



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

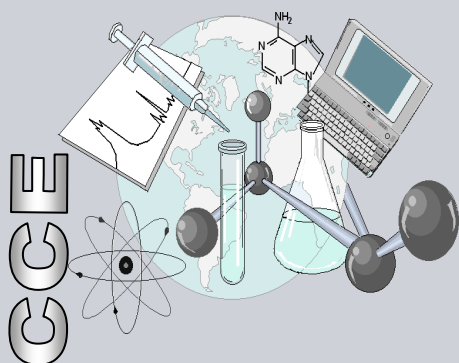
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Quantificação em ácidos graxos, antioxidantes e desenvolvimento de metodologia para extração lipídica, em tecido muscular de peixes”

tese apresentada por
Paula Fernandes Montanher ao
Programa de Pós-Graduação em
Química do Departamento de
Química do Centro de Ciências
Exatas da Universidade Estadual de
Maringá como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Doutora
em Química.



**Centro de
Ciências Exatas**

MARINGÁ, NOVEMBRO 2014

Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós Graduação

"Quantificação em ácidos graxos, antioxidantes e desenvolvimento de metodologia para extração lipídica, em tecido muscular de peixes"

Tese apresentada por **Paula Fernandes Montanher** ao programa de Pós-graduação em Química do centro de Ciências Exatas da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer

Maringá Novembro/2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

M764q Montanher, Paula Fernandes
Quantificação em ácidos graxos, antioxidantes e desenvolvimento de metodologia para extração lipídica, em tecido muscular de peixes / Paula Fernandes Montanher. -- Maringá, 2014.
94 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Ácidos graxos - Análise química. 2. Ácidos graxos poliinsaturados. 3. Esterificação - Ésteres metílicos de ácidos graxos. 4. Cromatografia gasosa - Quantificação. 5. Ácido Alfa-linolênico (LNA). 6. Peixes - Atividade antioxidante. 7. Metodologia de extração lipídica. I. Visentainer, Jesuí Vergílio, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Exatas. Departamento de Química. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDD 21.ed. 547.77

MN-001699



Universidade Estadual de Maringá

Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Tese apresentada por **Paula Fernandes Montanher**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 21 de novembro de 2014.

COMISSÃO JULGADORA:

.....
Prof. Dr. Jesu Vergílio Visentainer
PRESIDENTE - DQI/UEM

.....
Prof. Dr. Makoto Matsushita
MEMBRO - DQI/UEM

.....
Profa. Dra. Juliana Carla Garcia Moraes
MEMBRO - DQI/UEM

.....
Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafe
MEMBRO - UTFPR

.....
Profa. Dra. Solange Maria Cottica
MEMBRO - UTFPR

"A amizade desenvolve a felicidade e reduz o sofrimento,
duplicando a nossa alegria e dividindo a nossa dor".
(Joseph Addison)

"Não sabendo que era impossível foi lá e fez"
(Jean Cocteau)

Meu amor e meu companheirismo,
ao meu esposo Claudemir.

Meu amor e minha gratidão, ao
meu pai Luiz e minha mãe
Aparecida.

Meu amor e minha saudade a meu
avô Sebastião (*in memoriam*).

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar presente em todos os momentos de minha existência.

Ao Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer pela orientação, oportunidade de crescimento profissional e confiança depositada.

Ao Prof. Dr. Makoto Matsushita por sua prestatividade, e conhecimentos compartilhados.

À minha família, pelo carinho, incentivo e paciência.

Ao meu esposo, Claudemir pelos conselhos e apoio.

À minha irmã Silvana, pelo carinho, convívio, sugestões e ajuda no trabalho.

À meus amigos: Fabiana, Joana, Érica, Ingrid, Polyana, Solange, Elton, Oscar Beatriz, Vanessa e Hevelise pelo carinho e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À meus amigos: Thiago, Swami e Sylvio pelos bons conselhos e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

À meus amigos: Renata, Sabrina, Luana e Fernando pela auxílio na construção da base do meu conhecimento, pela amizade e apoio durante a realização desse trabalho.

À meus amigos de laboratório: Aline, Bia, Suellen, Eliza, Sheiza, Laura, Vanessa Jorge, Antônio, Michele, Marina pelo convívio e amizade.

Aos funcionários da UEM: Dirceu (*in memoriam*), André, Ariovaldo, Airton, Claudemir e Cristina pelos préstimos.

Ao CNPQ pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Química, em especial ao Programa de Pós-graduação, pelos conhecimentos adquiridos neste curso.

À empresa Wacker Química do Brasil Ltda pela prestatividade e gentileza em fornecer a methyl- β -cyclodextrin reagente de fundamental importância para o desenvolvimento desse trabalho.

E a todos cujos nomes não foram citados, mas que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Sumário

Lista de Figuras	I
Lista de Tabela	III
Lista de Abreviações	V
Resumo	VII
Abstract	VIII
Introdução Geral	1
Referências	3
Capítulo I - Revisão Bibliográfica	6
1. Piscicultura	6
2. Ácidos graxos.....	7
2.1 Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6.....	7
3. Capacidade antioxidante.....	10
3.1 ORAC (<i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>).....	12
4. Chia (<i>Salvia Hispanica L.</i>).....	14
5. Casca do abacate (<i>Persea americana</i>).....	15
Referências	17
Capítulo II - Quantificação de ácidos graxos e capacidade antioxidante em filés de tilápias do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>) suplementadas com óleo de Chia (<i>Salvia hispanica L.</i>) e extrato de antioxidante natural	23
Resumo	24
Abstract	25
1. Introdução	26
2. Materiais e métodos	28
2.1. Tratamentos e amostragem	28
2.2. Preparo do extrato etanólico da casca do abacate	29
2.3 Composição proximal	29
2.4. Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos	30
2.5. Análise da capacidade antioxidante por L-ORAC _(FL) e H-ORAC _(FL)	31
2.6. Análise Estatística.....	33
2.6.1. Rações e capacidade antioxidante	33

2.6.2. Ácidos graxos dos filés de tilápia	33
3. Resultados e Discussão	34
3.1. Ganho de massa das tilápias	34
3.2. Quantificação de ácidos graxos	35
3.2.1. Rações	35
3.2.2. Filés de tilápia	37
3.3. Índice de Qualidade Nutricional	40
3.4. Capacidade Antioxidante das rações formuladas e dos filés de tilápia	41
4. Conclusão	45
5. Referência	46
Anexos	51

Capítulo III - Quantificação de ácidos graxos e capacidade antioxidante em diferentes espécies de peixes marinhos..... 55

Resumo	56
Abstract	57
1. Introdução	58
2. Materias e Métodos	59
2.1. Amostragem	59
2.2. Composição centesimal	59
2.3. Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos	60
2.4. Análise da capacidade antioxidante por L-ORAC _(FL) e H-ORAC _(FL)	61
3. Resultados e discussão	63
3.1. Composição centesimal	63
3.2. Composição em ácidos graxos	64
3.3. Capacidade antioxidante.....	67
4. Conclusão	70
5. Referência	71

Capítulo IV - Desenvolvimento de nova metodologia para extração de lipídios totais em tecido muscular de peixes

Resumo	76
Abstract	76
1. Introdução	78

2. Materias e métodos	79
2.1. Amostragem	79
2.2. Extração de lipídios utilizando a metodologia de Bligh & Dyer	79
2.3. Extração de lipídios empregando uma nova proposta	80
2.4. Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos	82
2.5. Separação de Classe	83
2.6. Análise estatística	84
3. Resultados e discussão	84
3.1. Lipídios Totais	84
3.2. Análise de ácidos graxos	86
3.3. Análise de PCA (<i>Principal Components Analysis</i>)	88
4. Conclusão	91
5. Referência	92
Considerações finais	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

- Figura 1.** Molécula de triacilglicerol (R1, R2, R3 são unidades de ácidos graxos, que podem ser iguais ou diferentes)6
- Figura 2.** Estrutura dos principais ácidos graxos da família ômega-6 e ômega-3 (Perini *et al.*, 2010).....7
- Figura 3.** Conversão dos ácidos graxos ácido alfa-linolênico (18:3n-3, LNA) e ácido linoleico(18:2n-6, LA) em ácidos graxos de cadeia longa8
- Figura 4.** Etapas da reação radicalar, em que: RH=Substrato, R• = radical livre ROO• = radical peróxido, ROOH=Hidroperóxido. (Ramalho & Jorge 2006)..... 11
- Figura 5.** Mecanismo de ação dos antioxidantes em que: ROO• e R• = radicais livres; AH = antioxidante, A•= radical inerte (Ramalho & Jorge 2006)..... 11
- Figura 6.** Formação do radical peroxila (ROO•) a partir da molécula de AAPH (Zulueta *et al.*, 2009) 13
- Figura 7.** Mecanismo proposto por Ou *et al.*, 2001 para oxidação da fluoresceína na presença do radical peroxila formado pelo AAPH..... 13
- Figura 8.** Exemplo de um gráfico obtido após análise de ORAC. A área entre o Branco e a amostra é referente ao NET (UAC - *Under the curve*) 14
- Figura 9.** Chia (*Salvia hispanica L.*)..... 15

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Média do ganho de massa dos peixes submetidos a diferentes tratamentos com rações suplementados: TI = extrato etanólico da casca do abacate, TII= óleo de chia, TIII= óleo de chia mais extrato etanólico da casca de abacate, no período de 45 dias.....34
- Figura 2.** Análise multivariada de ordenação por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da composição de ácidos para as variáveis: LNA (A), LA (B), EPA (C), DHA (D) e AA (E) dos filés de tilápia dos tratamentos: TI (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate, TII (1,90% de óleo de chia) e TIII (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate e 1,90% de óleo de chia) . Quanto maior o círculo cinzento, maior a quantidade em mg g⁻¹ de LT do ácido graxo correspondente.37

Figura 3. Análise multivariada de ordenação por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da composição de ácidos para as variáveis: Total n-3 (A), Total n-6 (B), Total MUFA (C), Total SFA (D), Total PUFA (E) e razão n-6/n-3 (F) dos filés de tilápia dos tratamentos: TI (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate, TII (1,90% de óleo de chia) e TIII (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate e 1,90% de óleo de chia) . Quanto maior o círculo cinzento, maior a quantidade em mg g⁻¹ de LT do ácido graxo correspondente.....38

Figura 4. Coeficiente de correlação obtidos das curvas de capacidade antioxidante *versus* (A) teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e (B) somatórios de ácidos graxos ômega-3 (n-3)43

CAPÍTULO III

Figura 1. Capacidade antioxidante em $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra seca, para L-ORAC_(FL) e H-ORAC_(FL) das diferentes espécies de peixes analisadas67

CAPÍTULO IV

Figura 1. Diagrama de fase do hexano-acetona-água em % (m/m) a 25°C81

Figura 2. Percentual de variância explicada para a componente principal88

Figura 3. Loading plot PC1–PC2 (A) Scores plot PC1–PC2 (B) para o somatório de ácidos graxos do metodologia proposta e de Bligh & Dyer (A)89

LISTA DE TABELAS

CAPITULO II

Tabela 1. Composição das rações utilizadas nos diferentes tratamentos	28
Tabela 2. Quantificação de ácidos graxos nas rações dos diferentes tratamentos .	35
Tabela 3. Composição de ácidos graxos (mg g^{-1} de lipídios totais) e teor de lipídios totais ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ de amostra) dos filés de tilápia referentes ao tratamento I.....	52
Tabela 4. Composição de ácidos graxos (mg g^{-1} de lipídios totais) e teor de lipídios totais ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ de amostra) dos filés de tilápia referentes ao tratamento II	53
Tabela 5. Composição de ácidos graxos (mg g^{-1} de lipídios totais) e teor de lipídios totais ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ de amostra) dos filés de tilápia referentes ao tratamento III	54
Tabela 6. Qualidade nutricional dos filés de tilápia determinada a partir dos índices de aterogenicidade, trombogenicidade, e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos	41
Tabela 7. Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio de ORAC Hidrofílico ($\text{H-ORAC}_{\text{FL}}$) e lipofílico ($\text{L-ORAC}_{\text{FL}}$) em μmol de ET g^{-1} de amostras seca das rações e dos filés de tilápia.	42

CAPITULO III

Tabela 1. Nome científico e comum das espécies de peixes analisadas	59
Tabela 2. Composição centesimal em % (m/m) das diferentes espécies de peixes marinhos analisadas.	63
Tabela 3. Composição de ácidos graxos em mg g^{-1} de LT referentes as espécies estudadas.....	65
Tabela 4. Somatórios e razões de ácidos graxos das diferentes espécies de peixes estudadas	66

CAPITULO IV

Tabela 1. Toxidade dos solventes utilizados na metodologia proposta e no método de Bligh & Dyer de acordo com o diagrama de Hommel.....	80
Tabela 2. Volumes de clorofórmio metanol e água utilizados nos diferentes pontos escolhidos do diagrama de fases.....	81

Tabela 3. Porcentagem de lipídios totais obtidos em cada ponto do diagrama de fases, e pela metodologia Bligh & Dyer85

Tabela 4. Composição de ácidos graxos (mg g^{-1} LT) das frações neutra e polar e total dos filés de sardinha submetidos a extração de LT pela metodologia proposta e pelo método de Bligh & Dyer87

LISTA DE ABREVIações

AA= Ácido graxo Araquidônico

AG = Ácidos graxos

AGMI = somatório de ácidos graxos mono-insaturados

AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados;

AGS= somatório de ácidos graxos saturados

AHA= American Heart Association

DHA = Ácido docosahexaenoico

EECA= Extrato etanólico da casca do abacate

EPA = Ácido eicosapentaenoico

ERN = Espécies reativas de nitrogênio

ERO = Espécies reativas de oxigênio

HH= Razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos

IA= Índices de aterogenicidade

IT= Índices de

LN = Ácido linoleico

LN= Lipídios neutros

LNA = Ácido alfa-linolenico

LP = Lipídios polares

LT = Lipídios totais

n-3= somatório de ácidos graxos ômega-3

n-6 = somatório de ácidos graxos ômega-6

n-6/n-3= Razão entre os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6

ORAC = *Oxygen Radical Absorbance Capacity*

PAN = Anchova

PCA = *Principal Components Analysis*

PD = Peixe Dourado

PM = Peixe Meka

PN = Peixe Namorado

PO = Peixe Olhete

PPB = Peixe Pescada Branca

RMCD = Randomina metil beta-ciclodextrina

TE= *Trolox equivalent*

TAG = Triacilglicerol

TI = Tratamneto I

TII = Tratamneto II

TIII = Tratamneto III

Resumo: O objetivo desse estudo foi investigar a capacidade antioxidante em peixes marinhos e em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), alimentadas com ração suplementada, aplicando a metodologia de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e analisando separadamente os antioxidantes hidrofílicos e lipofílicos. Além disso, esse trabalho buscou realizar um levantamento da composição em ácidos graxos, nas amostras mencionadas, utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização em chama. Por fim foi proposta uma nova metodologia de extração de lipídios totais em tecido muscular de peixes. Dessa forma, este trabalho foi dividido em quatro capítulos, em que o capítulo I se refere ao levantamento bibliográfico, o capítulo II aborda as informações referentes ao estudo de incorporação de ácidos graxos e antioxidantes em tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com ração enriquecida com óleo de chia (*Salvia hispanica*) e extrato etanólico da casca do abacate (*Persea americana*). Neste estudo, foi constatado um aumento no total de ácidos graxos ômega-3 e na capacidade antioxidante da fração lipofílica (L-ORAC_(FL)) nos tratamentos onde houve a inserção do óleo de chia após 45 dias de alimentação. No Capítulo III foi realizado um levantamento da capacidade antioxidante e da composição em ácidos graxos de seis espécies de peixes comuns na costa sul brasileira. Todas as espécies apresentaram quantidades significativas dos ácidos graxos eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e o docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), sendo que um coeficiente de correlação de Person (r) de 0,72 foi obtido entre os ácidos graxos poli-insaturados e a capacidade antioxidante dos compostos lipofílicos. O capítulo IV apresenta a proposta de uma metodologia de extração de lipídios totais (LT) de tecido muscular de peixes, utilizando solventes de menor toxicidade, como uma alternativa a metodologia de Bligh & Dyer (1959). Não foi verificada diferença estatística ($p < 0,05$) nos teores de LT obtidos pela metodologia proposta e a de Bligh & Dyer.

Palavras-chave: ômega-3, Chia, abacate, antioxidante.

Abstract: The aim of this study was to investigate the antioxidant capacity of hydrophilic and lipophilic extracts from fish muscle tissue, applying ORAC methodology (Oxygen Radical Absorbance Capacity). A study of fatty acid composition and the development of a new method for total lipids extraction were also performed. This study was divided into four chapters, in which Chapter I is the review, Chapter II deals with the information related to the study of fatty acids and antioxidants incorporation in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed with diet enriched in chia (*Salvia hispanica*) oil and avocado (*Persea americana*) peel extract. That study found an increase in total omega-3 fatty acids and antioxidant capacity of lipophilic fraction (L-ORAC_(FL)) in treatments where there was the inclusion of chia oil after 45 days of feeding. In Chapter III a survey of antioxidant capacity and fatty acid composition of six fish species common in the southern Brazilian coast was conducted. All species showed significant amounts of fatty acids eicosapentaenoic (EPA, 20: 5n-3) and docosahexaenoic (DHA, 22: 6n-3), a Pearson's correlation coefficient (r) of 0.72 was obtained between poly-unsaturated fatty acids and lipophilic antioxidant capacity. Chapter IV presents the proposed methodology for total lipids (TL) extraction from fish muscle tissue, using lower toxicity solvents, as an alternative methodology for Bligh & Dyer (1959). There was no statistical difference (p <0.05) in the levels of TL obtained by the proposed method and the Bligh & Dyer.

Keywords: omega-3, chia, avocado, antioxidant.

Introdução Geral

Os componentes lipídicos, especialmente os ácidos graxos, são nutrientes importantes para o organismo humano. Estão presentes nas mais diversas formas de vida e desempenham importantes funções na estrutura das membranas celulares e nos processos metabólicos (Large *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2006).

Alguns ácidos graxos são sintetizados pelo organismo, por meio da *síntese de novo*, outros devem ser obtidos pela dieta, tais como o ácido alfa-linolênico (18:3n-3, LNA) e o ácido linoleico (18:2n-6, LA) (Perini *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2003).

Por meio do LNA e do LA o organismo é capaz de sintetizar ácidos graxos poli-insaturados n-6 e n-3 (AGPI n-6 n-3) de cadeia mais longa como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), e o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6), que são de importância fundamental para a boa manutenção da saúde (Farhat *et al.*, 2011; Mazza *et al.*, 2007; Passi *et al.*, 2002).

Estes processos metabólicos são mediados pelas enzimas chamadas elongases e dessaturases, as quais participam tanto da formação dos AGPI n-6 quanto dos AGPI n-3, resultando assim em uma competição metabólica entre os dois grupos de ácidos graxos (Salem, 1999).

Dessa forma recomenda-se uma ingestão equilibrada dos ácidos graxos n-6 e n-3. Simopoulos, 2011 sugere que uma razão entre n-6/n-3 em torno de 1:1, contudo em dietas ocidentais essa razão é muito superior, podendo estar correlacionada com doenças cardiovasculares, degenerativas e também a saúde mental.

Além dos estudos com ácidos graxos, muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos, relatando os benefícios e a ação dos antioxidantes na saúde humana (Bagchi *et al.*, 2000; Biglari *et al.*, 2008). Porém a análise desses compostos tanto nos alimentos ingeridos quanto em organismo vivos não é uma tarefa trivial (Huang *et al.*, 2005).

Assim pesquisas na área de alimentos, buscando novas técnicas para a determinação de compostos como ácidos graxos e antioxidantes, bem como alimentos que possuem maiores quantidades dessas substâncias é de fundamental importância para a sociedade.

Dessa forma esse trabalho teve como objetivo geral fazer um levantamento da concentração em ácidos graxos em tecido muscular de seis espécies de peixes marinhos e de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), criadas em cativeiro com ração suplementada, utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de ionização em chama.

Além disso, buscou-se determinar, nessas amostras, a capacidade antioxidante de compostos lipofílicos e hidrofílicos utilizando a metodologia de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Além de desenvolver uma nova metodologia para a extração de lipídios totais em tecido muscular de peixes, mantendo a eficiência da extração de diferentes classes de lipídios (polar e neutra) substituindo solventes de alta toxicidade.

Referências

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S., Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 20, 148- 187.

Biglari, F., Alkarkhi, A. F. M., Easa, A. M. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107, 1636-1641.

Carvalho, P. O., Campos, P. R. B., Noffs, M. D. Oliveira, J. G., Shimizu, M. T., Silva, D. M. (2003). Aplicações de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. *Química nova*, 26, 75-80.

Farhat Jabeen, F., Chaudhry, A. S., (2011). Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Food Chemistry*, 125, 991–996.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The Chemistry Behind Antioxidant capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1846.

Large, V., Peroni, O., Letexier, D., Ray, H., Beylot, M. (2004). Metabolism of lipids in human white adipocyte. *Diabetes Metabolismo*, 30, 294-309.

Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer J. E. L., Matshushita, M., Visentainer, J. V. (2006). Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, 19, 761-770.

Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., Mazza, S. (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31, 12–26.

Passi, S., Cataudella, S., Di Marco, P., De Simone, F., Rastrelli, L. (2002). Fatty Acid Composition and Antioxidant Levels in Muscle Tissue of Different Mediterranean Marine Species of Fish and Shellfish. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 7314-7322.

Perini, J. A. L., Stevanato, F. B., Sargi, S. C., Visentainer, J. E. L., Dalalio, M. M. O., Matshushita, M., Souza, N. E., Visentainer, J.V. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Revista de nutrição*, 23, 1075-1086.

Salem, Jr., N. (1999). Introduction to polyunsaturated fatty acids. *Backgrounder PUFA*, 3(1), 1-8.

Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary Aspects of Diets: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Molecular Neurobiology*, 44, 203-215.

Capítulo I - Revisão Bibliográfica

Revisão Bibliográfica

1. Piscicultura

No Brasil a piscicultura, como atividade econômica, teve início em 1980 e mesmo com a falta de experiência e conhecimento das técnicas, baixa qualidade genética e inexistência de uma dieta nutricionalmente adequada, a atividade foi crescendo (Nogueira, 2007).

Na década de 90 pesquisas em manejo começaram a surgir, fazendo com que as rações preparadas atendessem as necessidades nutricionais do pescado (NRC, 1993). Dessa forma os custos com alimentação na piscicultura representam hoje, cerca de 70% dos custos de produção (Meer *et al.*, 1995).

Dentre os peixes cultivados, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma das mais importantes para a piscicultura devida sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições, criação e boa aceitação pelo consumidor, principalmente pela excelente textura e ausência de espinhas intramusculares (Lima *et al.*, 2000; Kubitzka, 2000).

