, 2012.
- STANHISER, J. et al. Omega-3 fatty acid supplementation and fecundability. **Human Reproduction**, v. 37, n. 5, p. 1037–1046, 2022.
- SUÁREZ-MAHECHA, H. et al. **Boletim do Instituto de Pesca**. v. 28, n. 1, p. 101-110, 2002.
- TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, 1997.
- VAZ, F. A. S.; DE OLIVEIRA, C. L. M.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Fundamentals of capillary electrophoresis: an animation approach. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 732–737, 2015.
- VISENTAINER, J. Influence of diets enriched with flaxseed oil on the α -linolenic, eicosapentaenoic and docosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p. 557–560, 2005.
- VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: A vida em nível molecular**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.
- WU, D.; MEYDANI, S. N. n-3 Polyunsaturated fatty acids and immune function. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 57, p. 503-509, 1998.
- YONEZAWA, K. et al. Recent trends in mental illness and omega-3 fatty acids. **Journal of Neural Transmission**, v. 127, n. 11, p. 1491–1499, 2020.

ZOTOV, V. A.; BESSONOV, V. V.; RISNIK, D. V. Methodological Aspects of the Analysis of Fatty Acids in Biological Samples. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 83–95, 2022.

ANEXO A – Créditos de disciplinas para integralização do currículo

Disciplina	Créditos
Aplicações do Software R em Quimiometria e Química Ambiental (PUC/Rio)	3
Planejamento e Otimização de Experimentos (UFJF)	4
Química Analítica Avançada (UFJF)	4
Seminários I	1
Estágio Docência I	1

ANEXO B – Carga horária dedicada a Atividade Prática Docente (Tutoria)

Disciplina de Graduação	Carga Horária
Laboratório de Análises Volumétricas	30
Laboratório de Transformações Químicas	30
Laboratório de Química Analítica V	60

ANEXO C – Artigos publicados e em desenvolvimento durante o Mestrado

1. **Artigo publicado:** Fatty acids analysis by capillary electrophoresis: fundamentals, advantages and applications (DOI: 10.1002/elps.202300144).







Received: 30 June 2023 | Revised: 16 October 2023 | Accepted: 23 October 2023

DOI: 10.1002/elps.202300144

ELECTROPHORESIS

REVIEW

Fatty acids analysis by capillary electrophoresis: Fundamentals, advantages and applications

Patrícia Abranches Geraldo¹  | Arthur Woyames de Castro Velasco¹ |
 Bruna Marchiori Berlande¹ | Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza¹  |
 João Marcos Beraldo Candido¹  | Luiz Henrique Cantarino Adriano¹ |
 Marco Antônio Domingues Assad e Brito¹ | Maria Patricia do Nascimento¹  |
 Olívia Brito de Oliveira Moreira¹  | Marcone Augusto Leal de Oliveira^{1,2} 

¹Grupo de Química Analítica e Quimiometria–GQAQ, Chemistry Department, Institute of Exact Sciences, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

²National Institute of Science and Technology for Bioanalytics–INCTBio, Institute of Chemistry, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

2. **Artigo publicado:** Capillary electromigration techniques applied to clinical chemistry investigations and alternative diagnostic assays: possibilities and perspectives (DOI: 10.21577/0103-5053.20230096).








Review

<https://dx.doi.org/10.21577/0103-5053.20230096>

J. Braz. Chem. Soc., Vol. 00, No. 00, 1-23, 2023
 ©2023 Sociedade Brasileira de Química



Capillary Electromigration Techniques Applied to Clinical Chemistry Investigations and Alternative Diagnostic Assays: Possibilities and Perspectives

Olívia B. O. Moreira, ^a Bruna M. Berlande,^a Jéssica C. Q. de Souza, ^a João Marcos B. Candido, ^a
 Lauren H. Jaeger, ^b Luiz Henrique C. Adriano,^a Marco Antônio D. A. e Brito,^a
 Maria Patrícia do Nascimento, ^a Patrícia A. Geraldo,^a Paula R. Chellini ^{a,b} and
 Marcone Augusto L. de Oliveira ^{*,a,c}

^aGrupo de Química Analítica e Quimiometria (GQAQ), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), 36036-900 Juiz de Fora-MG, Brazil

^bFaculdade de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), 36036-900 Juiz de Fora-MG, Brazil

^cInstituto Nacional de Ciência e Tecnologia de (INCTBio), Instituto de Química, Universidade de Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas-SP, Brazil

3. **Artigo sob revisão:** Sample preparation approaching for investigation of fatty acids in biological fluids and analysis by capillary electrophoresis: the art state and applications
Autores: Patrícia Abranches Geraldo, Maria Patrícia do Nascimento, Bruna Marchiori Berlande, Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza, Luiz Henrique Cantarino Adriano e Marcone Augusto Leal de Oliveira.

4. **Artigo em desenvolvimento:** Multi-analytical techniques for chloroquine, primaquine, hydroxychloroquine, and quinine analysis in pharmaceutical formulations: a comparative study.
Autores: Jéssica Cordeiro Queiroz de Souza, Patrícia Abranches Geraldo, Larissa dos Anjos Castro, Paula Rocha Chellini e Marcone Augusto Leal de Oliveira.

ANEXO D – Participação em projetos durante o Mestrado

1. **Projeto:** É integrante do projeto “Programa de monitoramento de gordura *trans* em alimentos”, coordenado pelo Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira em parceria com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

ANEXO E – Participação em banca de Trabalho de Conclusão de Curso

1. **Título:** Avaliação de descolorantes capilares e resistência dos fios de cabelo à processos químicos. 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Curso de Farmácia) – Universidade Federal de Juiz de Fora.