Nutricionalmente as tilápias do Nilo, assim como a maioria dos peixes de águas continentais, apresentam baixos teores dos ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 (AGPI n-3) como os ácidos alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), eicosapentanoico (EPA, 20:5n-3) e docosohexaenoico (DHA, 22:6n-3), quando comparado com peixes marinhos (Stevanato *et al.*, 2008; Luzia *et al.*, 2003; Visentainer *et al.*, 2003).

Isso é agravado pela qualidade nutricional da dieta oferecida aos peixes criados em cativeiro. Na grande maioria dos casos a qualidade lipídica da ração é baixa, com grandes excessos de ômega-6 e baixas quantidades de ômega-3, que tem reflexo direto na composição lipídica da carne do animal (Weaver *et al.*, 2008; Hossain, 2011).

Um estudo recente publicado por Carbonera *et al.*, (2014) mostra que é possível classificar peixes de água doce de acordo com sua origem, cultivo ou selvagens, levando em consideração sua composição em ácidos graxos, mostrando que a alimentação do animal tem interferência direta na composição em ácidos graxos .

2. Ácidos graxos

Os Ácidos graxos (AG) são ácidos carboxílicos, principais componentes das moléculas de triacilgliceróis (TAG), os quais são constituintes dos óleos e gorduras. Em uma molécula de TAG (Figura 1) os AG estão ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol (Geris *et al.*, 2007).

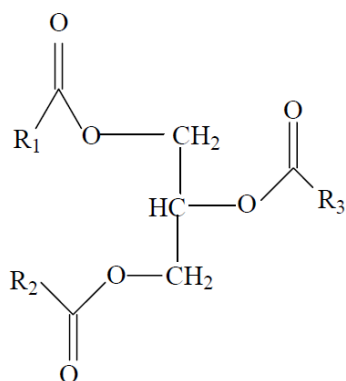


Figura 1. Molécula de triacilglicerol (R1, R2, R3 são unidades de ácidos graxos, que podem ser iguais ou diferentes).

Os AG podem ser classificados de acordo com o comprimento da cadeia carbônica em curta (< 8 carbonos), média (8 a 16 carbonos) e longa (\geq 18 carbonos), e de acordo com as insaturações em saturado (sem insaturações), monoinsaturado (uma insaturação) e poli-insaturado (duas ou mais insaturações) (Fennema, 1996). As propriedades físico-químicas e biológicas dos óleos e gorduras dependem da estrutura e distribuição dos AG presentes nas moléculas dos TAG (Solomons, 2002).

2.1. Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega-6 e ômega-3, apresentam insaturações separadas apenas por um carbono metilênico, com a primeira insaturação no sexto e terceiro carbono, respectivamente, enumerado a partir do

grupo metil terminal de acordo com a nomenclatura ômega (Martin *et al.*, 2006). A Figura 2 apresenta a estrutura dos principais ácidos graxos pertencentes a essa família .

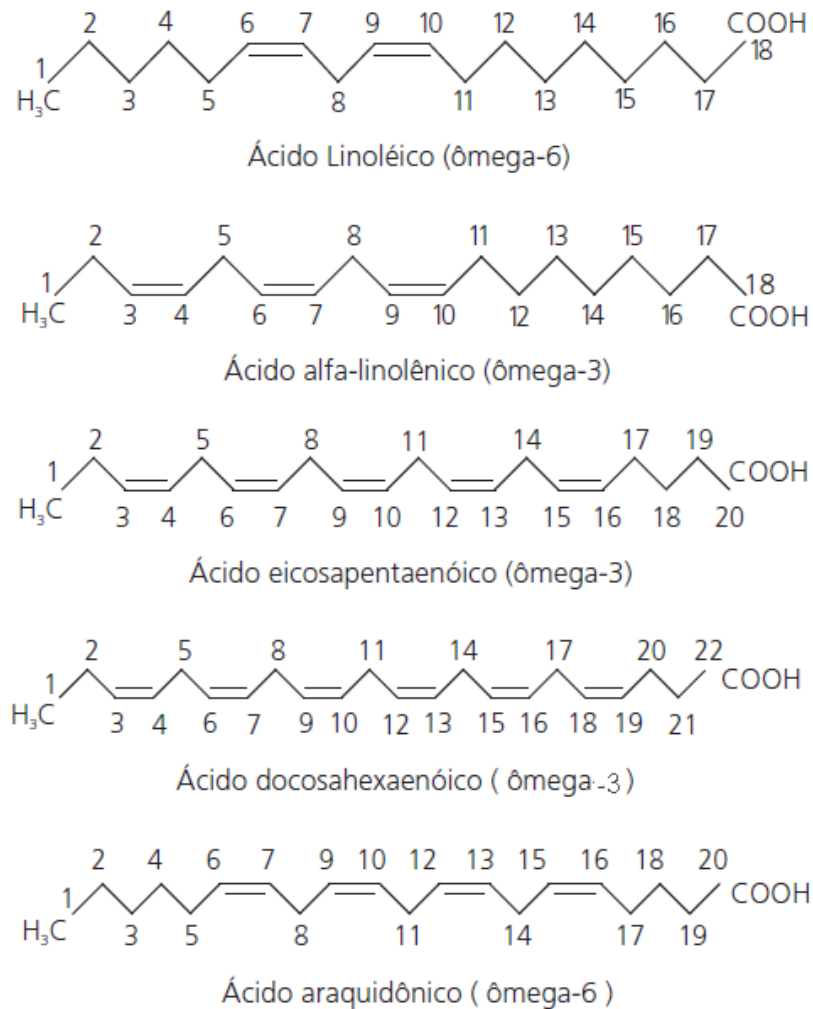


Figura 2. Estrutura dos principais ácidos graxos da família ômega-6 e ômega-3 (Perini *et al.*, 2010).

Estudos demonstram a importância dos ácidos graxos poli-insaturados da família ômega-3, (AGPI n-3) especialmente os ácidos alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e o docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), na prevenção de várias doenças (Passi, 2002; Mazza, 2007; Weaver, 2008).

O EPA e DHA podem atuar na prevenção de doenças cardiovasculares, câncer, redução do risco de doenças coronárias, diminuição do índice glicêmico, artrite reumatoide, além de desempenhar papel vital no desenvolvimento e função do sistema nervoso central e sistema reprodutivo (Weaver, 2008).

Os benefícios dos AGPI n-3 juntamente com o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6), da série n-6, estão associados com a síntese dos eicosanóides, tais como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (Weaver *et al.*, 2008; Tonial *et al.*, 2009).

Os ácidos graxos EPA, DHA e AA podem ser adquiridos da dieta, ou podem ser sintetizados através do LNA, precursor do EPA e DHA e do ácido linoléico(LA, 18:2n-6), precursor do AA. Esses processos metabólicos são mediados pelas enzimas chamadas elongases e dessaturases (Figura 3) (Simopoulos, 2002).

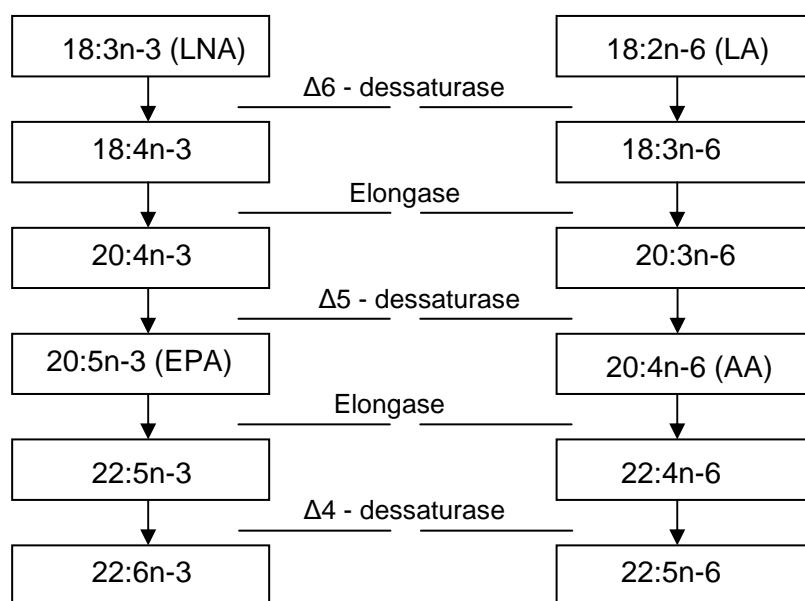


Figura 3. Conversão dos ácidos graxos ácido alfa-linolênico (18:3n-3, LNA) e ácido linoleico(18:2n-6, LA) em ácidos graxos de cadeia longa.

Embora o organismo humano seja capaz de produzir ácidos graxos de cadeia muito longa, a partir do LNA e do LA, sua síntese é afetada por diversos fatores que podem tornar a ingestão desses ácidos graxos essencial para a manutenção de uma condição saudável (Martin *et al.*, 2006).

Nesse sentido os peixes, especialmente os marinhos, são uma rica fonte desses ácidos graxos, principalmente o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (Jabeen *et al.*, 2011; Alasalvar *et al.*, 2002).

A *American Heart Association* (AHA) recomenda para um público em geral, comer pelo menos duas porções de peixe por semana, já para pacientes com doenças cardiovasculares é recomendado o consumo de um grama de EPA+DHA por dia (Weaver *et al.*, 2008).

O fato de se encontrar maiores quantidades de EPA e DHA em peixes marinhos esta relacionado a dieta desses peixes. Na base da cadeia alimentar a principal fonte de energia está nos fitoplanctons e zooplanctons. Essas espécies, de origem marinha, são ricas em ácidos graxos ômega-3, enquanto que as de água doce possuem maior quantidade de ácidos graxos ômega-6 (Sargent *et al.*, 1999; Tocher & Ghioni, 1999).

3. Capacidade antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como compostos que inibem ou retardam a oxidação de outras moléculas, causado principalmente por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (Velioglu *et al.*, 1998; Huang *et al.*, 2005).

Nos sistemas biológicos a superprodução de ERO e ERN, ligada a insuficiência de mecanismos antioxidantes, podem levar a um estresse oxidativo, um processo nocivo que pode ser um importante mediador de danos nas estruturas celulares, incluindo lipídios, membranas, proteínas e DNA (Ribeiro *et al.*, 2013).

Pesquisas mostram que os antioxidantes podem estar correlacionados a prevenção de problemas crônicos de saúde tais como câncer, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e arteriosclerose (Bagchi *et al.*, 2000; Biglari *et al.*, 2008).

Os antioxidantes possuem também um papel de destaque, para a indústria de alimentos. Atuam na inibição de processos de oxidação lipídica (Figura 4), que leva

a formação de produtos indesejáveis, comprometendo a vida de prateleira e a segurança alimentar.

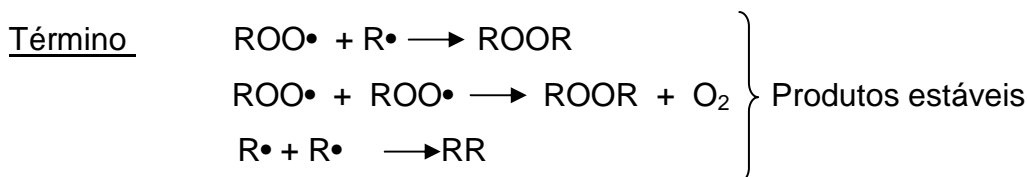
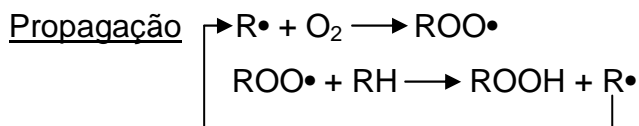


Figura 4. Etapas da reação radicalar, em que: RH=Substrato, R•=radical livre. ROO•=radical peróxido, ROOH=Hidroperóxido (Ramalho & Jorge 2006).

Em termos de mecanismo de ação os antioxidantes podem agir tanto na etapa de iniciação quanto na etapa de propagação radicalar (Figura 5), inibindo os radicais livres e formando produtos com maior estabilidade (Huang *et al.*, 2005).

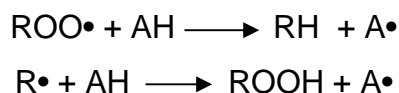


Figura 5. Mecanismo de ação dos antioxidantes em que: ROO• e R• = radicais livres; AH = antioxidante, A•= radical inerte (Ramalho & Jorge, 2006).

Os antioxidantes podem atuar através de outros mecanismos. Capturando oxigênio do meio (removedores de oxigênio), através de reações químicas estáveis, tornando-o assim indisponível para atuar como propagador da oxidação. Podem agir também complexando íons metálicos principalmente cobre e ferro (agentes quelantes) que catalisam a oxidação, ou simplesmente não ter nenhuma atividade antioxidante, porém aumentam a atividade antioxidante de outras substâncias (sinergistas) (Ramalho *et al.*, 2005).

A importância dos antioxidantes, tanto nos sistemas biológicos como na indústria de alimentos, trás um desafio em se tratando de análise desses compostos

(Huang *et al.*, 2005). Não existe uma metodologia oficial para avaliar a capacidade antioxidante total de uma amostra em função da grande complexidade desses compostos (Huang *et al.*, 2005; Prior *et al.*, 2005). Em sistemas biológicos, por exemplo, existem pelo menos quatro fontes gerais de antioxidantes: enzimas, moléculas com elevada massa molecular (albumina, eruloplasmina, ferritina), pequenas moléculas com baixa massa molecular (ácido ascórbico, tocoferol, carotenoides, e alguns hormônios (estrogênio, melatonina, etc). Além de várias fontes de radicais livres (Cerqueira *et al.*, 2007; Prior *et al.*, 2005), tais como: $O_2^{\bullet-}$, HO^{\bullet} , NO^{\bullet} , $ONOO^{\bullet}$, $RO(O)^{\bullet}$.

3.1. ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

A metodologia de ORAC é um método fluorimétrico, desenvolvido inicialmente por Cao *et al.* em 1993, e baseado em trabalhos de DeLange & Glazer, 1989.

O método original consiste em medir a diminuição na fluorescência da proteína beta-ficoeritrina, como um resultado da perda da sua conformação quando sofre danos oxidativos causados por uma fonte de radicais peroxila (ROO^{\bullet}) (Cao *et al.*, 1993).

O uso da beta-ficoeritrina teve uma série de desvantagens, como, fotossensibilidade e interação com compostos fenólicos. Para resolver este problema, Ou *et al.*, (2001) propôs o uso da fluoresceína como molécula alvo.

Dentre as metodologias aplicadas, *in vitro*, atualmente o método de ORAC utilizando a fluoresceína ($ORAC_{FL}$) é uma das mais conceituadas, principalmente pela fonte radicalar utilizada (radical peroxila) (Zueleta *et al.*, 2009; Prior *et al.*, 2005; Cao *et al.*, 1993).

Os antioxidantes podem inibir a atividade dos radicais por doação de elétron ou por doação de átomo de hidrogênio, a metodologia de ORAC se enquadra ao último caso (Huang *et al.*, 2005).

O método consiste basicamente no fato do radical peroxila formado no meio reacional intencionalmente originado pela molécula de AAPH (2,2'-Azobis(2-

amidinopropane) dihydrochloride) (Figura 6), atacar a fluoresceína formando um produto não fluorescente (Figura 7) (Ou *et al.*, 2001; Cao *et al.*, 1993.).

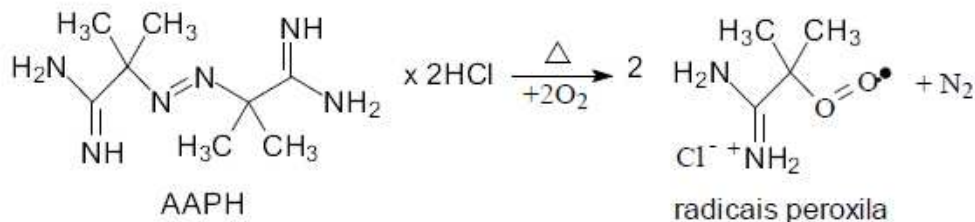


Figura 6. Formação do radical peroxila (ROO•) a partir da molécula de AAPH (Zulueta *et al.*, 2009).

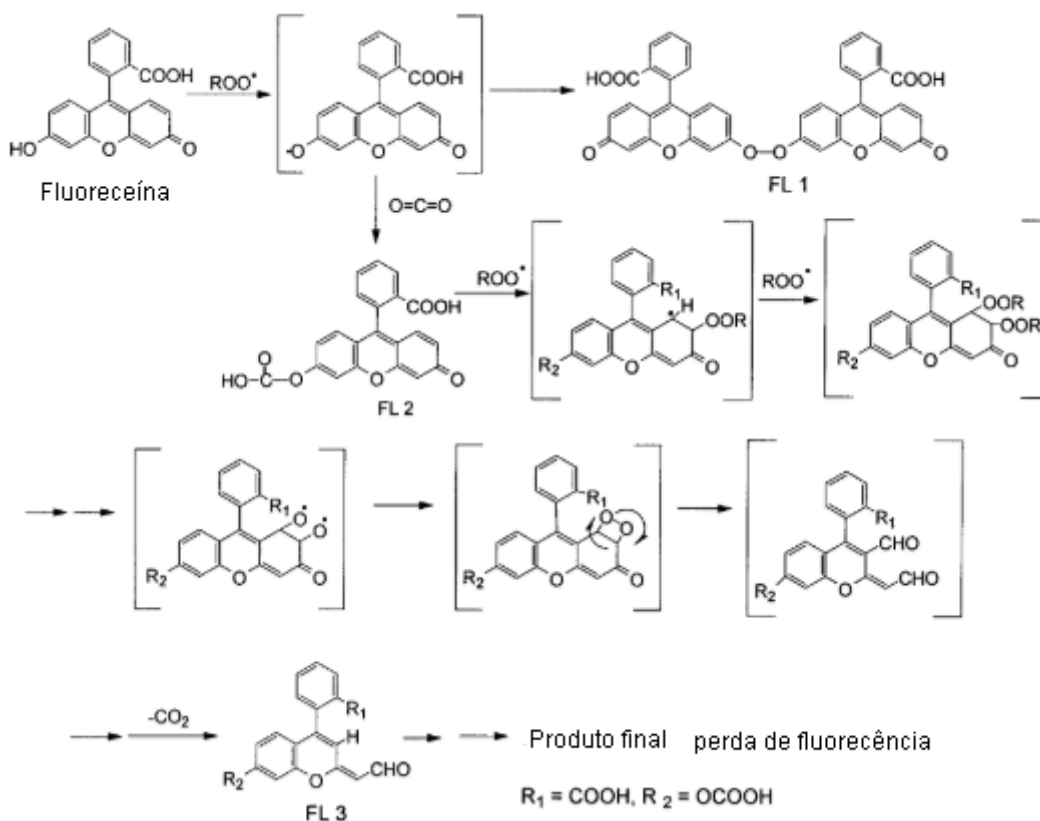


Figura 7. Mecanismo proposto por Ou *et al.*, 2001, para oxidação da fluoresceína na presença do radical peroxila formado pelo AAPH.

O antioxidante no meio reacional doa um átomo de hidrogênio para o radical peroxila estabilizando-o e dessa forma mantendo por um tempo maior a intensidade da fluorescência (Prior *et al.*, 2005).

A atividade antioxidante é determinada através da diferença entre a área da amostra pela área do branco, (Net AUC) (Figura 8) (Zulueta *et al.*, 2009; Prior *et al.*, 2005).

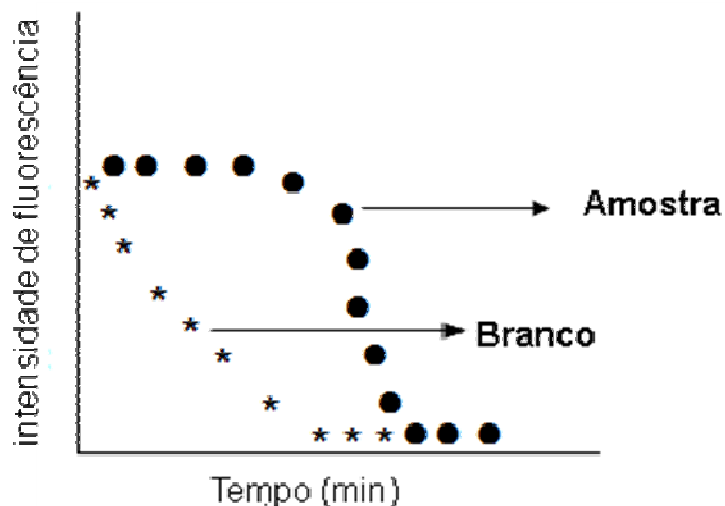


Figura 8. Exemplo de um gráfico obtido após análise de ORAC. A área entre o branco e a amostra é referente ao NET (AUC - Under the curve).

O método original de ORAC mede apenas a capacidade antioxidante de compostos hidrofílicos, excluindo os compostos lipofílicos. Contudo, para se tornar um método mais aplicável Huang *et al.*, 2002 inseriu o uso de uma solução 50% acetona/50% água (v/v), contendo 7% de Randomina metil beta-ciclodextrina (RMCD) para solubilizar os antioxidantes lipofílicos.

4. Chia (*Salvia hispanica L.*)

Nativa do sul do México e norte da Guatemala a Chia (*Salvia hispanica L.*) (Figura 9) se torna cada vez mais importante para a saúde e nutrição humana, devido ao sua composição em ácidos graxos e ao seu alto teor de óleo (25-39%) (Ayerza, 1998; Ting *et al.*, 1990).

Sua composição lipídica apresenta cerca de 60% de LNA, valores bem alto comparados com a soja que possui em torno de 2-10% de LNA (Milinsk *et al.*, 2008; Ayerza, 1998).



Figura 9. Chia (*Salvia hispanica L.*)

Além da excelente qualidade lipídica, apresenta também em sua composição fitoesteróis, vitaminas do complexo B, minerais, compostos com capacidade antioxidante e fibras dietéticas (Ayerza, 1998; Munoz *et al.*, 1999).

Suas proteínas são de alta digestibilidade sendo encontradas em maior teor (19-23%) se comparado à quinoa, aveia, amaranto, trigo, milho, cevada e arroz, além de apresentar os aminoácidos alanina, arginina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, tirosina e valina (Ayerza *et al.*, 1998).

5. Casca de abacate (*Persea americana*)

O abacate tem origem no México e na América central. É um fruto tropical importante comercialmente, sendo o México o maior produtor e consumidor desse produto (Tango *et al.*, 2004).

Uma de suas características marcantes é o alto teor de lipídios, em torno de 30%. A parte comestível do fruto é rico em ácidos oleico, ácido palmítico e o ácido linoleico, além de compostos como vitamina E e carotenóides (Vieites *et al.*, 2012).

O fruto possui uma grande quantidade de mesocarpo, cerca de 70%, sendo o restante casca e semente.

Estudos recentes mostram que a capacidade antioxidante da casca de algumas variedades de abacate, mediante análise de ORAC, obtiveram valores em média de 205 $\mu\text{mol TE/g}$ de amostra fresca (Wang *et al.*, 2010).

Comparando esses valores com os obtidos, usando a mesma metodologia, em frutos como: banana (19,33 $\mu\text{mol TE/g}$ de amostra fresca) manga (10,02 $\mu\text{mol TE/g}$ de amostra fresca), e até mesmo a sua parte comestível (5,25 $\mu\text{mol TE/g}$ de amostra fresca) a capacidade antioxidante desse resíduo pode ser considerada elevada, além disso a casca representa uma parcela considerável do fruto (em torno de 20%) (Wu *et al.*, 2004; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011).

Sub-produtos de frutas podem ser aplicados, por exemplo, para melhoramento nutricional de rações oferecidas para animais. Carbonera *et al.*, (2014), utilizou resíduo de acerola em ração oferecida a tilápias do Nilo, com o intuito de aumentar a capacidade antioxidante dos filés obtendo resultados positivos.

Referências

Alasalvar, C., Tylor, K. D. A., Zubcov, E., Shahidi, F., & Alexis, M., (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acids and trace mineral composition. *Food Chemistry* 9,145-150.

Ayerza, R., Coates, W. (1999). An omega-3 fatty acid enriched chia diet: its influence on egg fatty acid composition, cholesterol and oil content. *Canadian Journal of Animal Science*, 79, 53-58.

Bagchi, D., Bagchi, M., Stohs, S. J., Das, D. K., Ray, S. D., Kuszynski, C. A., Joshi, S. S., Pruess, H. G. (2000). Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology*, 2000, 148-187.

Biglari, F., Alkarkhi, A. F. M., Easa, A. M. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of various date palm (*Phoenix dactylifera*) fruits from Iran. *Food Chemistry*, 107, 1636-1641.

Cao, G., Alessio, H. M., Culter, R. G. (1993). Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Bioogui & Meicine*, 14, 303-311.

Carbonera, F., Montanher, P. F., Palombini S. V., Maruyama, S. A., Claus, T., Santo H. M. C., Sheisa C. S., Matsushita, M., Visentainer, J. V. (2014). Antioxidant Capacity in Tilapia Fillets Enriched with Extract of Acerola Fruit Residue. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 1237-1245.

Cerqueira, F. M., Medeiros, M. H.G., Augusto, O. (2007). Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. *Quimica nova*, 30, 441-449.

DeLange, R. J., Glazer, A. N. (1989). Phycoerythrin Fluorescens-based assay pr peroxy radicals: A screen for biologically relevant protective agents. *Analytical Biochemistry*, 177, 300-306.

Fennema, O. R., (2006). *Food Chemistry*. (3rd ed.) New York: Marcel Dekker, 226.

Geris, R., Santos, N. A. C., Amaral, B. A., Maia, I. S., Castro, V. D., Carvalho, J. R. M. (2007). Biodiesel de soja – Reação de transesterificação para aulas práticas de química. *Química Nova*, 30, 1369-1373.

Geris, R., Santos, N., Amaral, B., Maia, I., Castro, V., Carvalho. (2007) Reação de Transesterificação para Aulas Práticas de Química Orgânica. *Química Nova*, 30, 1369-1373.

Hossain, M. A. (2011). Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild?. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6, 455-466.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K. (2002). Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated α -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 50, 1815-1821.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The Chemistry Behind Antioxidant capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1846.

Jabeen, F., Chaudhry, A. S., (2011). Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Food Chemistry*, 125, 991–996.

Kubitza, F. (2000). Tilápia: tecnologia e planejamento na produção comercial. Ed. Acqua & Imagem Jundiaí, 289.

Lima, M. B. S., Padua, D. M. C., Silva, P. C., Souza, V. L., & França, A. F. S. (2000). Farelo de milho (*Pennisetum americanum*) em substituição ao milho moído (*Zea mays*) em dietas para tilápia *Oreochromis niloticus*. *Internacional Symposium on Tilapia Aquaculture*, 1, 120-124.

Luzia, L.A., Sampaio, G. R., Castellucci, C. M. N., Torres, E. A. F. S. (2003). The influence of season on the lipid profiles of five commercially important species of Brazilian fish. *Food Chemistry*, 83, 93-97.

Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M. R., Visentainer J. E. L., Matsushita, M., Visentainer, J. V. (2006). Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, 19, 761-770.

Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., Mazza, S. (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31, 12–26.

Meer, M. B., Machiels, M. A. M., Verdegem, M. C. J. (1995). The effect of dietary protein level on growth, protein utilization and body composition of *Colossoma macropomum* (Cuvier). *Aquaculture Research*, 26, 901-909.

Milinsk, M. C., Matsushita, M., Visentainer, J. V., Oliveira, C. C., Souza N. E. (2008). Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME). *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 19, 1475-1483.

Munoz, S. E., Piegari, M., Guzmán, C., & Eynard, A. R. (1999). Differential effects of dietary oils, zizipus mistol and corn oil and essential fatty acid deficiency on the progression of a murine mammary gland carcinoma. *Nutrition*, 15, 208-212.

Nogueira, A. (2007). *Criação de tilápias em tanque-rede*. Salvador: SEBRAE

Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Prior R. L. (2001). Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.

Passi, S., Cataudella, S., Di Marco, P., De Simone, F., Rastrelli, L. (2002). Fatty Acid Composition and Antioxidant Levels in Muscle Tissue of Different Mediterranean Marine Species of Fish and Shellfish. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 7314-7322.

Perini, J. A. L., Stevanato, F. B., Sargi, S. C., Visentainer, J. E. L., Dalalio, M. M. O., Matshushita, M., Souza, N. E., Visentainer, J.V. (2010). Ácidos graxos poli-insaturados n-3 e n-6: metabolismo em mamíferos e resposta imune. *Revista de nutrição*, 23, 1075-1086.

Prior, R. L., Wu. X., Schaich, K. (2005). Standardized Methods for the determination of the antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53, 4290-4302.

Ramalho, V. C., Jorge, N. (2006). Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química nova*, 29, 755-760.

Ribeiro, A. B., Bonafé, E. G., Silva, B. C., Montanher, P. F., Santos O. O., Boeing J. S., Visentainer, J.V. (2013). Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content, Fatty Acids and Correlation by Principal Component Analysis of Exotic and Native Fruits from Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, 797-804.

Sargent, J. McEvoy, L., Estevez, A., Bell, G. (1999). Lipid nutrition of marine fish during early development: current status and future directions. *Aquaculture*, 179 217-229.

Simopoulos, A. P., (2002). The importance of the ratio of Omega-6/ Omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56, 365-379.

Solomons, G., Fryhle, C., (2002). Química Orgânica (7a Ed)– Vol. 2. Rio de Janeiro: Editora LTC, 366-391.

Stevanato, F. B., Almeida, V. V., Matsushita, M., Oliveira, C. C., Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2008). Fatty acids and nutrients in the flour made from tilapia (*Oreochromis niloticus*) heads. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 28, 440-443.

Tango, J. S., Carvalho, C. R. L., Soares, N. B. (2004). Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 6,17-23.

Ting, I. P., Brown, J. H., Naqvi, H. H., Kumamoto, J., & Matsumura, M. (1990). Chia: A potential oil crop for arid zones. In *Proceedings 1st International Conference of new industrial crops and products*, 197–202.

Tocher, D.R., Ghioni, C. (1999). Fatty acid metabolism in marine fish: low activity $\Delta 5$ desaturation in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cells. *Lipids*, 34, 433-440.

Tonial, I. B., Stevanato, F. B., Matsushita, M., Souza, N. E., Furuya, W. M., Visentainer, J. V. (2009). Optimization of flaxseed oil feeding time length in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a function of muscle omega-3 fatty acids composition. *Aquaculture Nutrition*, 15, 564-568.

Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B. D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural Food & Chemistry*, 46, 4113–4117.

Vieites, R. L., Daiuto, E. R., Fumes, J. G. F. (2012). Capacidade antioxidante e qualidade Pós-colheita de abacate 'Fuerte'. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34, 336-348.

Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, F. J., Olivas, G.I., González-Aguilar, G.A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. *Food Research International*, 44, 1231–1237.

Visentainer, J. V., Gomes, S. T. M., Hayashi, C. Santos-Junior, O. O., Silva, A. B. M., Justi, K. C., Souza, N. E., Matsushita, M. (2003). Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácidos graxos em cabeças de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 23, 478-484.

Wang, W., Bostic, T. R., Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivar. *Food Chemistry*, 122, 1193-1198.

Weaver, K. L., Vester, P., Chilton, J. A., Wilson, M. D., Pandey, P., Chilton, F. H. (2008). The Content of Favorable and Unfavorable polyunsaturated Fatty Acids Found in Commonly Eaten Fish. *Journal of the American Dietetic Association*, 108, 1178-1185.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S. E., Prior, R., (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal Agriculture and Food Chemistr*, 52, 4026-4037.

Zulueta, A., Maurizi, A.; Frigola, A., Esteve, J. M., Coli, R., Burini, G. (2009). Antioxidant capacity of cow milk, whey and deproteinized milk. *International Dairy Journal*, 19, 380-385.

Capítulo II

Quantificação de ácidos graxos e capacidade antioxidante em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) suplementadas com óleo de Chia (*Salvia hispanica L.*) e extrato de antioxidante natural

Resumo: Neste estudo foi avaliado o efeito da incorporação de óleo de chia e extrato de casca de abacate na dieta de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) em 0, 15, 30 e 45 dias de tratamento. Foi observado um aumento no total de ácidos graxos ômega-3 (n-3) no tecido muscular das tilápias (29,01 a 78,81 mg g⁻¹). Entre os ácidos graxos n-3 o ácido graxo alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3) apresentou um aumento de 6 vezes após 45 dias de alimentação. Ocorreu um aumento na capacidade antioxidante no tecido muscular das tilápias na fração lipofílica, (L-ORAC_(FL)) de 3,40 a 19,50 μmol de TE g⁻¹ no tratamento com óleo de chia. Nas frações hidrofílicas (H-ORAC_(FL)) não houve diferença entre os tratamentos e períodos, indicando que o excesso de compostos antioxidantes de natureza hidrofílica/polar são eliminados pelo organismo do animal. Assim o óleo de chia contribuiu para um aumento da qualidade nutricional tanto em termos de ácidos graxos quanto de capacidade antioxidante.

Palavras-chave: ômega-3,ORAC, Tilápia, abacate

Abstract: In this work, the effect of chia oil and avocado extract to the diet of Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) was evaluated in 0, 15, 30 and 45 treatment days. There was an increase in total omega-3 (n-3) fatty acid content of fish muscular tissue (29.01 to 78.81 mg g⁻¹ TL). Among n-3 fatty acids, the amount of alpha-linolenic acid (LNA, 18:3n-3) increased in six times after 45 feeding days. The greatest increases of antioxidant capacity were observed in lipophilic fraction (L-ORAC_(FL)) from 3.40 to 19.50 μmol of ET g⁻¹) from fish treated with chia oil, while differences between treatments and periods were not detected in hydrophilic fractions (H-ORAC_(FL)), indicating that excessive amounts of antioxidant compounds are excreted by the animal organism. Thus chia oil contributed for a nutritional quality enhancement of Nile tilapia, both in terms of fatty acid content and total antioxidant capacity.

Keywords: omega-3, ORAC, tilapia, avocado

1. Introdução

As tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) se destacam como uma das espécies mais usada na aquicultura em nível mundial, devido à sua alta taxa de crescimento, adaptabilidade em diversas condições de criação e boa aceitação pelo consumidor.

Contudo a criação desses peixes em cativeiro gerou uma interferência na sua dieta natural. A dieta oferecida aos peixes criados em cativeiro pode trazer riscos à saúde humana, pela composição em ácidos graxos adquirido pelos animais, principalmente pelo elevado teor de ácidos graxos ômega-6 presentes na ração. (Weaver *et al.*, 2008; Hossain, 2011).

Isso é agravado pelo fato de peixes de água doce como as tilápias, possuírem naturalmente baixas quantidades dos ácidos graxos ômega-3 como o alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) e o docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), em relação a peixes marinhos (Tonial *et al.*, 2009). Estes ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3) atuam na prevenção de varias doenças (Weaver *et al.*, 2008; Mazza *et al.*, 2007; Passi *et al.*, 2002).

Estudos estão sendo realizados com o intuito de aumentar os teores de AGPI n-3 no tecido muscular de tilápias cultivadas, a partir da dieta fornecida ao pescado, usando como fonte de lipídios sementes ou óleos ricos em ômega-3, tais como a linhaça (Carbonera *et al.*, 2014; Wing-Keong *et al.*, 2013; Tonial *et al.*, 2009; Visentainer *et al.*, 2005; Justi *et al.*, 2003,).

Nesse sentido a semente de Chia (*Salvia hispanica*), pode ser uma excelente fonte lipídica em dietas fornecidas aos pescados por apresentar na sua composição cerca de 60% de LNA, além de fitoesteróis, vitaminas do complexo B (riboflavina, niacina e tiamina), minerais (cálcio, fósforo, potássio, zinco e cobre), fibras dietéticas além de compostos que apresentam capacidade antioxidante (Ayerza, 1998; Ixtaina *et al.*, 2011).

A maioria das pesquisas realizadas sobre a determinação de compostos antioxidantes está ligada principalmente às frutas. Restritas pesquisas existem sobre a determinação e incorporação de antioxidante em tecido animal (Wu *et al.*, 2008).

Carbonera *et al.*, 2014 utilizou sub-produto da acerola para elevar a capacidade antioxidante em tecido muscular de tilápias do Nilo, alcançando bons resultados.

A vantagem de se usar um sub-produto está relacionada ao baixo custo. Nessa linha de pensamento a casca de abacate pode ser uma excelente opção de reaproveitamento por apresentar capacidade antioxidante relativamente elevada, e representar uma parcela considerável do fruto (em torno de 20%) (Wang *et al.*, 2010; Villa-Rodríguez *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2004).

Neste sentido, o presente trabalho investigou a incorporação de ácidos graxos ômega-3 e a capacidade antioxidante no tecido muscular de tilápias do Nilo alimentados com ração enriquecida com óleo de chia e antioxidante natural obtido da casca do abacate.

2. Materiais e métodos

2.1. Tratamentos e amostragem

O experimento foi conduzido no laboratório de pesquisa no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá durante 45 dias, no período de 9 de abril a 24 de maio. Os tratamentos foram feitos em triplicata (três tanques por tratamento), totalizando 12 tanques, com capacidade de 1000 L cada. Em cada tanque, foram distribuídos 20 tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com peso individual de 15 ± 1 g, sendo que no total foram utilizados 240 indivíduos.

Os tratamentos foram realizados seguindo uma formulação isocalórica e isoprotéica (Tabela 1).

Tabela 1. Composição das rações utilizadas nos diferentes tratamentos

Ingredientes (%)	Tratamentos			
	Controle	TI	TII	TIII
Farelo de milho	37,39	37,39	37,39	37,39
Farelo de soja	32,08	32,08	32,08	32,08
Farelo de vísceras de peixes	14,00	14,00	14,00	14,00
Farelo de trigo	8,00	8,00	8,00	8,00
Arroz quirera	5,00	5,00	5,00	5,00
EECA	-	0,14	-	0,14
Óleo de soja	1,90	1,90	-	-
Óleo de Chia	-	-	1,90	1,90
Fosfato bicálcico	0,22	0,22	0,22	0,22
Sal comum (NaCl)	0,50	0,50	0,50	0,50
Premix	0,50	0,50	0,50	0,50
L-lisina HCl	0,06	0,06	0,06	0,06
DL-metionina	0,06	0,06	0,06	0,06
L-treonina	0,07	0,07	0,07	0,07
Ácido propiônico	0,10	0,10	0,10	0,10
L-triptofano	0,02	0,02	0,02	0,02
BHT	0,02	0,02	0,02	0,02
Composição proximal*				
umidade (%)	9,63 ^a ± 0,04	7,94 ^b ± 0,08	8,61 ^a ± 0,12	7,57 ^b ± 0,04
cinzas (%)	5,40 ^a ± 0,03	5,68 ^a ± 0,03	5,59 ^a ± 0,04	5,70 ^a ± 0,05
Proteína bruta (%)	33,33 ^a ± 0,48	33,71 ^a ± 0,66	32,32 ^a ± 0,58	33,37 ^a ± 0,64
Lipídios totais (%)	6,38 ^a ± 0,06	6,73 ^a ± 0,14	6,08 ^a ± 0,16	7,32 ^a ± 0,11

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey; EECA= Extrato etanólico da casca de abacate; Premix = Complexo vitamínico; BHT: butil-hidroxitolueno; Controle = Óleo de soja; TI = 0,14% EECA; TII = 1,90% de óleo de chia, TIII = 0,14% de EECA e 1,90% de óleo de chia.

Tratamento I (TI) – ração básica acrescida de 0,14% de extrato etanólico da casca de abacate (EECA);

Tratamento II (TII) – ração básica acrescida de 1,90% de óleo de chia;

Tratamento III (TIII) – ração básica acrescida de 0,14% de EECA e 1,90% de óleo de chia;

Ração controle – ração básica acrescida de 1,90% de óleo de soja.

Foi realizado um período de adaptação de 10 dias utilizando a ração controle. Após este período, foram coletados 20 indivíduos aleatoriamente para as análises do tempo zero. Após este procedimento foram fornecidas as rações suplementadas e a cada 15 dias, foram coletadas 5 tilápias por tanque. As tilápias foram abatidas filetadas e acondicionadas a -18 °C até o início das análises.

2.2. Preparo do extrato etanólico da casca de abacate

Os abacates foram coletados na região de Maringá no mês de março de 2012. Os frutos foram lavados e secos em papel toalha. A casca foi separada da polpa e semente, embaladas a vácuo em sacos plásticos e congeladas para preparação dos extratos.

As cascas foram moída e em seguida, adicionou-se o etanol na proporção de 1:10 (m/v) para preparação do extrato. A mistura foi agitada durante quatro horas em agitador magnético com proteção da luz, o extrato foi então filtrado e seco com pressão reduzida em rota evaporador (Boroski *et al.*, 2011).

2.3. Composição Proximal

As análises dos teores de umidade, cinzas e proteína bruta foram realizadas conforme técnicas da AOAC (1998). Os lipídios totais foram extraídos segundo método Bligh & Dyer (1959).

2.4. Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A metilação dos ácidos graxos foi realizada segundo o método de Joseph & Ackman (1992) utilizando como reagente o trifluoreto de boro (BF₃) em metanol. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás da marca Thermo, modelo trace ultra 3300, equipado com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP - 7420 (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de cianopropil/polisiloxano). O fluxo de H₂ (gás de arraste) foi de 1,2 mL/min, com 30 mL/min de N₂ (*make up*); e 35 e 300 mL/min, para o H₂ e ar sintético, respectivamente, para a chama do detector. O volume injetado foi de 2,0 µL, utilizando *split* 1:80, sendo as temperaturas do injetor 200 °C e do detector 240 °C. A rampa foi programada com a temperatura inicial da coluna a 165 °C durante 7,0 min, elevada a 185 °C a uma taxa de 4,0 °C/min, mantida por 4,67 min, foi elevada novamente a 235 °C em uma taxa de 6,0 °C/min e mantida por 5,0 min, totalizando 30,0 min de corrida cromatográfica. Os tempos de retenção dos analitos e as porcentagens de área dos picos correspondentes foram obtidos usando integração pelo Software Chromquest versão 5.0. Os ácidos graxos foram identificados a partir da comparação de seus tempos de retenção com padrões SIGMA (USA) de composição conhecida.

A quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada usando padronização interna com o metil éster do ácido tricosanóico (23:0), da marca SIGMA (USA), e os cálculos realizados segundo método de Joseph & Ackman (1992). Os valores do fator de correção teórico para o FID (detector de ionização em chama) foram usados para a determinação dos valores de concentrações (Visentainer, 2012). O teor dos ácidos graxos nas amostras foram calculados em mg g⁻¹ de lipídios totais utilizando a Equação 1.

$$AG = \frac{A_X M_P F_{CT}}{A_P M_X F_{CAE}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: AG é a concentração, em mg, de ácidos graxos por g de lipídios totais, A_X é a área do pico (ácidos graxos), A_P é a área do pico do padrão interno (PI) metil

éster do ácido tricosanóico (23:0), M_P é a massa do PI (mg) adicionada à amostra, M_X é a massa da amostra (mg), F_{CT} é o fator de correção teórico e F_{CAE} é o fator de conversão necessário para expressar os resultados em mg de ácidos graxos.

2.5. Análise da capacidade antioxidante por L-ORAC_{FL} e H-ORAC_{FL}

O procedimento de preparação dos extratos lipofílicos e hidrofílicos para análise de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) foi baseado na metodologia de Wu *et al.*, 2008. Os filés de Tilápia foram moídos, liofilizados e peneirados (80 mesh). Para as amostras de rações o processo de liofilização não foi necessário.

Pesou-se $0,5 \pm 0,05$ g de amostra e, primeiramente, foi extraída a parte lipofílica com 10,0 mL de hexano. A mistura foi sonicada por 5 min a 37°C e durante este período agitou-se duas vezes por 30 s cada. Após este tempo as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min sendo que após 5 min agitou-se mais 30 s. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 4000 rpm em uma centrífuga refrigerada da marca Sanyo modelo Harrier 18/80. Após este período o sobrenadante foi transferido para um balão de fundo chato, sendo o precipitado submetido ao mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados e concentrados em rotaevaporador rotativo, diluídos com 1,5 mL de acetona e 4,5 mL de RMCD 7% (randomina metil β ciclodextrina).

A extração hidrofílica foi realizada com o resíduo restante da extração lipofílica. Foram adicionados 10,0 mL de uma mistura acetona:água:ácido acético (70; 29,5; 0,5 v/v/v) aos tubos, que foram então sonicados a 37°C por 5 min, sendo que durante este período foram agitados 2 vezes por 30 s cada. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 10 min sendo que durante este período foram agitadas 2 vezes por 30 s cada. Após este período foram centrifugadas por 15 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi coletado em um balão volumétrico de 25,00 mL e a operação foi repetida. Os sobrenadantes foram combinados e o volume do balão completado com solução extratora.

A capacidade antioxidante foi determinada, de acordo com Huang *et al.*, 2002, em espectrofluorímetro da Perkin Elmer, modelo VictorTMX4, utilizando microplacas.

Foram adicionados às microplacas 20,0 µL dos extratos preparados anteriormente e diluídos apropriadamente com a mesma solução extratora. Para o branco e a curva de calibração foram utilizados 20,0 µL da solução extratora ou das soluções de Trolox®. Adicionou-se 200,0 µL de fluoresceína com concentração de 4,0 nmol L⁻¹, preparada a partir de uma solução estoque (1,0 mmol L⁻¹) em tampão fosfato pH 7,0.

A microplaca foi inserida no espectrofluorímetro, aguardando-se 5 min, para que as soluções presente na microplaca chegassem a temperatura de análise de 37°C. Em seguida, foram adicionados 75,0 µL de AAPH (2,2-azobis(2-aminopropane) dihydrochloridre) com concentração de 17,2 mg mL⁻¹ para a análise de L-ORAC e de 8,6 mg mL⁻¹ para H-ORAC. Iniciou-se imediatamente a leitura totalizando 30 ciclos com intervalos de 1 min. O comprimento de onda da emissão e excitação foram 515 e 485 nm, respectivamente.

Os resultados foram expressos em µmol equivalente Trolox® (TE) por grama de amostra seca. Sendo calculado pela equação da reta obtida pelas curvas de calibração:

$$y = 0,1957x + 1,8651 \quad (r^2 = 0,9856) \text{ L-ORAC}$$

$$y = 0,3412x + 1,7224 \quad (r^2 = 0,9916) \text{ H-ORAC}$$

Em que: x é o valor de ORAC expresso em µmol g⁻¹ TE e y é a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência (AUC) da amostra ou padrão menos a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência do branco sendo que AUC pode ser calculado conforme equação 2:

$$\text{AUC} = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{n+1}/f_0) \quad (2)$$

Em que f₀ é a intensidade de fluorescência inicial e f_n é a intensidade de fluorescência no tempo n.

2.6. Análise Estatística

2.6.1. Rações e capacidade antioxidante dos filés de tilápia

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos das análises foram comparados usando análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5 %, pelo programa Statistica 7.0 e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

2.6.2. Ácidos graxos dos filés de tilápia

A fim de avaliar a contribuição individual das variáveis: LNA, LA, EPA, DHA AA, somatório de ácidos graxos saturados (SFA), somatório de ácidos graxos mono-insaturados (MUFA), somatório de poli-insaturado (PUFA), somatório de ômega-3 (total n-3), somatório de ômega-6 (total n-6) e razão (n-6/n-3), na composição em ácidos graxos nos filés de tilápia dos três diferentes tratamentos (TI, TII, TIII) nos períodos de 0, 15, 30 e 45 dias, assim como verificar a quantidade em mg g^{-1} dos fatores citados acima, foi realizada a análise multivariada de ordenação por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS-*nonmetric multidimensional scaling*).

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa Primer versão 6.1.6. (*Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research, Plymouth, U.K.*).

3. Resultados e discussão

3.1. Ganho de massa das tilápias

Durante o período do experimento os peixes indicaram boa aceitabilidade das rações de todos os tratamentos. A Figura 1 representa o ganho de massa dos peixes submetidos a cada tratamento durante o período de 45 dias.

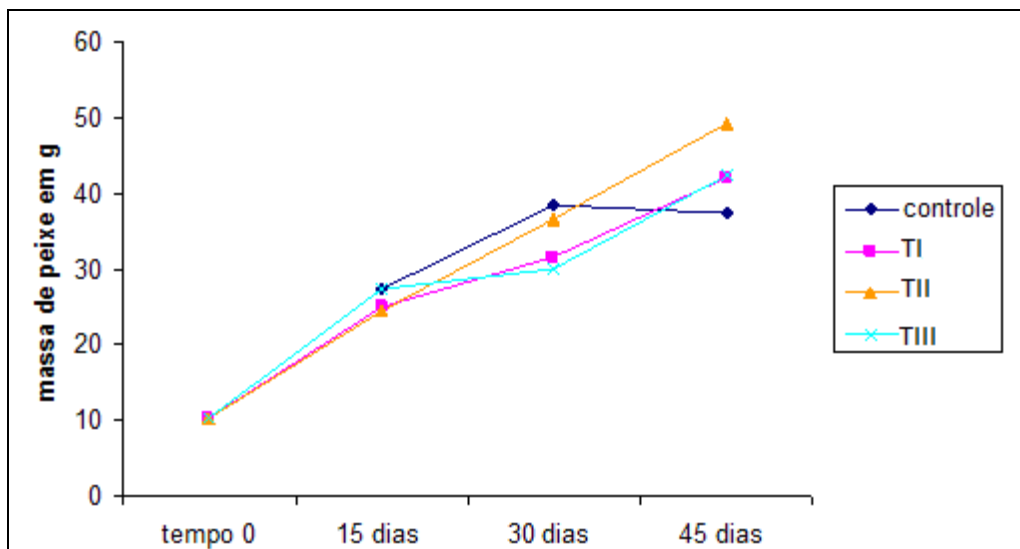


Figura 1. Média do ganho de massa dos peixes submetidos a diferentes tratamentos com rações suplementadas: T1 = extrato etanólico da casca do abacate, T2= óleo de chia, T3= óleo de chia mais extrato etanólico da casca de abacate, no período de 45 dias.

Os filés de tilápias referentes ao tratamento II apresentaram o maior ganho de massa, enquanto que nos tratamentos I e III foi observada uma tendência similar entre si, e nos casos em que foi administrada ração controle para os peixes ocorreu um ganho de massa menor do que o observado para os demais experimentos. O valor de massa, para o tratamento controle, ficou praticamente constante no período de 30 e 45 dias.

3.2. Quantificação de ácidos graxos

3.2.1. Rações

Os resultados da quantificação dos ácidos graxos das rações formuladas para os diferentes tratamentos estão expressos na Tabela 2.

A concentração de LNA aumentou de 204,80 mg g⁻¹ de LT na ração a base de óleo de soja para 1141,72 mg g⁻¹ de LT nas rações com óleo de chia, (tratamento II), enquanto que a concentração de LA diminuiu de 2407,63 mg g⁻¹ de LT para 1937,33 mg g⁻¹ de LT. Assim, estas alterações proporcionaram uma redução nos valores de razão n-6/n-3 de 12,27 (controle) para 1,70 (tratamento II).

Tabela 2. Quantificação de ácidos graxos em mg 100g⁻¹ de ração dos diferentes tratamentos.

	Tratamento			
	Controle	TI	TII	TIII
14:0	16,90 ^a ± 1,05	16,91 ^a ± 0,11	16,26 ^a ± 0,88	16,03 ^a ± 0,34
15:0	3,78 ^a ± 0,18	3,64 ^a ± 0,15	3,68 ^a ± 0,24	3,69 ^a ± 0,01
16:0	957,43 ^a ± 36,25	968,15 ^a ± 18,92	924,55 ^a ± 30,07	926,20 ^a ± 19,44
16:1n-9	7,84 ^a ± 0,46	6,66 ^b ± 0,43	8,16 ^a ± 0,57	6,91 ^b ± 0,07
16:1n-7	51,87 ^a ± 1,73	52,29 ^a ± 0,93	52,67 ^a ± 1,73	53,09 ^a ± 1,24
17:0	11,34 ^a ± 0,83	9,49 ^b ± 0,33	8,83 ^b ± 0,04	9,64 ^b ± 0,22
17:1n-11	5,31 ^a ± 0,43	4,32 ^b ± 0,08	5,22 ^a ± 0,23	3,99 ^b ± 0,45
17:1n-9	4,44 ^a ± 0,08	4,75 ^a ± 0,68	5,73 ^b ± 0,11	4,72 ^a ± 0,03
18:0	229,12 ^a ± 7,63	229,61 ^a ± 5,19	232,26 ^a ± 7,52	231,36 ^a ± 3,67
18:1n-9	1647,46 ^a ± 59,47	1668,50 ^a ± 26,25	1397,57 ^b ± 42,89	1415,28 ^b ± 27,23
18:1n-7	76,14 ^a ± 4,33	76,71 ^a ± 1,08	66,47 ^b ± 2,16	67,62 ^b ± 1,56
18:2n-6	2407,63 ^a ± 89,77	2405,89 ^a ± 39,09	1937,33 ^b ± 64,55	1962,94 ^b ± 39,93
18:3n-6	4,17 ^a ± 0,32	4,08 ^a ± 0,12	5,13 ^b ± 0,08	5,12 ^b ± 0,04
18:3n-3	204,80 ^a ± 11,76	203,18 ^a ± 2,79	1141,72 ^b ± 40,81	1165,79 ^b ± 24,99
20:0	22,23 ^{ab} ± 0,97	23,55 ^a ± 1,10	21,47 ^{ab} ± 1,41	21,23 ^b ± 0,11
20:1n-9	1,64 ^a ± 0,04	1,72 ^a ± 0,05	1,60 ^a ± 0,11	11,97 ^b ± 0,37
20:1n-7	12,67 ^a ± 0,73	12,04 ^a ± 0,91	12,06 ^a ± 0,72	6,78 ^b ± 0,79
22:0	30,33 ^a ± 1,61	28,41 ^a ± 0,63	29,42 ^a ± 0,96	29,59 ^a ± 0,81
24:0	12,27 ^a ± 0,41	11,29 ^b ± 0,51	10,38 ^c ± 0,15	9,82 ^c ± 0,12
AGS	1283,40 ^a ± 37,12	1291,05 ^a ± 19,67	1246,85 ^a ± 31,06	1247,55 ^a ± 19,81
AGMI	1807,36 ^a ± 59,66	1826,98 ^a ± 26,32	1549,48 ^b ± 42,99	1570,36 ^b ± 27,31
AGPI	2616,60 ^a ± 102,44	2613,15 ^a ± 39,19	3084,18 ^b ± 76,37	3133,85 ^b ± 47,11
∑n-3	204,80 ^a ± 11,76	203,18 ^a ± 2,79	1141,72 ^b ± 40,81	1165,79 ^b ± 24,99
∑n-6	2411,80 ^a ± 101,77	2409,97 ^a ± 39,09	1942,46 ^b ± 64,55	1968,05 ^b ± 39,93
n-6/n-3	12,27 ^a ± 0,07	11,86 ^a ± 0,02	1,70 ^b ± 0,05	1,72 ^b ± 0,03

Controle= óleo de soja, TI= extrato etanólico da casca do abacate, TII= óleo de chia, TIII= óleo de chia e extrato etanólico da casca do abacate. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey. AGS=somatório de AG saturados; AGMI=somatório de AG mono-insaturados; AGPI=somatório de AG poli-insaturados; n-6= somatório de AG n-6; n-3=somatório de AG n-3.

A concentração de LNA aumentou de 204,80 mg g⁻¹ de LT na ração a base de óleo de soja para 1141,72 mg g⁻¹ de LT nas rações com óleo de chia, (tratamento II), enquanto que a concentração de LA diminuiu de 2407,63 mg g⁻¹ de LT para 1937,33

mg g⁻¹ de LT. Estas alterações proporcionaram uma redução nos valores de razão n-6/n-3 de 12,27 (controle) para 1,70 (tratamento II).

O complemento da ração com extrato natural de antioxidante não afetou a composição em ácidos graxos independente da fonte lipídica (TI e TIII). Isso ocorre devido ao reduzido teor de LT da casca de abacate.

Os ácidos graxos majoritários saturados, monoinsaturados e poli-insaturados foram: ácido palmítico (16:0), o ácido oléico (18:1n-9) e o linoleico (18:2n-6) respectivamente, em todos os tratamentos e no controle. Valores similares foram observados por outros autores que utilizaram óleos vegetais como fonte oleaginosa (Justi *et al.*, 2003, Tonial *et al.*, 2009, Karapanagiotidis *et al.*, 2007).

3.2.2. Filés de tilápia

Avaliando os gráficos gerados pelas análises multivariada de ordenação por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS), (Figura 2 e 3) pode-se observar que nas variáveis estudadas houve diferença, tanto com a ração oferecida, quanto com o tempo de tratamento.

Observa-se nos gráficos gerados que o TII e TIII foram similares tanto nos período de 15 dias de tratamento quanto nos de 30 e 45 dias, a diferença observada ocorreu que em 30 e 45 dias formou-se um grupo similar, distinto do período de 15 dias.

Para o TI formou-se outro grupo similar no período de 30 e 45 dias, enquanto que em 15 dias esse tratamento ficou similar ao tempo 0, diferente dos tratamentos em que foi adicionado o óleo de chia (TII e TIII) que apresenta uma diferenciação do T0 já nos primeiros 15 dias de tratamento.

Analisando cada variável nota-se pela Figura 2 (A) que a concentração de LNA aumentou nos filés de tilápia, com a suplementação do óleo de chia nas rações, passando de 9,65 mg g⁻¹ de LT no tempo 0 para 59,21 e 53,25 mg g⁻¹ LT em 45 dias no tratamento II e III, respectivamente, sendo um aumento de aproximadamente 6 vezes.

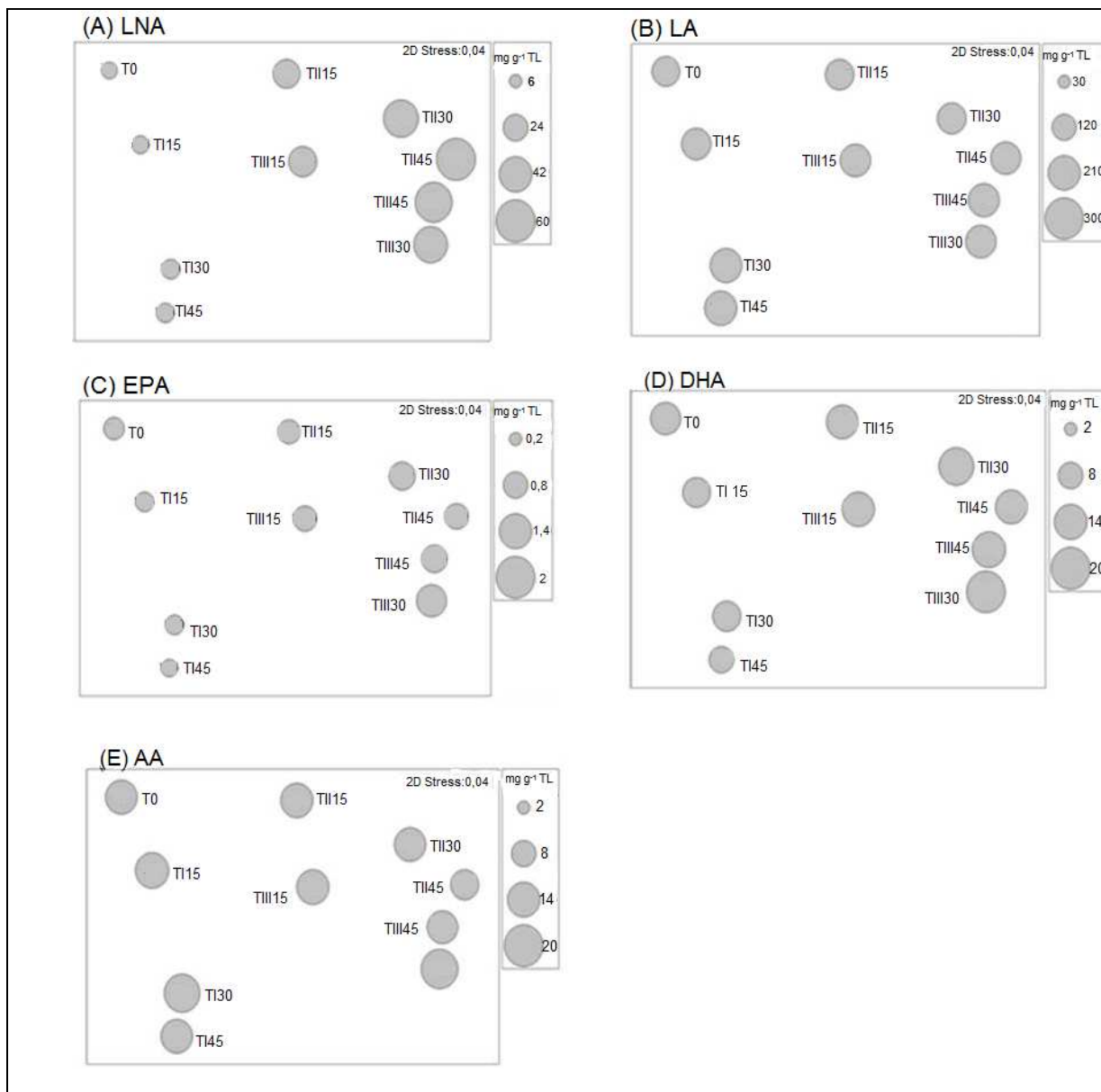


Figura 2. Análise multivariada de ordenação por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da composição de ácidos para as variáveis: LNA (A), LA (B), EPA (C), DHA (D) e AA (E) dos filés de tilápia dos tratamentos: TI (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate, TII (1,90% de óleo de chia) e TIII (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate e 1,90% de óleo de chia) . Quanto maior o círculo cinzento, maior a quantidade em mg g⁻¹ de LT do ácido graxo correspondente.

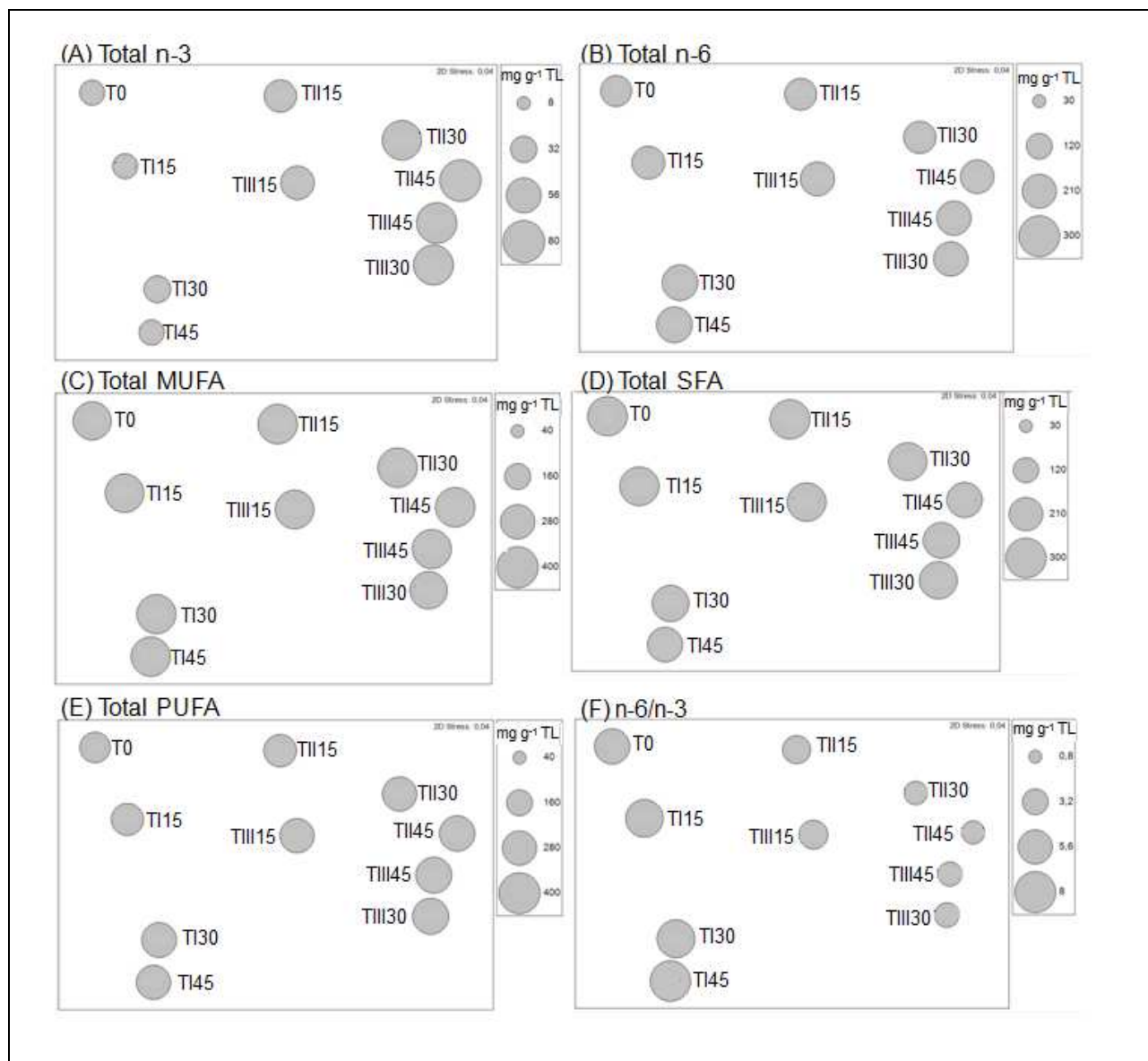


Figura 3. Análise multivariada de ordenação por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) da composição de ácidos para as variáveis: Total n-3 (A), Total n-6 (B), Total MUFA (C), Total SFA (D), Total PUFA (E) e razão n-6/n-3 (F) dos filés de tilápia dos tratamentos: T0 (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate, TII (1,90% de óleo de chia) e TIII (0,14% de extrato etanólico da casca de abacate e 1,90% de óleo de chia) . Quanto maior o círculo cinzento, maior a quantidade em mg g^{-1} de LT do ácido graxo correspondente.

Esse aumento foi mais expressivo até o período de 30 dias, sendo que a quantidade encontrada nesse período praticamente dobrou em relação ao período de 15 dias. Em T1, a concentração de LNA teve um pequeno aumento após 30 dias de tratamento, pois o óleo de soja, utilizado na formulação da ração desse tratamento, contém em média 40 mg g^{-1} de LNA (Milinsk *et al.*, 2008). Apesar do

óleo de soja conter LNA, a quantidade de LA é aproximadamente de 12 vezes maior (491 mg g⁻¹ LT).

É importante destacar que o óleo de soja é uma das fontes lipídicas mais utilizada na fabricação de rações para peixes de cativeiro (Hossain, 2011).

O LA apresentou concentrações próximas, (Figura 2 (B)) em todos os tratamentos e períodos, isso porque a concentração desse ácido graxo nos óleos de soja e chia, presente nas rações formulados dos diferentes tratamentos, estão na mesma ordem de grandeza.

A concentração de EPA (Figura 2 (C)) e DHA (Figura 2 (D)) também foi maior em TII e TIII. Isso era esperado, pois houve um aumento do LNA, nesses tratamentos, precursor dos ácidos graxos EPA e DHA.

Apesar do aumento na concentração de EPA durante o período de confinamento os valores encontrados são baixos, isso porque o EPA é um substrato da β -oxidação, e precursor dos eicosanoides (Al-Souti *et al.*, 2012).

O ácido graxo AA (Figura 2 (E)) apresentou o mesmo comportamento em todos os tratamentos, sendo que a concentração se elevou até 30 dias e depois diminuiu no período de 45 dias.

Os resultados de n-3 e n-6 totais (Figura 3 (A) e (B)) foram muito semelhantes aos encontrados para o LNA e para o LA, pois estes são respectivamente os maiores contribuintes para estes somatórios.

A razão n-6/n-3 (Figura 3 (F)) teve um decréscimo de 5,97 no tempo 0 a 2,58 e 2,83 nos tratamentos TII e TIII no período de 45 dias. Isso em termos nutricionais, é importante pois uma razão n-6/n-3, ótima para a saúde humana está entre 1 e 2 (Simopoulos, 2011).

Os somatórios de MUFA, SFA e PUFA (Figura 3 (C), (D) e (E)) apresentaram valores bem próximos em todos os tratamentos e períodos. Nesses somatórios os principais contribuintes foram os ácidos graxos, oléico (18:1n-9), palmítico (16:0) e linoleico(18:2n-6) respectivamente.

Os majoritários para os SFA e MUFA foram os mesmos encontrados por Moreira *et al.*, (2001) em três espécies de peixes de água doce do Brasil e por Justi *et al.*, (2003) em tilápias do Nilo.

Em anexo as Tabelas 3, 4 e 5 apresentam todos os ácidos graxos encontrados em cada tratamento nos diferentes tempos de abate.

3.3. Índice de Qualidade Nutricional

A qualidade lipídica de um alimento pode ser estimada levando em consideração três índices: aterogenicidade, trombogenicidade e razão entre os ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (Ramos Filho *et al.*, 2010).

Assim como os ácidos graxos poli-insaturados e ácidos graxos mono-insaturados, protegem contra algumas doenças, os ácidos graxos saturados 12:0, 14:0 e 16:0 podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de aterosclerose, a qual se caracteriza pelo entupimento dos vasos sanguíneos, neste sentido utiliza-se o índice de aterogenicidade (IA) para estimar a qualidade da fração lipídica.

Ácidos graxos saturados de cadeia menor que 12 ou maior que 16 não elevam o nível de colesterol do sangue e desta forma não são utilizados no cálculo de IA. Os ácidos graxos saturados 14:0, 16:0 e 18:0 podem ser responsáveis por infartos e derrames, sendo o índice de trombogenicidade (IT) utilizado para comparar diferentes alimentos e dietas.

Desta forma, baixos valores de IA e IT, assim como, elevados valores da razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH) são preferíveis para uma dieta de melhor qualidade lipídica (Ulbricht & Southgate, 1991).

A qualidade da fração lipídica para os filés de tilápia submetidos aos diferentes tratamentos no período de 45 dias (Tabela 6) mostrou que os menores índices de IA e IT foram referentes ao Tratamento II, onde houve a adição do óleo de Chia. Contudo, no tratamento I houve um queda nos índices IA e IT, e aumento no HH, comparado ao tempo 0, indicando que a adição de antioxidante na ração fornecida aos peixes também melhorou os índices de aterogenicidade e trombogenicidade além de aumentar o valor de HH.

Valores superiores de IA e IT e inferiores de HH foram encontrados em peixes do pantanal brasileiro como, Jaú (IA= 0,62, IT= 1,00, HH= 1,30), Jurupoca (IA=0,56,

IT=0,89, HH=1,49) e Mandi-prateado (IA=0,51, IT=0,65, HH=0,65) (Ramos Filho *et al.*, 2010).

Tabela 6. Qualidade nutricional dos filés de tilápia determinada a partir dos índices de aterogenicidade, trombogenicidade, e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos.

Índices	Tratamentos			
	Tempo 0	TI	TII	TIII
IA	0,48	0,35	0,33	0,35
IT	0,80	0,57	0,42	0,46
HH	2,09	2,98	2,54	2,77

IA = Índice de Aterogenicidade = $(12:0 + 4 \times 14:0 + 16:0) / [\Sigma \text{MUFA} + \Sigma(n-6) + \Sigma(n-3)]$; IT = Índice de Trombogenicidade = $(14:0 + 16:0 + 18:0) / [0,5 \times \Sigma \text{MUFA} + 0,5 \times \Sigma(n-6) + 3 \times \Sigma(n-3) + \Sigma(n-3) / \Sigma(n-6)]$; HH = razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos = $[(\Sigma 18:1 \text{ cis-9} + 18:2 \text{ n-6} + 20:4 \text{ n-6} + 18:3 \text{ n-3}) / (\Sigma 14:0 + 16:0)]$ (Ramos Filho *et al.*, 2010), TI= extrato etanólico da casca do abacate, TII= Óleo de chia, TIII= óleo de chia mais extrato etanólico da casca do abacate.

3.4. Capacidade antioxidante das rações formuladas e dos filés de tilápia

Os resultados das análises de capacidade antioxidante das amostras de rações dos tratamentos I, II e III e dos filés de tilápia pelo ensaio de L-ORAC_{FL} e H-ORAC_{FL} estão expressos na Tabela 7.

Na ração controle o valor de capacidade antioxidante foi de $6,08 \pm 0,45$ para L-ORAC_(FL) e $12,98 \pm 0,31 \mu\text{mol of ET g}^{-1}$ para H-ORAC_(FL). Já para a ração do TI foi encontrado um maior valor para o ensaio de H-ORAC_(FL) em comparação com os valores de L-ORAC_(FL), indicando que os antioxidantes presentes no extrato etanólico da casca de abacate são em sua maioria hidrofílicos.

Tabela 7. Determinação da capacidade antioxidante pelo ensaio de ORAC Hidrofílico (H-ORAC_{FL}) e lipofílico (L-ORAC_{FL}) em $\mu\text{mol de ET g}^{-1}$ de amostras seca das rações e dos filés de tilápia.

	TI		TII		TIII	
	L-ORAC _{FL}	H-ORAC _{FL}	L-ORAC _{FL}	H-ORAC _{FL}	L-ORAC _{FL}	H-ORAC _{FL}
T0	3,40±0,10aA	3,24±0,08aA	3,40±0,13aA	3,24±0,06aA	3,40±0,12aA	3,24±0,09aA
15	8,36±0,28bA	3,95±0,02aB	6,07±0,21bA	2,48±0,08aB	5,19±0,16bA	2,43±0,13aB
30	11,77±0,2bA	1,28±0,04bB	15,77±0,31cC	1,81±0,06bA	12,79±1,01cA	1,58±0,07bB
45	0,39±0,02cA	1,41±0,01bB	19,50±0,25dC	1,74±0,11bB	17,08±0,87dC	2,40±0,15bB

Ração	3,74±0,38	18,21±0,87	21,09±1,25	23,11±1,36	22,58±1,34	13,55±0,72
-------	-----------	------------	------------	------------	------------	------------

Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey, entre os tempos de cada tratamento e diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre os tratamentos.

Na ração controle o valor de capacidade antioxidante foi de $6,08 \pm 0,45$ para $L\text{-ORAC}_{(FL)}$ e $12,98 \pm 0,31 \mu\text{mol of ET g}^{-1}$ para $H\text{-ORAC}_{(FL)}$. Já para a ração do TI foi encontrado um maior valor para o ensaio de $H\text{-ORAC}_{(FL)}$ em comparação com os valores de $L\text{-ORAC}_{(FL)}$, indicando que os antioxidantes presentes no extrato etanólico da casca de abacate são em sua maioria hidrofílicos.

Considerando ainda os valores obtidos para análise de $H\text{-ORAC}_{(FL)}$ observa-se que em TIII, onde houve a adição do extrato etanólico da casca de abacate e do óleo de chia, ocorreu uma diminuição na capacidade antioxidante indicando um efeito de antagonismo entre os antioxidantes presentes nos dois ingredientes, este efeito não foi observado para a análise de $L\text{-ORAC}_{(FL)}$, onde as rações do tratamentos II e III apresentaram os maiores valores.

Ixtaina *et al.*, (2011) publicaram um estudo sobre a caracterização do óleo de chia encontraram valores significativos de tocoferóis, além de compostos fenólicos como ácido clorogênico, ácido caféico, miricetina, quercetina e kaempferol, a maioria dos compostos fenólicos encontrados no óleo de semente de chia não estão presentes em outras oleaginosas (Tuberoso, *et al.*, 2007), isso explica os valores semelhantes encontrados tanto para $L\text{-ORAC}_{(FL)}$ quanto $H\text{-ORAC}_{(FL)}$ nas rações do tratamento II.

As maiores quantidades de compostos antioxidantes nos filés de tilápia foram observadas no tratamento II e III na análise de $L\text{-ORAC}_{(FL)}$, no período de 45 dias, o que corresponde com os resultados obtidos nas rações.

Os valores de $H\text{-ORAC}_{FL}$ foram muito semelhantes em todos os tratamentos, apesar das análises da ração do tratamento II indicar teores de compostos antioxidantes também elevados, isto acontece, pois os antioxidantes hidrofílicos não são acumulados e o excesso é excretado, ao contrário dos antioxidantes lipofílicos que tem maior facilidade em penetrar nas lipoproteínas das membranas celulares e, por conseguinte apresentam um elevado nível de biodisponibilidade (Huang *et al.*, 2002, Roleira *et al.*, 2010).

Um estudo de correlações utilizando o coeficiente de Pearson (r) entre o método de $ORAC_{(FL)}$ lipofílico, hidrofílico, o teor de AGPI e somatório de ômega-3 foi realizada e está representado na Figura 4.

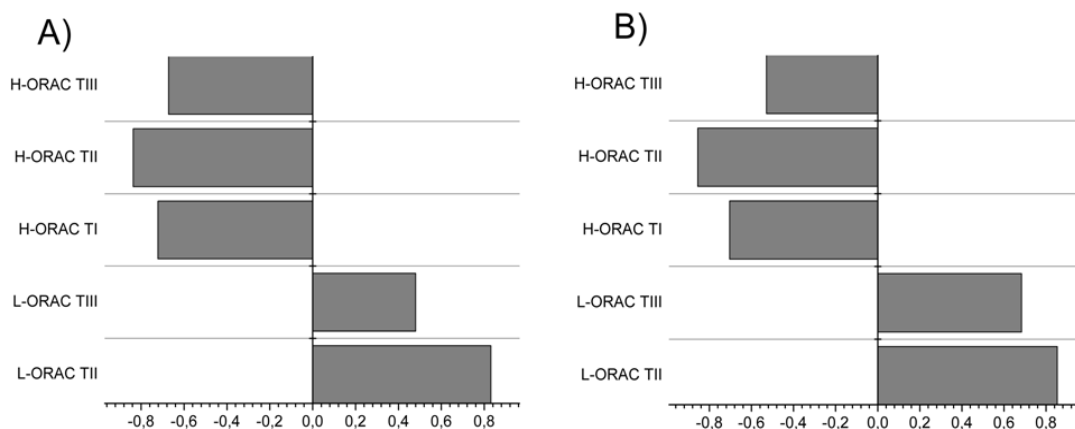


Figura 4. Coeficiente de correlação obtidos das curvas de capacidade antioxidante *versus* (A) teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e (B) somatórios de ácidos graxos ômega-3 (n-3).

Verificou-se correlação negativa entre $H-ORAC_{(FL)}$, AGPI e o somatório ômega-3 em todos os tratamentos. Para a técnica de $L-ORAC_{(FL)}$ o tratamento I não apresentou correlação com nenhuma das variáveis, no entanto, os tratamentos II e III apresentaram valores de correlação consideráveis. Huang *et al.*, 2002 afirmam que os ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides não são determinados através da técnica de $L-ORAC_{(FL)}$ já que o mecanismo de ação do $ORAC_{(FL)}$ é considerado como transferência de átomo de hidrogênio. Contudo, compostos como tocoferóis são claramente determinadas por esta técnica.

Normalmente, quantidades elevadas de tocoferóis estão associados com elevados teores de AGPI (Ixtaina *et al.*, 2011). Com isso, as correlações encontradas nesse estudo podem indicar que além dos ácidos graxos incorporados pela tilápia alimentada com ração suplementada com óleo de chia, houve também a incorporação de compostos com capacidade antioxidantes presentes neste óleo, já que as correlações foram verificadas apenas em T II e T III.

4. Conclusão

Nos filés de tilápias tratadas com ração enriquecida com óleo de chia, ocorreu aumento significativo na concentração de ácidos graxos AGPI n-3, principalmente LNA, e conseqüentemente uma diminuição na razão n-6/n-3. Estas observações foram mais pronunciadas até o período de 30 dias. Além disso, nesses tratamentos foi obtido maior respostas para capacidade antioxidante pelo método de L-ORAC_(FL), sendo estes valores superiores aos tratamento com extrato etanólico da casca do abacate. Os extratos hidrofílicos H-ORAC_(FL) de todos os tratamentos e períodos permaneceram praticamente constantes comparados ao tempo zero indicando que o excesso desses compostos são eliminados pelo organismo do animal.

5. Referências

Al-Souti, A., Al-Sabahi, J., Soussi, B., Stephen, G. (2012). The effects of fish oil-enriched diets on growth, feed conversion and fatty acid content of red hybrid tilapia, *Oreochromis sp.* *Food Chemistry*, 133, 723-727.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1998). *Official Methods of Analysis*. (16th ed.). Arlington: AOAC.

Ayerza, R. (2009). The seeds protein and oil content, fatty acid composition and growing cycle length of a single genotype of chia (*Salvia hispanica L.*) as affected by environmental factors. *Journal of Oleo Science*, 58, 347-354.

Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

Boroski, M., Aguiar, A. C., Boeing, J. S., Rotta, E. M., Wibby, C. L., Bonafé, E. G., Souza, N. E., Visentainer J. V. (2011). Enhancement of pasta antioxidant activity with oregano and carrot leaf. *Food Chemistry*, 125, 696-700.

Carbonera, F., Montanher, P. F., Palombini S. V., Maruyama, S. A., Claus, T., Santo H. M. C., Sheisa C. S., Matsushita, M., Visentainer, J. V. (2014). Antioxidant Capacity in Tilapia Fillets Enriched with Extract of Acerola Fruit Residue. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 25, 1237-1245.

Carbonera, F., Bonafe, E. G., Martin, C. A., Montanher, P.F., Ribeiro, R. P., Figueiredo, L. C., Almeida, V. C., Visentainer, J. V. (2014). Effect of dietary replacement of sunflower oil with perilla oil on the absolute fatty acid composition in Nile tilapia (GIFT). *Food Chemistry*, 148, 230-234.

Hossain, M. A. (2011). Fish as Source of n-3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs), Which One is Better-Farmed or Wild?. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6, 455-466.

Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J., Deemer, E.K. (2002). Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated α -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 50, 1815-1821.

Ixtaina, V. Y., Martí'nez, M. L., Spotorno, V., Mateo, C. M., Maestri, D. M., Diehl, B. W. K., Nolasco, S. M., Tomás, M. C. (2011). Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 166-174.

Joseph, J. D., & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Justi, K. C., Hayashi, C., Visentainer, J. V., Souza, N. E., Matsushita M. (2003). The influence of feed supply time on the fatty acid profile of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed on a diet enriched with n-3 fatty acids. *Food Chemistry*, 80, 489-493.

Karapanagiotidis, I. T., Bell, M. V., Little, D. C., Yakupitiyage, A. (2007). Replacement of Dietary Fish Oils by Alpha-Linolenic Acid-Rich Oils Lowers Omega 3 Content in Tilapia Flesh. *Lipids*, 42, 547-559.

Mazza, M., Pomponi, M., Janiri, L., Bria, P., Mazza, S. (2007). Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: An overview. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 31, 12–26.

Milinsk, M. C., Matsushita, M., Visentainer, J. V., Oliveira, C. C., Souza N. E. (2008). Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative

Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME). *Journal Of The Brazilian Chemical Society*, 19, 1475-1483.

Moreira, A. B., Visentainer, J. V., Souza, N. E., Matsushita, M. (2001). Fatty Acids Profile and Cholesterol Contents of Three Brazilian Brycon Freshwater Fishes. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 565-574.

Passi, S., Cataudella, S., Di Marco, P., De Simone, F., Rastrelli, L. (2002). Fatty Acid Composition and Antioxidant Levels in Muscle Tissue of Different Mediterranean Marine Species of Fish and Shellfish. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 50, 7314-7322.

Ramos Filho, M. M., Ramos, M. I. L., Hiane, P. A., Souza, E. M. T. (2010). Nutritional Value of Seven Freshwater Fish Species From the Brazilian Pantanal. *Journal American oil Chemical Society*, 87, 1461–1467.

Roleira F. M., Christophe S., Orrù E., Manuela G., Garrido, J., Milhazes, N., Podda, N., Paiva-Martins, F., Reis, S., Carvalho, C., Silva, E.J.T., Borges, F. (2010). Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 18, 5816–5825.

Simopoulos, A. P. (2002). Omega-3 fatty acids in inflammation and autoimmune diseases. *Journal of the American College of Nutrition*, 21, 495–505.

Tonial, I. B., Stevanato, F. B., Matsushita, M., Souza, N. E., Furuya, W. M., Visentainer, J. V. (2009). Optimization of flaxseed oil feeding time length in adult Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) as a function of muscle omega-3 fatty acids composition. *Aquaculture Nutrition*, 15, 564-568.

Tuberoso, C., Kowalczyk, A., Sarritzu, E., Cabras, P. (2007). Determination of antioxidant compounds and antioxidant activity in commercial oilseeds for food use. *Food Chemistry*, 103, 1494–1501.

Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*, 338, 985-992.

Visentainer, J. V., (2012). Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, 35, 274-279.

Visentainer, J. V., Souza, N. E., Makoto, M., Hayashi, C., Franco, M. R. B. (2005). Influence of diets enriched with flaxseed oil on the α -linolenic, eicosapentaenoic and ocosahexaenoic fatty acid in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Food Chemistry*, 90, 557-560.

Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, F. J., Olivas, G.I., González-Aguilar, G.A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado. *Food Research International*, 44, 1231–1237.

Wang, W., Bostic, T. R., Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivar. *Food Chemistry*, 122, 1193–1198.

Weaver, K. L., Vester, P., Chilton, J. A., Wilson, M. D., Pandey, P., Chilton, F. H. (2008). The Content of Favorable and Unfavorable polyunsaturated Fatty Acids Found in Commonly Eaten Fish. *Journal of the American Dietetic Association*, 108, 1178-1185.

Wing-Keong, N., Chong, C., Wang, Y., Romano, N. (2013). Effects of dietary fish and vegetable oils on the growth, tissue fatty acid composition, oxidative stability and vitamin E content of red hybrid tilapia and efficacy of using fish oil finishing diets. *Aquaculture*, 97, 372-375.

Wu, C., Duckett, S. K., Neel, J.P.S., Fontenot, J.P., Clapham, W.M. (2008). Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. *Meat Science*, 80, 662–667.

ANEXOS

Tabela 3. Composição de ácidos graxos (mg g^{-1} de lipídios totais) e teor de lipídios totais ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ de amostra) dos filés de tilápia referentes ao tratamento I.

	Tempo 0	15 dias	30 dias	45 dias
Lipídios totais ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	2,82 \pm 0,23	3,26 \pm 0,13	3,53 \pm 0,10	3,67 \pm 0,18
Ácidos Graxos (mg g^{-1} LT)				
14:0	17,17 ^a \pm 0,62	15,91 ^{ab} \pm 1,20	14,48 ^b \pm 0,68	14,85 ^b \pm 0,03
16:0	196,22 ^a \pm 7,46	195,86 ^a \pm 5,56	174,84 ^b \pm 3,98	160,25 ^c \pm 1,20
16:1n-9	5,07 ^a \pm 0,18	4,91 ^a \pm 0,30	5,03 ^a \pm 0,32	4,64 ^a \pm 0,34
16:1n-7	31,08 ^a \pm 1,00	29,77 ^a \pm 2,17	30,97 ^a \pm 2,38	29,74 ^a \pm 2,29
17:0	3,09 ^a \pm 0,12	3,16 ^a \pm 0,13	2,91 ^a \pm 0,24	2,33 ^b \pm 0,19
18:0	69,97 ^a \pm 3,55	65,58 ^a \pm 1,98	55,24 ^b \pm 0,98	47,93 ^b \pm 3,58
18:1n-9	265,86 ^a \pm 10,58	276,47 ^a \pm 16,69	279,50 ^a \pm 5,67	286,24 ^a \pm 6,09
18:1n-7	24,05 ^a \pm 0,91	23,72 ^a \pm 1,44	25,88 ^a \pm 1,42	26,28 ^a \pm 0,94
18:1n-5	2,18 ^a \pm 0,09	2,11 ^a \pm 0,03	2,24 ^a \pm 0,02	2,08 ^a \pm 0,07
18:2n-6	157,78 ^a \pm 3,21	175,59 ^b \pm 3,33	205,64 ^c \pm 3,92	209,88 ^c \pm 5,02
18:3n-6	7,13 ^a \pm 0,10	8,17 ^{ba} \pm 0,54	9,76 ^c \pm 0,67	8,67 ^{bc} \pm 0,36
18:3n-3	9,65 ^a \pm 0,13	11,06 ^{ba} \pm 0,86	13,29 ^{cb} \pm 0,84	12,84 ^c \pm 0,24
20:0	2,47 ^a \pm 0,06	2,15 ^{ab} \pm 0,10	1,57 ^b \pm 0,05	1,94 ^{ab} \pm 0,17
20:1n-9	12,55 ^a \pm 0,63	11,92 ^a \pm 0,83	13,41 ^a \pm 0,27	13,30 ^a \pm 0,38
20:2n-6	6,17 ^a \pm 0,28	9,71 ^b \pm 0,37	11,28 ^c \pm 0,47	9,59 ^b \pm 0,74
20:3n-6	9,32 ^a \pm 0,36	10,33 ^{ab} \pm 0,54	11,85 ^b \pm 0,47	10,26 ^b \pm 0,79
20:4n-6 (AA)	13,46 ^a \pm 0,34	14,73 ^b \pm 0,30	16,86 ^c \pm 0,67	13,29 ^a \pm 0,12
20:4n-3	2,32 ^a \pm 0,07	3,13 ^{cb} \pm 0,03	3,55 ^c \pm 0,16	2,93 ^b \pm 0,29
22:0	0,28 ^a \pm 0,02	0,29 ^a \pm 0,01	0,40 ^a \pm 0,02	0,28 ^a \pm 0,02
22:1n-9	0,44 ^a \pm 0,05	0,40 ^a \pm 0,03	0,42 ^a \pm 0,00	0,38 ^a \pm 0,03
20:5n-3 (EPA)	0,57 ^a \pm 0,03	0,45 ^b \pm 0,02	0,46 ^b \pm 0,04	0,35 ^c \pm 0,03
22:4n-3	7,41 ^a \pm 0,49	7,61 ^a \pm 0,05	9,72 ^b \pm 0,13	8,63 ^c \pm 0,01
24:0	0,21 ^a \pm 0,01	0,34 ^b \pm 0,03	0,54 ^a \pm 0,04	0,43 ^{cb} \pm 0,03
24:1n-9	3,65 ^a \pm 0,16	2,95 ^{bc} \pm 0,06	3,13 ^b \pm 0,10	2,61 ^c \pm 0,22
22:6N-3 (DHA)	11,96 ^a \pm 0,37	10,21 ^b \pm 0,19	10,39 ^b \pm 0,33	7,97 ^c \pm 0,70
AGS	289,41 ^a \pm 8,28	283,29 ^a \pm 6,03	249,98 ^b \pm 4,16	228,02 ^b \pm 3,79
AGMI	344,88 ^a \pm 10,69	352,25 ^a \pm 16,92	360,57 ^a \pm 6,32	365,26 ^a \pm 6,59
AGPI	223,44 ^c \pm 3,32	247,87 ^b \pm 3,56	289,23 ^a \pm 4,20	281,46 ^a \pm 5,21
Σ n-3	29,01 ^b \pm 0,62	28,89 ^b \pm 0,88	33,40 ^a \pm 0,91	29,43 ^b \pm 0,74
Σ n-6	173,27 ^c \pm 3,26	195,63 ^b \pm 3,45	228,76 ^a \pm 4,09	229,73 ^a \pm 5,15
n-6/n-3	5,97 ^c \pm 0,03	6,77 ^b \pm 0,03	6,85 ^b \pm 0,03	7,81 ^a \pm 0,03

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos mono-insaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos ômega-6; n-3 = somatório de ácidos graxos ômega-3.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos (mg g^{-1} de lipídios totais) e teor de lipídios totais ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$ de amostra) dos filés de tilápia referentes ao tratamento II.

	Tempo 0	15 dias	30 dias	45 dias
Lipídios totais ($\text{g } 100\text{g}^{-1}$)	2,82± 0,23	3,79 ± 0,15	3,61 ± 0,34	4,18 ± 0,01
Ácidos Graxos (mg g^{-1} LT)				
14:0	17,17 ^a ±0,62	16,84 ^a ±0,54	14,78 ^b ±0,69	15,23 ^b ±0,22
16:0	196,22 ^a ±7,46	199,82 ^a ±10,67	187,03 ^a ±1,70	158,15 ^b ±2,38
16:1n-9	5,07 ^a ±0,18	5,01 ^a ±0,29	4,92 ^a ±0,39	4,52 ^a ±0,07
16:1n-7	31,08 ^a ±1,00	32,86 ^a ±1,92	34,00 ^a ±2,69	31,02 ^a ±0,27
17:0	3,09 ^a ±0,12	3,20 ^a ±0,24	2,57 ^b ±0,14	2,41 ^b ±0,13
18:0	69,97 ^a ±3,55	69,80 ^a ±2,66	59,85 ^b ±4,94	51,05 ^c ±1,38
18:1n-9	265,86 ^a ±10,58	286,56 ^a ±15,14	280,63 ^a ±3,61	285,16 ^a ±2,99
18:1n-7	24,05 ^a ±0,91	25,00 ^a ±0,78	25,68 ^a ±1,73	24,49 ^a ±0,03
18:1n-5	2,18 ^{ab} ±0,09	1,96 ^{bc} ±0,16	2,34 ^a ±0,07	1,83 ^c ±0,01
18:2n-6	157,78 ^{bc} ±3,21	166,69 ^c ±8,67	171,27 ^a ±3,95	186,56 ^b ±1,74
18:3n-6	7,13 ^{ab} ±0,10	6,67 ^b ±0,33	7,48 ^a ±0,49	6,52 ^b ±0,07
18:3n-3	9,65 ^a ±0,13	28,30 ^b ±1,40	47,18 ^c ±2,07	59,21 ^d ±1,39
20:0	2,47 ^a ±0,06	2,14 ^a ±0,09	1,50 ^b ±0,43	1,94 ^a ±0,15
20:1n-9	12,55 ^a ±0,63	12,20 ^a ±0,15	12,85 ^a ±0,76	13,64 ^a ±0,70
20:2n-6	6,17 ^c ±0,28	8,59 ^{ab} ±0,27	7,96 ^b ±0,53	9,14 ^a ±0,34
20:3n-6	9,32 ^a ±0,36	9,55 ^a ±0,27	8,65 ^{ab} ±0,77	7,88 ^b ±0,75
20:4n-6 (AA)	13,46 ^a ±0,34	13,74 ^a ±0,50	13,17 ^a ±1,74	10,45 ^b ±0,25
20:4n-3	2,32 ^a ±0,07	4,76 ^b ±0,19	7,70 ^c ±0,67	9,86 ^d ±0,12
22:0	0,28 ^a ±0,02	0,75 ^b ±0,03	1,40 ^c ±0,09	1,39 ^c ±0,06
22:1n-9	0,44 ^a ±0,05	0,74 ^b ±0,02	1,14 ^c ±0,08	1,24 ^c ±0,09
20:5n-3 (EPA)	0,57 ^c ±0,03	0,67 ^{bc} ±0,03	0,91 ^a ±0,05	0,76 ^b ±0,08
22:4n-3	7,41 ^{ab} ±0,49	6,95 ^{bc} ±0,19	7,80 ^a ±0,15	6,53 ^c ±0,18
24:0	0,21 ^a ±0,01	0,50 ^b ±0,03	1,17 ^c ±0,04	1,92 ^d ±0,09
24:1n-9	3,65 ^a ±0,16	4,23 ^b ±0,12	5,70 ^c ±0,24	5,12 ^d ±0,15
22:6n-3 (DHA)	11,96 ^a ±0,37	13,06 ^b ±0,26	15,95 ^c ±0,23	13,07 ^b ±0,28
AGS	289,41 ^a ± 8,28	293,05 ^a ±11,01	268,30 ^a ±11,01	232,08 ^b ±11,01
AGMI	344,88 ^a ±10,69	368,55 ^a ±15,28	367,26 ^a ±15,28	367,01 ^a ±15,28
AGPI	223,44 ^a ±3,32	254,22 ^b ±8,81	280,36 ^c ±8,82	300,12 ^d ±8,82
∑n-3	29,01 ^a ±0,62	48,31 ^b ±1,43	70,92 ^c ±1,44	78,81 ^d ±1,44
∑n-6	173,27 ^a ±3,26	184,83 ^{ba} ±8,69	187,88 ^b ±8,70	203,58 ^c ±8,70
n-6/n-3	5,97 ^a ± 0,03	3,83 ^b ± 0,05	2,65 ^c ± 0,05	2,58 ^c ± 0,05

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey. AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos mono-insaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos ômega-6; n-3 = somatório de ácidos graxos ômega-3.

Tabela 5. Composição de ácidos graxos (mg g⁻¹ de lipídios totais) e teor de lipídios totais (g 100g⁻¹ de amostra) dos filés de tilápia referentes ao tratamento III

	Tempo 0	15 dias	30 dias	45 dias
Lipídios totais (g 100g ⁻¹)	2,82 ± 0,23	2,91 ± 0,12	3,39 ± 0,34	3,67 ± 0,15
Ácidos Graxos (mg g ⁻¹ LT)				
14:0	17,17 ^a ±0,62	16,35 ^a ±0,53	13,85 ^b ±0,54	14,73 ^b ±0,61
16:0	196,22 ^a ±7,46	187,92 ^{ab} ±5,88	177,99 ^{bc} ±9,64	172,47 ^c ±7,42
16:1n-9	5,07 ^a ±0,18	4,61 ^b ±0,16	4,45 ^b ±0,09	4,57 ^b ±0,24
16:1n-7	31,08 ^{ab} ±1,00	29,42 ^{ab} ±1,01	28,12 ^b ±0,39	32,54 ^a ±2,26
17:0	3,09 ^{ab} ±0,12	3,41 ^a ±0,16	3,18 ^{ab} ±0,29	2,82 ^b ±0,24
18:0	69,97 ^a ±3,55	67,84 ^a ±1,72	63,65 ^a ±3,51	48,65 ^b ±3,07
18:1n-9	265,86 ^{ab} ±10,58	276,80 ^a ±7,71	254,56 ^b ±1,64	275,78 ^a ±4,77
18:1n-7	24,05 ^{ab} ±0,91	23,77 ^b ±0,50	24,67 ^{ab} ±0,08	26,09 ^a ±1,32
18:1n-5	2,18 ^a ±0,09	1,61 ^b ±0,11	1,77 ^b ±0,04	1,81 ^b ±0,07
18:2n-6	157,78 ^a ±3,21	188,19 ^b ±5,77	190,98 ^b ±1,22	195,39 ^b ±5,55
18:3n-6	7,13 ^a ±0,10	7,06 ^a ±0,20	6,85 ^a ±0,21	7,31 ^a ±0,38
18:3n-3	9,65 ^a ±0,13	31,12 ^b ±1,15	44,47 ^c ±0,35	53,25 ^d ±1,40
20:0	2,47 ^a ±0,06	2,36 ^a ±0,14	1,91 ^a ±0,03	2,32 ^a ±0,09
20:1n-9	12,55 ^a ±0,63	11,29 ^{ab} ±0,38	10,74 ^b ±0,20	12,20 ^a ±0,69
20:2n-6	6,17 ^a ±0,28	9,84 ^b ±0,28	9,93 ^b ±0,37	7,79 ^c ±0,46
20:3n-6	9,32 ^{bc} ±0,36	9,68 ^b ±0,25	10,72 ^a ±0,25	8,95 ^c ±0,25
20:4n-6 (AA)	13,46 ^a ±0,34	13,93 ^a ±0,46	17,84 ^b ±0,64	12,45 ^c ±0,21
20:4n-3	2,32 ^a ±0,07	5,68 ^b ±0,21	9,74 ^c ±0,58	8,41 ^d ±0,29
22:0	0,28 ^a ±0,02	0,76 ^b ±0,04	1,34 ^c ±0,14	1,39 ^c ±0,09
22:1n-9	0,44 ^a ±0,05	0,76 ^b ±0,03	1,18 ^c ±0,06	1,26 ^c ±0,02
20:5n-3 (EPA)	0,57 ^a ±0,03	0,74 ^b ±0,03	1,20 ^c ±0,06	0,88 ^d ±0,03
22:4n-3	7,41 ^a ±0,49	7,07 ^a ±0,20	8,82 ^b ±0,51	7,18 ^a ±0,23
24:0	0,21 ^a ±0,01	0,51 ^b ±0,04	1,22 ^c ±0,08	1,31 ^c ±0,19
24:1n-9	3,65 ^a ±0,16	4,32 ^b ±0,16	6,27 ^c ±0,39	5,33 ^d ±0,14
22:6n-3 (DHA)	11,96 ^c ±0,37	13,60 ^{bc} ±0,40	19,54 ^a ±1,72	14,57 ^b ±0,40
AGS	289,41 ^a ± 8,28	279,15 ^a ±6,16	263,16 ^a ±10,28	243,70 ^a ±8,06
AGMI	344,88 ^{ab} ±10,69	352,58 ^a ±7,80	331,76 ^b ±1,71	359,59 ^a ±5,49
AGPI	223,44 ^a ±3,32	281,23 ^b ±5,94	310,36 ^c ±2,41	307,77 ^c ±5,79
n-3	29,01 ^a ±0,62	51,79 ^b ±1,23	72,83 ^c ±1,83	75,00 ^c ±1,48
n-6	173,27 ^a ±3,26	207,71 ^b ±5,80	211,63 ^b ±1,46	212,13 ^b ±5,59
n-6/n-3	5,97 ^a ± 0.03	4,01 ^b ± 0.03	2,91 ^c ± 0.03	2,83 ^c ± 0.03

Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey. AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos mono-insaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos ômega-6; n-3 = somatório de ácidos graxos ômega-3.

Capítulo III

Quantificação de ácidos graxos e capacidade antioxidante em diferentes espécies de peixes marinhos

Resumo: Os peixes, especialmente os marinhos, são uma rica fonte de ácidos graxos ômega-3, tais como o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), essenciais para a saúde humana. Outro fator relevante é a capacidade antioxidante que esses animais podem apresentar. Sendo assim neste estudo buscou-se fazer um levantamento da composição em ácidos graxos e da capacidade antioxidante de seis espécies de peixes marinhos que habita a costa sul brasileira. A composição em ácidos graxos foi obtida usando a técnica de cromatografia em fase gasosa, e a capacidade antioxidante através da metodologia de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), utilizando extratos hidrofílicos e lipofílicos. Todas as espécies apresentaram quantidades significativas dos ácidos graxos EPA e DHA, com destaque para a Anchova, por apresentar grande quantidade de lipídios totais, e dessa forma ser classificada como um peixe gordo, seus níveis de EPA e DHA são bastante elevados ($39,35 \pm 1,04$ e $123,45 \pm 1,05$ mg g⁻¹ de LT respectivamente). Em algumas espécies a maior capacidade antioxidante foi observada nas frações lipofílicas, enquanto que em outras os maiores valores foram determinados na fração hidrofílica. Uma correlação positiva entre os ácidos graxos poli-insaturados e a capacidade antioxidante dos compostos lipofílicos ($r=0,72$) também foi observada.

Palavras-chave: ômega-3, peixes marinhos, ORAC, Cromatografia em fase gasosa.

Abstract: Fish, especially marine, are a rich source of omega-3 fatty acids, such as eicosapentaenoic acid (EPA, 20n-3) and docosahexaenoic acid (DHA, 22: 6n-3), essential for human health. Another relevant factor is the antioxidant capacity that these animals can present. Therefore in this study we sought to survey the fatty acid composition and antioxidant capacity of six species of marine fish that inhabits the southern brazilian coast. The fatty acid composition was obtained using gas chromatography, and the antioxidant capacity using the ORAC methodology (Oxygen Radical Absorbance Capacity) with hydrophilic and lipophilic extracts. All species showed significant amounts of EPA and DHA fatty acids, particularly the PAN species classified as an oily fish, their levels of EPA and DHA are quite high ($39, 35 \pm 1.04$ and 123.45 ± 1.05 mg g⁻¹ LT respectively). In some species the highest antioxidant capacity was observed in lipophilic fractions, while in other higher values were determined in the hydrophilic fraction. A positive correlation between the poly-unsaturated fatty acids and lipophilic antioxidant capacity ($r = 0.72$) was also observed.

Keywords: omega-3, marine fish, ORAC, gas chromatography

1. Introdução

Pesquisas apontam cada vez mais os efeitos benéficos da inclusão de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3), na saúde humana (Yashodhara *et al.*, 2009).

Os peixes, especialmente os marinhos, são uma rica fonte desses ácidos graxos, principalmente o ácido eicosapentaenoico (EPA, 20n-3) e o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (Jabeen *et al.*, 2011; Alasalvar *et al.*, 2002).

O DHA está diretamente envolvido na manutenção de diversas funções biológicas das membranas, retina, córtex cerebral, tecido nervoso, e plaquetas do sangue (Bonafe *et al.*, 2011; Martin *et al.*, 2006; Ruxton *et al.*, 2009). Enquanto que o EPA está relacionado com o sistema vascular e exibe ações antitrombóticas e anti-inflamatórias (Simopoulos, 2004).

A *American Heart Association* (AHA) recomenda para um público em geral, comer pelo menos duas porções de peixe por semana, já para pacientes com doenças cardiovasculares é recomendado o consumo de um grama de EPA+DHA por dia (Weaver *et al.*, 2008).

Outra classe de compostos que vem despertando grande interesse nas últimas décadas são os antioxidantes. Eles possuem a capacidade de atrasar ou evitar a oxidação de moléculas biologicamente relevantes em tecidos vivos por isso são essenciais para preservar a boa saúde (Arbeloa *et al.*, 2011). No entanto a grande maioria dos estudos sobre a capacidade antioxidante concentraram-se em vegetais, frutas e especiarias (Wu *et al.*, 2008).

Os antioxidantes são classificados de acordo com sua solubilidade em, hidrofílicos, tais como vitamina C e lipofílicos incluindo principalmente, vitamina E e carotenoides.

Assim como os antioxidantes hidrofílicos, os antioxidantes lipofílicos desempenham funções importantes no organismo (Villa-Rodríguez *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2004).

Contudo a maioria dos métodos de determinação de capacidade antioxidante é realizada em meio aquoso, sendo muitas vezes a quantidade de compostos lipofílicos subestimados (Wu *et al.*, 2008).

Dessa forma o objetivo desse estudo foi avaliar a composição em ácidos graxos, principalmente ácidos graxos ômega-3, em espécies de peixes marinhos comercializados na costa sul brasileira, assim como determinar a capacidade antioxidante dessas espécies através do teste de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) utilizando a metil β ciclodextrina para determinar compostos lipofílicos.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

As informações referentes às seis espécies de peixes do extrativismo estudadas nesse trabalho estão listadas na Tabela 1.

Foram coletados aproximadamente 1kg de filé de cada espécie, composta de pelo menos três exemplares da mesma espécie.

O local de coleta foi o estado de Santa Catarina (Latitude 27°01'31" sul e a uma longitude 48°39'16" oeste) durante o mês de Janeiro 2013.

Tabela 1. Nome científico e comum das espécies de peixes analisadas

Gênero	Espécie	Família	Nome comum
<i>Cynoscion</i>	<i>Microlepidotus</i>	Sciaenidae	Pescada Branca (PPB)
<i>Coryphaena</i>	<i>Hippurus</i>	Coryphaenidae	Dorado (PD)
<i>Pseudopercis</i>	<i>Numida</i>	Pinguipedídeos	Namorado (PN)
<i>Pomatomus</i>	<i>Saltatrix</i>	Pomatomidae	Anchova (PAN)
<i>Seriola</i>	<i>Lalandi</i>	Carangidae	Olhete (PO)
<i>Xiphias</i>	<i>Gladius</i>	Xiphiidae	Meka (PM)

Das espécies analisadas o PO e PN são espécies encontradas mais na costa brasileira, já a PPB pode ser encontrada por todo o sul da América enquanto que o PD, PAN e o PM se difundem por várias regiões do mundo. Em termos de alimentação todas as espécies analisadas são carnívoras.

2.2. Composição proximal

Os teores de umidade, cinzas e proteína bruta foram obtidos de acordo com AOAC (1998) e os lipídios totais foram extraídos segundo a metodologia de Bligh & Dyer (1959).

2.3. Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A metilação dos ácidos graxos foi realizada segundo o método de Joseph & Ackman (1992) utilizando como reagente o trifluoreto de boro (BF_3) em metanol. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás da marca Thermo, modelo trace ultra 3300, equipado com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP - 7420 (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de cianopropil/polisiloxano). O fluxo de H_2 (gás de arraste) foi de 1,2 mL/min, com 30 mL/min de N_2 (*make up*); e 35 e 300 mL/min, para o H_2 e ar sintético, respectivamente, para a chama do detector.

O volume injetado foi de 2,0 μL , utilizando *split* 1:80, sendo as temperaturas do injetor 220°C e do detector 240°C. A rampa foi programada com a temperatura inicial da coluna a 165°C durante 7,0 min, elevada a 185°C a uma taxa de 4°C min^{-1} , mantida por 4,67 min, foi elevada novamente a 235°C em uma taxa de 6,0°C min^{-1} e mantida por 5,0 min, totalizando um tempo total de 30,0 min de corrida cromatográfica.

Os tempos de retenção dos analitos e a área dos picos correspondentes foram obtidos através da integração pelo Software Chromquest versão 5.0. Os ácidos graxos foram identificados a partir da comparação de seus tempos de retenção com padrões SIGMA (USA) de composição conhecida.

A quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada através da padronização interna, utilizando como padrão o metil éster do ácido tricosanóico (23:0), da marca SIGMA (USA), e os cálculos realizados segundo método de Joseph & Ackman (1992). Os valores do fator de correção teórico para o DIC (detector de ionização em chama) foram usados para a determinação dos

valores de concentrações (Visentainer, 2012). O teor dos ácidos graxos nas amostras foram calculados em mg g⁻¹ de lipídios totais utilizando a Equação 1.

$$AG = \frac{A_X M_P F_{CT}}{A_P M_X F_{CAE}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: AG é a concentração em mg de ácidos graxos por g de lipídios totais, A_X é a área do pico (ácidos graxos), A_P é a área do pico do padrão interno (PI) metil éster do ácido tricosanóico (23:0), M_P é a massa do PI (em mg) adicionada à amostra, M_X é a massa da amostra (em mg), F_{CT} é o fator de correção teórico e F_{CAE} é o fator de conversão necessário para expressar os resultados em mg de ácidos graxos.

2.4. Análise da capacidade antioxidante por L-ORAC_(FL) e H-ORAC_(FL)

O procedimento de preparação dos extratos lipofílicos e hidrofílicos para análise de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) foi baseado na metodologia de Wu *et al.*, 2008. Os filés de Tilápia foram moídos, liofilizados e peneirados (80 mesh). Para as amostras de rações o processo de liofilização não foi necessário.

Pesou-se 0,5 ± 0,05 g de amostra e, primeiramente, foi extraída a parte lipofílica com 10,0 mL de hexano. A mistura foi sonicada por 5 min a 37°C e durante este período agitou-se duas vezes por 30 s cada. Após este tempo as amostras foram mantidas a temperatura ambiente por 10 min sendo que após 5 min agitou-se mais 30 s. As amostras foram então centrifugadas por 10 min a 4000 rpm em uma centrífuga refrigerada da marca Sanyo modelo Harrier 18/80. Após este período o sobrenadante foi transferido para um balão de fundo chato, sendo o precipitado submetido ao mesmo procedimento. Os sobrenadantes foram combinados e concentrados em rotaevaporador rotativo, diluídos com 1,5 mL de acetona e 4,5 mL de RMCD 7% (randomina metil β ciclodextrina).

A extração hidrofílica foi realizada com o resíduo restante da extração lipofílica. Foram adicionados 10,0 mL de uma mistura acetona:água:ácido acético (70; 29,5; 0,5 v/v/v) aos tubos, que foram então sonicados a 37°C por 5 min, sendo

que durante este período foram agitadas 2 vezes por 30 s cada. As amostras foram deixadas a temperatura ambiente por 10 min sendo que durante este período foram agitadas 2 vezes por 30 s cada. Após este período foram centrifugadas por 15 min a 4000 rpm. O sobrenadante foi coletado em um balão volumétrico de 25,00 mL e a operação foi repetida. Os sobrenadantes foram combinados e o volume do balão completado com solução extratora.

A capacidade antioxidante foi determinada, de acordo com Huang *et al.*, 2002, em espectrofluorímetro da Perkin Elmer, modelo VictorTMX4, utilizando microplacas.

Foram adicionados às microplacas 20,0 µL dos extratos preparados anteriormente e diluídos apropriadamente com a mesma solução extratora. Para o branco e a curva de calibração foram utilizados 20,0 µL da solução extratora ou das soluções de Trolox®. Adicionou-se 200,0 µL de fluoresceína com concentração de 4,0 nmol L⁻¹, preparada a partir de uma solução estoque (1,0 mmol L⁻¹) em tampão fosfato pH 7,0.

A microplaca foi inserida no espectrofluorímetro, aguardando-se 5 min, para que as soluções presente na microplaca chegassem a temperatura de análise de 37°C. Em seguida, foram adicionados 75,0 µL de AAPH (2,2-azobis(2-aminopropane) dihydrochloridre) com concentração de 17,2 mg mL⁻¹ para a análise de L-ORAC e de 8,6 mg mL⁻¹ para H-ORAC. Iniciou-se imediatamente a leitura totalizando 30 ciclos com intervalos de 1 min. O comprimento de onda da emissão e excitação foram 515 e 485 nm, respectivamente.

Os resultados foram expressos em µmol equivalente Trolox® (TE) por grama de amostra seca. Sendo calculado pela equação da reta obtida pelas curvas de calibração:

$$y = 0,1957x + 1,8651 \quad (r^2 = 0,9856) \text{ L-ORAC}$$

$$y = 0,3412x + 1,7224 \quad (r^2 = 0,9916) \text{ H-ORAC}$$

Em que: x é o valor de ORAC expresso em µmol g⁻¹ TE e y é a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência (AUC) da amostra ou padrão menos a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência do branco sendo que AUC pode ser calculado conforme equação 2:

$$AUC = (1 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{n+1}/f_0) \quad (2)$$

Em que f_0 é a intensidade de fluorescência inicial e f_n é a intensidade de fluorescência no tempo n .

3. Resultados e discussão

3.1. Composição centesimal

Os valores de composição centesimal das seis espécies de peixes analisadas estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Composição centesimal em % (m/m) das diferentes espécies de peixes marinhos analisadas.

Espécies	Umidade	Cinzas	Proteína	Lipídios Totais
PPB	81,76 ± 0,45	0,60 ± 0,03	17,18 ± 1,50	0,56 ± 0,01
PD	78,27 ± 0,19	0,96 ± 0,04	21,42 ± 0,26	1,48 ± 0,08
PN	82,27 ± 0,80	0,54 ± 0,02	17,09 ± 0,35	0,46 ± 0,03
PAN	69,07 ± 0,93	0,65 ± 0,03	19,76 ± 0,63	10,16 ± 0,35
PO	74,64 ± 0,68	1,00 ± 0,04	20,94 ± 0,11	3,34 ± 0,31
PM	68,29 ± 1,28	0,92 ± 0,04	19,30 ± 0,64	12,04 ± 0,46

Resultados expressos como média ± desvio padrão das três replicatas.

Os teores de umidade e cinzas deste estudo estão dentro dos intervalos observados por outros autores (Jabeen *et al.*, 2011; Abii *et al.*, 2007). Analisando os valores de proteína bruta observamos que com exceção das espécies PPB e PN os valores ficaram próximos de 20% em média.

De acordo com o teor de LT os peixes podem ser classificados em: peixes magros (<5%), peixes com teor médio de gordura (5-10%) e peixes gordos (>10%) (Suriah *et al.*, 1995). Assim a maioria das espécies investigadas são classificadas como peixes magros (PPB, PD, PO, e PN), apenas a espécies PM e PAN são classificadas como peixe gordo.

3.2. Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos das espécies estudadas está apresentada na Tabela 3. Ao todo foram identificados trinta e três ácidos graxos que variaram entre cada espécie.

Considerando os ácidos graxos saturados (AGS) o majoritário entre todas as espécies foi o ácido palmítico (16:0), seguido pelo ácido esteárico (18:0) e mirístico (14:0). Para os monoinsaturados (AGMI) o ácido oléico (18:1n-9) apresentou as maiores quantidades, seguido pelo ácido palmitoléico (16:1n-7).

De acordo com Bayir *et al.* 2006, e Osman *et al.*, 2000, os ácidos graxos saturados encontrados em maior quantidade em espécies marinhas são o palmítico (16:0) e o mirístico (14:0). Entre os AGMI o ácido oléico (18:1n-9) e o ácido palmitoléico (16:1n-7) são os majoritários, assim como o encontrado nesse estudo.

Outros ácidos graxos de grande valor nutricional pertencentes a classe dos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3), também foram encontrados nas espécies estudadas como EPA, e o DHA sendo este último o majoritário entre os AGPI, seguido, na maioria das espécies, pelo EPA. A exceção observada foi para peixe PM, em que o segundo ácido graxo AGPI encontrado em maior abundância foi o ácido 11,14-eicosadienoico (22:2n-6).

A composição de AG em diferentes espécies de peixe pode variar de acordo com vários parâmetros entre eles: tamanho, sexo, estação, habitat, e o estado de seu ciclo reprodutivo (Guil-Guerrero *et al.*, 2011).

Assim, isso pode estar relacionado ao fato de alguns AG, como o ácido docosanoico (22:0), ácido 8-heptadecenoico (17:1n-9), ácido 12-heptadecenoico (17:1n-5), ácido 12-eicosenoico (20:1n-8), ácido 13-eicosenoico (20:1n-7), ácido 6,9,12-octadecatrienoico (18:3n-6) e o ácido 12,15,18,21-tetracosatetraenoico (24:4n-3), terem sido encontrados em apenas algumas espécies.

Também foi observado que nas espécies estudadas a quantidade de EPA foi sempre inferior a quantidade de DHA, o que foi encontrado também em outros trabalhos (Guil-Guerrero *et al.*, 2011; Osman *et al.*, 2001; Bayir *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2010).

Tabela 3. Composição de ácidos graxos em mg g⁻¹ de LT referentes as espécies estudadas.

Ácidos Graxos	PPB	PD	PN	PAN	PO	PM
AGS						
14:0	28,46±1,42	25,61±0,38	15,53± 0,12	41,05±1,21	26,90±0,23	22,18±0,99
15:0	7,81±0,38	5,52±0,40	3,40±0,03	5,72±0,04	4,96±0,06	2,37±0,19
16:0	254,41±4,67	182,39±3,35	201,94±5,89	215,62±4,98	194,91±0,49	134,00±5,33
17:0	9,96±0,12	6,53±0,03	3,97±0,11	4,11±0,12	5,15±0,05	5,79±0,50
18:0	77,97±0,25	72,52±1,02	65,31±1,23	68,54±0,09	56,46±0,10	51,76±1,85
22:0	6,75±0,04	2,79±0,03	nd	nd	8,95±0,02	20,79±0,04
24:0	6,16±0,13	6,37±0,08	5,97±0,06	6,83±0,06	7,56±0,03	16,62±0,031
AGMI						
16:1n-11	5,72±0,08	3,65±0,33	3,88±0,04	4,46±0,02	4,04±0,04	2,19±0,35
16:1n-9	5,34±0,09	2,62±0,05	3,40±0,01	2,53±0,01	3,26±0,09	9,96±0,78
16:1n-7	84,34±1,23	29,34±0,055	32,81±1,02	50,32±1,51	47,00±0,96	32,06±2,52
17:1n-11	1,69±0,03	1,31±0,02	7,17±0,13	5,48±0,06	1,44±0,01	0,61±0,05
17:1n-9	9,26±0,22	5,72±0,07	nd	nd	2,81±0,02	6,69±0,60
17:1n-5	0,81±0,06	Nd	15,15±0,09	2,80±0,01	0,30±0,03	0,82±0,03
18:1n-9	157,53±5,63	186,61±5,54	90,37±2,02	215,70±3,14	205,07±3,97	382,9±8,12
18:1n-7	34,33±0,26	21,63±0,70	17,03±0,11	26,12±1,02	24,75±0,05	24,41±0,46
20:1n-9	5,26±0,21	1,70±0,03	2,28±0,02	5,97±0,03	2,97±0,05	3,06±0,02
20:1n-8	1,60±0,04	2,38±0,02	nd	nd	7,54±0,01	0,58±0,08
20:1n-7	nd	nd	3,10±0,01	5,97±0,02	2,51±0,02	nd
AGPI						
18:2n-6	7,29±0,11	23,71±1,50	10,46±0,08	6,68±0,08	11,70±0,06	4,44±0,02
18:2n-4	nd	nd	0,88±0,03	0,95±0,01	nd	2,29±0,03
18:3n-6	0,79±0,11	nd	1,71±0,02	0,40±0,01	nd	nd
18:3n-3	3,45±0,12	8,83±1,06	10,91±0,05	6,54±0,06	7,24±0,08	3,96±0,06
20:2n-6	25,34±0,23	12,21±0,02	1,01±0,01	1,01±0,01	5,07±0,31	65,55±0,63
20:4n-6 (AA)	3,69±0,04	3,62±0,01	4,35±0,05	13,59±1,02	11,64±0,09	18,10±0,09
20:3n-3	1,49±0,01	1,57±0,05	1,51±0,03	2,38±0,05	0,89±0,02	2,06±0,08
20:4n-3	2,40±0,01	4,22±0,14	2,27±0,01	3,32±0,03	4,35±0,03	3,35±0,05
20:5n-3(EPA)	48,79±1,23	34,93±0,08	40,55±1,23	39,35±1,04	46,15±0,91	22,48±0,07
22:3n-3	1,05±0,02	0,92±0,01	11,64±0,12	2,20±0,02	1,59±0,01	0,34±0,03
22:5n-6	12,39±0,43	4,55±0,04	40,16±0,16	5,76±0,01	3,32±0,03	2,33±0,01
22:5n-3 (DPA)	31,59±0,35	26,06±0,26	30,12±0,09	17,31±0,01	11,05±0,52	13,96±0,05
22:6n-3 (DHA)	100,06±3,45	208,45±0,99	243,02±3,45	123,45±1,05	180,36±2,40	52,19±0,77
24:4n-3	9,87±0,21	15,92±0,0	nd	nd	7,30±0,02	2,16±0,01

AGS= Ácidos graxos saturados; AGMI= Ácidos graxos monoinsaturados; AGPI= Ácidos graxos poli-insaturados; PPB =Pescada Branca; PD = Dourado; PN = Namorado; PAN = Anchova; PO = Olhete; PM = Meka

Das espécies pesquisadas a PN, PPB apresentaram as maiores quantidade de EPA e DHA respectivamente em mg g⁻¹ de LT. Contudo convertendo as quantidade desses ácidos graxos para uma porção de 100 g de filé de peixe a espécie PAN, por apresentar uma maior quantidade de LT, tem as maiores quantidades de EPA e DHA (399,79 e 1303,8 mg 100g⁻¹ de filé respectivamente).

Em termos de porcentagem a espécie PAN apresentou uma quantidade de DHA e EPA de 14,27 e 4,55% do total de ácidos graxos, enquanto que na espécie PN a quantidade de DHA foi de 28% e de EPA 4,6 % do total de ácidos graxos.

Em estudo realizado por Bayir *et al.*, 2006, resultados referentes as quantidade de EPA e DHA para a anchova (*Engraulis engrasicolus*) foi de 11% e 25 % respectivamente, do total de ácidos graxos, enquanto que para o salmão (*Salmo salar*) a quantidade de EPA foi de 6,02 e de DHA 20,66 % do total de ácidos graxos. Larsen *et al.*, 2010 encontrou valores de EPA e DHA para salmão de cativeiro de 5,7 e 7,3 % do total de ácidos graxos.

Os valores dos somatórios e razões de ácidos graxos também têm grande interesse nutricional e estão listados na Tabela 4 para as espécies estudadas.

Tabela 4. Somatórios e razões de ácidos graxos das diferentes espécies de peixes estudadas.

	PPB	PD	PN	PAN	PO	PM
AGS	391,51±4,90	301,73±3,55	296,12±6,02	341,85±5,13	304,89±0,56	253,52±5,
AGMI	305,89±5,78	254,96±5,59	172,91±2,27	299,92±3,63	301,70±4,09	463,39±8,
AGPI	224,47±3,50	345,00±1,46	400,87±23,45	222,93±1,47	299,60±2,40	193,22±0,
n-3	149,92±3,69	257,14±1,48	340,02±23,48	208,14±1,48	212,77±2,64	100,50±1,
n-6	49,51±0,45	44,09±1,50	57,69±0,19	21,67±1,02	20,09±0,11	90,42±0,1
n-6/n-3	0,33±0,01	0,17±0,00	0,17±0,01	0,10±0,00	0,09±0,00	0,90±0,01
AGPI/AGS	0,57±0,01	1,14±0,02	1,35±0,04	0,65±0,01	0,98±0,01	0,76±0,02
AGPI/AGMI	0,57±0,01	1,35±0,03	1,35±0,04	0,74±0,01	0,99±0,01	0,42±0,01

AGS = Somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = Somatório de ácidos graxos mono-insaturados; AGPI = Somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-3 = Somatório de ácidos graxos ômega-3; n-6 = Somatório de ácidos graxos ômega-6; AGS = Somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = Somatório de ácidos graxos poli-insaturados; PPB = Pescada Branca; PD = Dourado; PN = Namorado; PAN = Anchova; PO = Olhete; PM = Meka.

A espécie PPB contém o óleo com teores de ácidos graxos mais saturado (391,51 mg g⁻¹ LT), enquanto que o PN, apresentou o óleo com maior quantidade de AGPI (400,87 mg g⁻¹ LT), e a PM obteve a maiores valores para AGMI (463,39 mg g⁻¹ LT).

A razão n-6/n-3 pode ser usada como um índice para comparar o valor nutricional em relação aos óleos de peixe pertencentes as diferentes espécies.

Segundo Simopoulos, 2011 uma razão n-6/n-3 ótima para a saúde humana está entre 1,0 e 2,0 sendo assim, todas as espécies estudadas estão abaixo do limite recomendado ou seja possuem quantidade de ômega-3 superiores a de ômega-6.

Contudo as dietas ocidentais têm uma proporção de 10/1 a 20-25/1, indicando uma deficiência em ácidos graxos ômega-3 (Simopoulos, 2011). Dessa maneira a inserção de quaisquer espécies pesquisada à dieta, aumentaria a quantidade de ômega-3 consumida.

Outro índice importante que indica o valor nutricional dos óleos de peixe é o AGPI/AGS. Alimentos que possuem essa razão elevada têm efeitos benéficos sobre a glicemia e o metabolismo lipídico, promovendo até mesmo a redução da gordura corporal total e da termogênese (Almeida *et al.*, 2009).

As relações de AGPI/AGS encontradas nesse trabalho variaram de 0,57 para a espécie PPB a 1,55 para a PN, ficando todas na faixa recomendada por Simopoulos, 2004.

3.3. Capacidade antioxidante

Os resultados obtidos pelas análises de L-ORAC_{FL} e H-ORAC_{FL} para as espécies de peixes estudadas estão expressos na Figura 1.

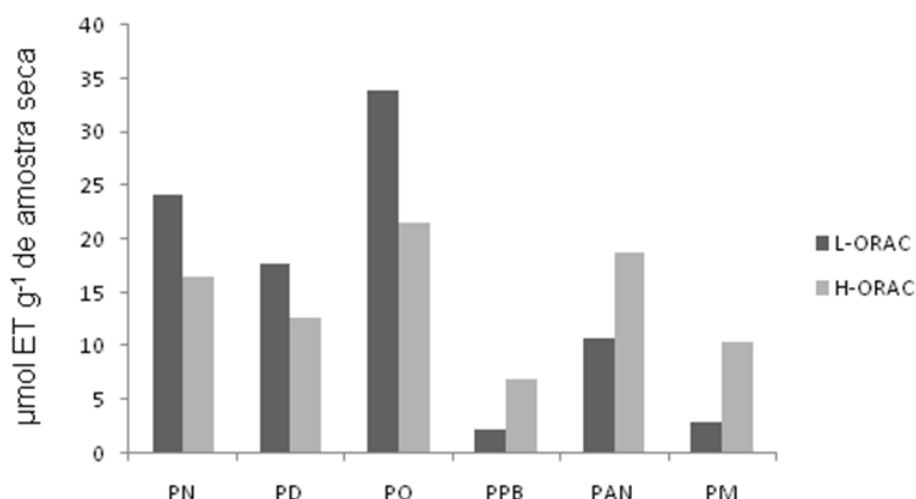


Figura 1. Capacidade antioxidante em $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra seca, para L-ORAC_(FL) e H-ORAC_(FL) das diferentes espécies de peixes analisadas.

As espécies PN, PD e PO apresentaram os maiores valores para os L-ORAC_{FL} enquanto que as espécies PPB, PAN e PM apresentam maiores valores de H-ORAC_{FL}.

Em termos de capacidade antioxidante total (H-ORAC+L-ORAC) a espécie PO apresentou as maiores quantidades.

Wu *et al*, 2004, avaliou a capacidade antioxidante, por L-ORAC e H-ORAC, de frutas, vegetais e nozes. Nesses alimentos foi encontrada uma quantidade de antioxidantes hidrofílicos superior a lipofílicos, isso porque em frutas e vegetais a parte hidrofílica contribui em mais de 90% da capacidade antioxidante total.

O Tomate, por exemplo, apresentou um valor de 0,34 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra fresca para L-ORAC_{FL} e de 4,26 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra fresca para H-ORAC_{FL}, contudo essa diferença entre as classes diminui entre as oleaginosas. Em nozes brasileiras o valor para L-ORAC_{FL} foi de 5,57 e para H-ORAC_{FL} 8,62 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra fresca (Wu *et al.*, 2004).

Como todos os organismos aeróbios, os peixes são suscetíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio e apresentam defesas antioxidantes especialmente enzimas (catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase) e juntamente com estas enzimas, são encontrados carotenoides, vitaminas E, K e C entre outros (Martínez-Álvarez *et al.*, 2005).

A vitamina E é um dos principais antioxidantes lipossolúvel em animais, fazendo parte da principal defesa contra a oxidação de AGPI, que são encontrados em grandes quantidades no tecido de peixes (Tocher *et al.*, 2003).

Sendo assim o valor calculado para o coeficiente de correlação de Person (r) entre a quantidade de L-ORAC e AGPI para as espécies de peixes estudadas foi de 0,72.

Wu *et al.* 2008 estudando a capacidade antioxidante em carne bovina, avaliou a influência da dieta dos animais, sob esses compostos, e observou que os compostos lipofílicos apresentaram diferença estatística com a mudança na dieta, estando os valores, para esses compostos, entre 0,8 a 1,1 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra seca. As quantidades nesse trabalho variaram de 2,93 a 33,85 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ de amostra seca.

Como muitas circunstâncias, bióticas e abióticas, promovem a resposta da defesa antioxidante em peixes várias classes de antioxidantes podem estar presente nas espécies estudadas.

Dentre essas classes, o grupo dos aminoácidos tipo micosporina (MAA), encontrado em muitos organismos marinhos, vêm sendo estudado por apresentar possíveis funções antioxidantes.

As MMA são moléculas altamente polares e de baixa massa molecular. Estão relacionados a uma função fotoprotetora nos organismo marinhos, assim como a melanina nos vertebrados superiores. Apenas bactérias, fungos e algas sintetizam as MMA, sendo que os peixes podem adquirir essa substância pela dieta (Shick *et al.*, 2002).

Em estudo realizado por Arbeloa *et al.*, 2010, o gadusol (3,5-dihidroxi-5-hidroximetil-2-metoxiciclohex-2-en-1-one), composto pertencente a classe das MAA, apresentou atividade antioxidante comparada ao ácido ascórbico.

4. Conclusão

As espécies estudadas neste trabalho apresentaram ácidos graxos de importante valor nutricional na sua fração lipídica do filé, tais como EPA e DHA, em quantidades apreciáveis, além de estarem de acordo com as recomendações para as razões n-6/n-3 e AGPI/AGS. Essas espécies também apresentaram capacidades antioxidantes frente ao teste de ORAC. Seguindo a recomendação da AHA para um paciente com doenças cardiovasculares, o consumo de apenas 130 mg de filé da espécie PAN supriria a sua necessidade diária de consumo dessas substâncias.

5. Referências

Abii, T. A., Afieroho, O. E., Nnamdi, F. U. (2007). Comparative assessment of heavy metals in *Oreochromis niloticus* Tilapia (from the Michael Okpara University of Agriculture Umudike) freshwater fish pond in Abia state with those from Uzere Freshwater pond in Delta state of Nigeria. *Journal of Fisheries International*, 2, 226–230.

Alasalvar, C., Tylor, K. D. A., Zubcov, E., Shahidi, F., Alexis, M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): Total lipid content, fatty acids and trace mineral composition. *Food Chemistry*, 9, 145-150.

Almeida, M. E. F., Queiroz, J.H., Queiroz, M. E.L.R., Costa, N. M. B., Matta, S. L.P. (2009). Tissue lipid profile of rats fed with different lipid sources. *Revista de nutrição* 22, 51-60.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists) (1998). *Official Methods of Analysis*. (16th ed.). Arlington: AOAC.

Arbeloa, E. M., Uez, M. J., Bertolotti, S. G., Churio, M. S., (2010). Antioxidant activity of gadusol and occurrence in fish roes from Argentine Sea. *Food Chemistry*, 119, 586–591.

Bayır, A., Haliloglu, H., Sirkecioglu, A., Aras, N., (2006). Fatty acid composition in some selected marine fish species living in Turkish waters. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 163–168.

Bligh, E. G., Dyer, W. J., (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911-917.

Bonafé, E. G., Aguiar, A. C., Boroski, M., Montaeiro, J. P., Souza, N. E., Matsushita, M., Visentainer, J. V., (2011). Quantification of EPA and DHA in seafood of the south coast of Brazil. *Nutrition & Food Science*, 41, 401-411.

Jabeen, F., Chaudhry, A. S., (2011). Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Food Chemistry*, 125, 991–996.

Guil-Guerrero, J. L., Venegas-Venegas E., Rincon-Cervera, M. A., Suárez, M. D., (2011). Fatty acid profiles of livers from selected marine fish species. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24, 217–222.

Joseph, J.D., & Ackman, R.G., (1992). Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Larsen, D., Quek, S.Y., Eyres, L., (2010). Effect of cooking method on the fatty acid profile of New Zealand King Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Food Chemistry*, 119, 785–790.

Martin, C. A., Almeida, V. V., Ruiz, M.R., Visentainer, J.E.L., Matsushita, M., Souza, N. E., Visentainer, J.V., (2006). Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Revista de Nutrição*, 19, 761-70.

Martínez-Álvarez, R. M., Morales, A.E., Sanz, A., (2005). Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15, 75–88.

Osman, H.A.R., Suriah, E.C., (2001). Law Fatty acid composition and cholesterol content of selected marine fish in Malaysian waters. *Food Chemistry*, 73, 55-60.

Ruxton, C. H. S., Derbyshire, E., (2009). Latest evidence on omega-3 fatty acids and health. *Nutrition & Food Science*, 39, 423-38.

Shick, J. M., Dunlap, W. C., (2002). Mycosporine-like amino acids and related gadusols: Biosynthesis, Accumulation, and UV-protective Functions in Aquatic Organisms. *Journal Physiology*, 64, 223–62.

Simopoulos, A. P. (2011). Evolutionary Aspects of Diets: The Omega-6/Omega-3 Ratio and the Brain. *Mol Neurobiol*, 44, 203-215.

Simopoulos, A. P., (2004). Omega-6/omega-3 essential fatty acid ratio and chronic diseases. *Food Reviews International*, 20, 77-90.

Suriah, A. R., Teh, S. H., Osman, H., Nik-Mat, D. (1995) Fatty acid composition of same Malaysian freshwater fish. *Food chemistry*, 54, 45-49.

Tocher, D.R., Mourente, G., Vandereecken, A., Evjemo, J.O., Diaz, E., Wille, M., Bell, J.G., Olsen, Y., (2003). Comparative study of antioxidant defence mechanisms in marine fish fed variable levels of oxidised oil and vitamin E. *Aquaculture International*, 11, 195–216.

Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, F., Olivas, G. I., González-Aguilar, G. A., (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of Hass' avocado. *Food Research International*, 44, 1231–1237.

Visentainer, J. V., (2012). Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, 35, 274-279.

Weaver, K. L., Vester, P., Chilton, J. A., Wilson, M. D., Pandey, P., Chilton, F. H., (2008). The Content of Favorable and Unfavorable polyunsaturated Fatty Acids Found in Commonly Eaten Fish. *Journal of the American Dietetic Association*, 108, 1178-1185.

Wu, C., Duckett, S. K., Neel, J.P.S., Fontenot, J.P., Clapham, W.M., (2008). Influence of finishing systems on hydrophilic and lipophilic oxygen radical absorbance capacity (ORAC) in beef. *Meat Science*, 80, 662–667.

Wu, T. H., Bechtel, P. J., (2008). Salmon by-product storage and oil extraction. *Food Chemistry*, 4, 868–871.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D.B., Gebhardt, S. E., Prior, R., (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal Agriculture and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

Yashodhara, B. M., Umakanth, S., Pappachan, J. M., Bhat, S. K., Kamath, R., Choo, B.H., (2009). Omega-3 fatty acids: A comprehensive review of their role in health and disease. *Postgraduate Medical Journal*, 85, 84–90.

Capítulo IV

Desenvolvimento de uma nova metodologia para extração de lipídios totais em tecido muscular de peixes

Resumo: A determinação do teor de lipídios totais e a composição em ácidos graxos de amostras de tecido muscular de peixe é um parâmetro importante utilizado em estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais. Esta determinação é realizada, geralmente, utilizando solventes orgânicos de alta toxicidade, o que vai contra as práticas da química verde. Pensando nisso, este trabalho teve como objetivo propor uma metodologia de extração de lipídios totais, de tecido muscular de peixes, empregando solventes com menor toxicidade (hexano e acetona) sem alterar a eficiência da extração de lipídios polares e neutros. A metodologia utilizada como referência foi a de Bligh & Dyer, por ser uma das mais empregadas e utilizar uma mistura de três solventes com polaridades diferentes, permitindo dessa forma, a extração de lipídios polares e neutros. Após um estudo do equilíbrio físico entre os solventes hexano, acetona e água chegou-se a uma proporção de 1:1,2:1,5 (hexano:acetona:água) em que se obteve uma quantidade de lipídios totais ($1,13 \pm 0,01$) próxima a obtida pela metodologia de Bligh & Dyer ($1,17 \pm 0,09$). O estudo da composição de ácidos graxos das frações neutra e polar foi fundamental para mostrar a similaridade entre os dois métodos, fato comprovado pela análise de PCA.

Palavras- chave: ácidos graxos, química verde, extração de lipídios totais.

Abstract: The determination of total lipid and fatty acid composition in samples of fish muscle tissue is an important parameter used in biochemical, physiological and nutritional studies. This determination is made, generally using highly toxic organic solvents, which goes against the practices of Green Chemistry. Thinking about it, this work aimed to propose a methodology for total lipids extraction from fish muscle tissue using solvents with lower toxicity (hexane and acetone) without changing the extraction efficiency of polar and neutral lipids. Bligh & Dyer methodology was used as reference, as one of the most widely used and for use a mixture of three solvents with different polarities, thereby enabling the extraction of polar and neutral lipids. After a study of the physical balance between the solvents hexane, acetone and water, was reached a ratio of 1: 1.2: 1.5 (hexane: acetone: water) that obtained an amount of total lipids (1.13 ± 0.01) close to that obtained by of Bligh & Dyer method (1.17 ± 0.09). The study of fatty acid composition of neutral and polar fractions was essential to show the similarity between the two methods, a fact corroborated by PCA analysis.

Keywords: fatty acids, green chemistry, total lipids extraction.

1. Introdução

A determinação do teor de lipídios totais e a composição em ácidos graxos de amostras de tecido muscular de peixes é um parâmetro importante, utilizado em estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais (Ramalhosa *et al.*, 2012).

O teor de lipídios totais é tradicionalmente determinado gravimetricamente por extrações com solvente, em um processo puramente físico (Xiao *et al.*, 2012).

Métodos como Soxhlet (AOCS Ba 3-38), que utiliza refluxo com solvente por algumas horas, são bastante utilizadas. Contudo não é recomendado quando o objetivo é uma análise da composição em ácidos graxos, devido às condições drásticas empregadas durante o procedimento.

A metodologia de Bligh & Dyer, 1959, é outro procedimento bastante utilizado e trata-se de uma versão simplificada do procedimento clássico proposto por Folch *et al.*, 1957. Nesta metodologia utiliza-se uma mistura binária de clorofórmio e metanol para a extração e foi desenvolvido inicialmente para tecido muscular de peixe que possuem até 1% de gordura e 80% de umidade.

Uma das vantagens da metodologia de Bligh & Dyer é a capacidade de extrair tanto os lipídios neutros (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e esteróis) quanto os lipídios polares (ácidos graxos livres, fosfolipídios e esfingolipídios) de maneira eficiente (Iverson *et al.*, 2001).

Os lipídios polares estão ligados por força eletrostática e ligação de hidrogênio, assim solventes com características polares podem extraí-los. Já os lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares (Brum *et al.*, 2009).

Solventes utilizados para a extração de lipídios, principalmente de tecido animal, deve ter uma elevada solubilidade para todos os compostos lipídicos, sendo suficientemente polar para removê-los a partir de seus locais de ligação como as membranas celulares, lipoproteínas e glicolípidos (Manirakiza *et al.*, 2001).

Por essa razão a utilização de uma mistura binária de clorofórmio e metanol se torna bastante eficiente, e ao mesmo tempo leva a uma das principais desvantagens deste método devido a alta toxicidade dos solventes empregados (Brum *et al.*, 2009; Priego-Capote *et al.*, 2005).

Assim o grande desafio se torna continuar o desenvolvimento nas mais diversas áreas de pesquisa sem causar danos ao meio ambiente. Isso requer pesquisas no sentido de aprimorar os processos utilizados, tais como o de extração de lipídios, com o objetivo fundamental da geração cada vez menor de resíduos e efluentes tóxicos (Prado, 2003).

Este trabalho tem como objetivo substituir a mistura clorofórmio-metanol por hexano-acetona mantendo a eficiência da extração de lipídios polares e neutros.

2. Materiais e métodos

2.1. Amostragem

A sardinhas (*Sardinella brasiliensis*) foi escolhida para o desenvolvimento dessa nova metodologia, por apresentar quantidade de lipídios totais (LT) na mesma faixa do descrito pela metodologia de Bligh & Dyer (1959) utilizada como referência.

Foram adquiridos aproximadamente 2 kg de sardinhas em uma peixaria da região de Maringá. O couro e as espinhas foram separados do filé para se obter uma amostra homogênea. O filé foi então moído, até obtenção de uma pasta, sendo esta utilizada para as análises sem passar pelo processo de congelamento.

2.2. Extração de lipídios utilizando a metodologia de Bligh & Dyer

Na metodologia de Bligh & Dyer a extração é realizada com uma mistura de três solventes, clorofórmio, metanol e água na proporção de 2:2:1,8 respectivamente.

Para o desenvolvimento da metodologia foram utilizados para cada extração uma massa de $15 \pm 0,1$ g da amostra. A extração ocorreu em duas etapas, primeiramente o metanol (30 mL) e o clorofórmio (15 mL) foram adicionados à amostra, formando apenas uma fase, a mistura foi então agitada, utilizando agitador magnético, por 5 min, em seguida foram adicionados mais 15 mL de clorofórmio e agitado novamente por 2 min. Após esse período de agitação, a água foi adicionada




(15 mL) para que ocorresse a separação das fases, sendo a mistura agitada por mais 5 min. A mistura foi então transferida para um funil de separação, e após 24 horas coletou-se a fase inferior (clorofórmio).

2.3. Extração de lipídios empregando uma nova proposta

Nesta nova proposta, buscou-se substituir os solventes clorofórmio e metanol, empregados na metodologia de referência (Bligh & Dyer), por hexano e acetona, mantendo a água como terceiro solvente.

A Tabela 1 mostra a toxicidade dos solventes utilizados nos dois métodos, de acordo com o diagrama de Hommel.

Tabela 1. Toxicidade dos solventes utilizados na metodologia proposta e no método de Bligh & Dyer de acordo com o diagrama de Hommel.

	Metodologia proposta		Bligh & Dyer	
	Hexano	Acetona	Clorofórmio	Metanol
Riscos saúde 	1	1	2	3
Reatividade 	0	0	0	0
Inflamabilidade 	3	3	0	3
Riscos específicos	-	-	-	-

Primeiramente foi realizado um estudo do equilíbrio físico entre os três solventes (Figura 1), para que pudéssemos conhecer a proporção em que esses solventes permanecessem em um sistema monofásico.

A linha no diagrama representa o ponto de equilíbrio entre os três solventes (clorofórmio, metanol e água). Após traçada essa linha foram escolhidos pontos aleatórios que abrangesse o máximo possível das regiões do diagrama, sem, no entanto, elevar a quantidade de solvente.

Foram então escolhidos os pontos A, B, C e D, do diagrama (Figura 1). Em pontos além do D a quantidade de hexano adicionada seria inviável.

O volume inicial de água foi fixado em 12 mL, que corresponde aos 80 % de umidade presente na amostra, considerando uma massa de $15,0 \pm 0,1$ g pesada para

a extração. Só então foi calculado o volume de hexano e acetona da primeira fase da extração (Tabela 2). Para os cálculos foram considerados a densidade do hexano como $0,65 \text{ g mL}^{-1}$ e da acetona como $0,79 \text{ g mL}^{-1}$.

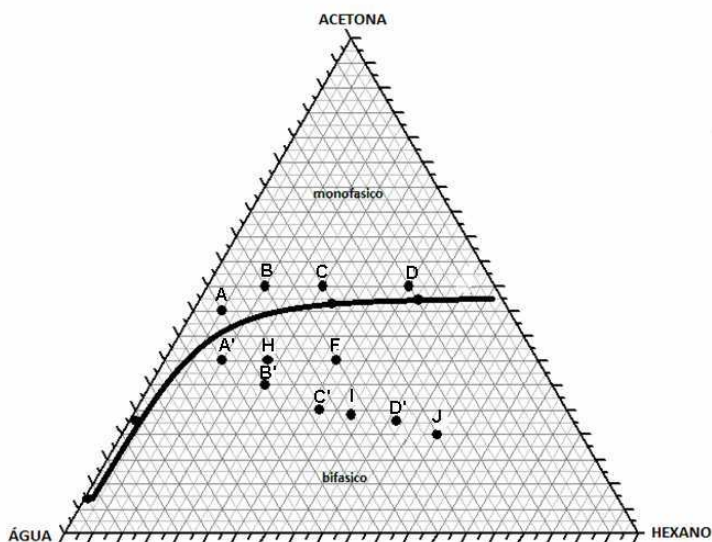


Figura 1. Diagrama de fase do hexano-acetona-água em % (m/m/m) a 25°C

Tabela 2. Volumes de clorofórmio metanol e água utilizados nos diferentes pontos escolhidos do diagrama de fases.

Experimentos	Primeira etapa Volume (mL)			Segunda etapa Volume (mL)	
	Hexano	Acetona	Água	Hexano	Água
A	2,0	14	12	3,0	5,0
B	5,0	19	12	11	13
C	12	25	12	27	22
D	43	51	12	110	48
F	16	15	12	-	-
H	5,0	11	12	-	-
I	18	10	12	-	-
J	40	33	12	-	-

Os pontos A' B' C' e D', são referentes a segunda fase da extração e estão abaixo da linha do diagrama (Figura 1) para que ocorresse a separação das fases. Esses pontos foram escolhidos aleatoriamente de forma que a separação das fases fosse eficiente.

Para o cálculo do volume dos solventes, nesses pontos, foi mantido a quantidade de acetona (referente a primeira etapa) fixo e dessa forma calculou-se o volume de água e hexano (Tabela 2).

Os pontos F, H, I e J foram realizados em apenas uma etapa em um sistema bifásico, estipulando também um valor fixo de 12 mL para a água e dessa forma calculando a quantidade necessária de hexano e acetona (Tabela 2).

O tempo de agitação total de cada ponto foi de 12 min, sendo que nos ensaios realizados em duas etapas (A, B, C e D) foi primeiramente adicionado os solventes referentes a primeira etapa, agitou-se a solução durante 5 min, acrescentou-se o volume de hexano referente a segunda etapa agitou-se por mais 2 min, após este tempo foi adicionado o volume de água também referente a segunda etapa e a mistura foi agitada por mais 5 min, para que ocorresse a separação da fases.

Já para os experimentos que foram realizados em apenas uma etapa foram acrescentados todos os solventes e agitou-se a mistura durante 12 min.

A mistura foi então filtrada e transferida para funil de separação. Após 3 horas coletou-se a fase hexânica (superior), que continha os LT. As análises de cada ponto foram realizadas em quadruplicata.

2.4. Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

A metilação dos ácidos graxos foi realizada segundo o método de Joseph & Ackman (1992) utilizando como reagente o trifluoreto de boro (BF_3) em metanol, Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás da marca Thermo, modelo trace ultra 3300, equipado com detector de ionização em chama e coluna capilar de sílica fundida CP - 7420 (Select FAME, 100 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de cianopropil/polisiloxano. O fluxo de H_2 (gás de arraste) foi de 1,2 mL min^{-1} , com 30 mL min^{-1} de N_2 (*make up*); e 35 e 300 mL min^{-1} , para o H_2 e ar sintético, respectivamente, para a chama do detector, O volume injetado foi de 2,0 μL , utilizando *split* 1:80, sendo as temperaturas do injetor 230°C e do detector 240°C. A rampa foi programada com a

temperatura inicial da coluna a 165°C durante 7,0 min, elevada a 185°C a uma taxa de 4°C min⁻¹, mantida por 4,67 min, foi elevada novamente a 235°C em uma taxa de 6,0°C min⁻¹ e mantida por 5,0 min, totalizando 30,0 min de corrida cromatográfica. Os tempos de retenção dos analitos e as porcentagens de área dos picos correspondentes foram obtidos através da integração pelo Software Chromquest versão 5.0. Os ácidos graxos foram identificados a partir da comparação de seus tempos de retenção com padrões SIGMA (USA) de composição conhecida.

A quantificação absoluta dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi realizada através da padronização interna, utilizando como padrão o metil éster do ácido tricosanóico (23:0), da marca SIGMA (USA), e os cálculos realizados segundo método de Joseph & Ackman (1992). Os valores do fator de correção teórico para o DIC (detector de ionização em chama) foram usados para a determinação dos valores de concentrações (Visentainer, 2012). O teor dos ácidos graxos nas amostras foram calculados em mg g⁻¹ de lipídios totais utilizando a Equação 1.

$$AG = \frac{A_X M_P F_{CT}}{A_P M_X F_{CAE}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: AG é a concentração em mg de ácidos graxos por g de lipídios totais, A_X é a área do pico (ácidos graxos), A_P é a área do pico do padrão interno (PI) metil éster do ácido tricosanóico (23:0), M_P é a massa do PI (em mg) adicionada à amostra, M_X é a massa da amostra (em mg), F_{CT} é o fator de correção teórico e F_{CAE} é o fator de conversão necessário para expressar os resultados em mg de ácidos graxos.

2.5. Separação de Classe

Os LT foram fracionados em lipídios neutros (LN) e lipídios polares (LP) usando cromatografia em coluna clássica.

O processo foi realizado em uma coluna de vidro com 30 cm de comprimento por 2 cm de diâmetro interno, contendo 25 g de sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) como adsorvente, de acordo com as especificações de Johnston *et. al.*, (1983).

A eluição das frações LN e LP foram realizados utilizando o método descrito por Maia & Rodriguez-Amaya (1992), com as seguintes sequências de eluição: Fração I - LN (200 mL de uma mistura de clorofórmio com 20 % de acetona), Fração II - LP (200 mL de metanol).

Os solventes de eluição foram removidos em evaporador rotativo sob vácuo a 32-34°C e com um fluxo de N₂, As frações foram transferidas para um frasco de vidro âmbar com capacidade de 7 mL e armazenadas a -18°C, para posterior análise cromatográfica.

2.6. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em quadruplicata. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com nível de significância de 5%, pelo programa Statistica 7.0 e as médias foram comparadas pelo Teste t. Os resultados de ácidos graxos do melhor ponto foram submetidos à Análise de Componentes Principais (PCA), utilizando o *software* Statistica 7.0, sendo que não foi necessário um pré-tratamento dos dados.

3. Resultados e discussão

3.1. Lipídios Totais

Nos experimentos relacionados à metodologia proposta, a separação das fases ocorreu mais rapidamente, em torno de 2 horas, enquanto que na metodologia de Bligh & Dyer o indicado pelo método, é um período de 24 horas para que ocorra uma boa separação das fases.

A quantidade de LT obtida do tecido muscular de sardinhas, em cada ponto do experimento, para a metodologia proposta e para o método de Bligh & Dyer estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3. Porcentagem de lipídios totais obtidos em cada ponto do diagrama de fases, e pela metodologia Bligh & Dyer.

Experimentos	Volume total (mL)	Lipídio total (g 100g ⁻¹)
A	36	0,72± 0,01
B	60	1,13±0,01
C	98	1,32±0,03
D	264	2,42±0,06
F	43	1,00±0,05
G	52	0,77±0,03
H	28	0,60±0,02
I	40	1,05±0,03
J	85	1,08±0,01
Bligh & Dyer	75	1,17±0,09

A quantidade de lipídios totais no tecido muscular de sardinhas, pode variar bastante de acordo com a mudança sazonal, fato esse típico de espécie pelágicas (Bandarra *et al.*, 1997).

Para minimizar esse erro foi utilizada a mesma amostragem para todos os pontos estudados do diagrama, garantido, dessa forma, que a variação percebida em cada ponto da Tabela 3, esteja relacionada com a variação da quantidade de solvente e as condições de extração.

Dentre os experimentos realizados em duas etapas o ponto D foi o que apresentou uma maior quantidade de LT (2,42±0,06 g 100g⁻¹), contudo o volume total de solvente utilizado nesse ponto foi de 264 mL, sendo que desse total 143 mL são de hexano. Dessa forma a utilização de um volume tão grande de solvente tornaria a metodologia inviável.

O ponto A, apesar de apresentar a menor quantidade de solvente, apresentou uma quantidade de LT em média 38% menor comparado a quantidade obtida pela metodologia Bligh & Dyer (1,17±0,09 g 100g⁻¹). Sendo os pontos B e C, os que mais se aproximaram a quantidade de LT obtido pela metodologia de referência.

Assim buscou-se estudar pontos ao redor dos pontos A e B que aumentassem a quantidade de LT sem elevar significativamente o volume de solvente utilizado. Contudo, nenhum ponto mostrou-se relevante.

Dessa forma o ponto B foi escolhido, para as determinações de ácidos graxos, por agregar uma baixa quantidade de solvente aliado a uma porcentagem de LT que não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$) pelo Teste t do resultado encontrado na metodologia de Bligh & Dyer.

Os pontos F a J, em que a extração foi realizada em apenas uma etapa (em um sistema bifásico) foram obtidos valores inferiores de lipídios totais. Confirmando assim, que a extração realizada primeiramente em um sistema monofásico e em sequência, um sistema bifásico, em que ocorre a separação das fases, é mais eficiente para a extração de LT. Essa mesma observação foi feita por Bligh & Dyer.

3.2. Análise de ácidos graxos

A análise da composição em ácidos graxos é de grande interesse em diversas áreas da pesquisa. Nesse sentido esse método, por ser realizado na temperatura ambiente, evita possíveis perdas de ácidos graxos por degradação, sendo possível submeter os lipídios obtidos por esse método a um estudo da composição em ácidos graxos (Manirakiza *et al.*, 2001).

Os Ácidos graxos podem ser encontrados em duas formas no interior do corpo: Lipídios de armazenamento (neutros), localizados no tecido adiposo ricos em triglicerídeos e Lipídios estruturais (polares) que são partes integrantes de biomembranas e, geralmente, são ricos em ácidos graxos poli-insaturados.

Assim a separação de lipídios em classes, (polar e neutra) é outra determinação importante para obter a real composição de ácidos graxos de cada fração (Muriel *et al.*, 2002).

Neste estudo a separação de classes foi realizada com intuito de verificar a eficiência da extração das duas classes de lipídios perante os dois métodos de extração.

A porcentagem de LT das frações neutra e polar, obtidas após a eluição dos solventes pela coluna, para o metodologia proposta foi de 48% e 34% respectivamente, enquanto que para o método de Bligh & Dyer os valores obtidos foram de 52% para a fração neutra e 28% correspondendo a fração polar. Dessa

forma o rendimento da partição foi em média 81%, indicando uma boa recuperação e poucas perdas durante o processo.

Bonafe *et al.*, 2011, utilizando coluna clássica, realizou a separação de lipídios em classes de algumas espécies marinhas, entre elas, lula (*Loligo plei*) e polvo (*Octopus Vulgaris*) e obteve para essas espécies uma porcentagem de lipídios na fração neutra e polar de 48% e 30% respectivamente para lula e 52% e 36% respectivamente para polvo.

Na Tabela 4 estão expressos os resultados obtidos para quantificação de ácidos graxos dos LT das frações neutra e polar, para os dois métodos.

Tabela 4. Composição de ácidos graxos (mg g^{-1} LT) das frações neutra e polar e total dos filés de sardinha submetidos a extração de LT pela metodologia proposta e pelo método de Bligh & Dyer

	Total		Fração Polar		Fração neutra	
	Novo método	Bligh & Dyer	Novo método	Bligh & Dyer	Novo método	Bligh & Dyer
12:0	40,33±1,58	39,41±0,85	10,71±0,31	7,60±0,62	30,85±1,20	28,96±1,23
14:0	10,86±0,59	10,63±0,23	2,92±0,08	3,98±0,03	7,65±0,23	10,78±0,21
16:0	239,42± 6,25	233,81±6,12	89,87±2,32	70,89±3,20	142,27±5,21	145,85±4,56
18:0	57,69±1,10	56,47±0,98	12,15±1,21	13,08±0,23	43,28±1,02	38,48±2,10
24:0	15,81±0,25	16,45±0,23	10,56±0,03	9,93±0,62	4,59±0,52	6,77±0,04
AGS	364,11± 6,57	356,78±6,28	157,34±2,55	130,88±3,92	201,51±5,51	207,44±4,73
16:1n-9	10,02±0,14	10,24±0,25	1,56±0,10	3,57±0,08	4,50±0,36	8,30±0,14
16:1n-7	26,75±0,17	27,10±0,32	6,22±0,30	3,74±0,11	14,87±0,21	24,40±1,20
16:1n-5	10,83±0,10	10,38±0,21	9,34±0,08	4,78±0,21	8,64±0,14	5,37±0,12
18:1n-9	42,59±1,02	50,90±2,01	8,49±0,42	15,33±0,08	22,15±1,06	37,90±1,04
18:1n-7	17,77±0,13	18,33±0,14	13,21±0,32	13,58±0,21	5,13±0,02	3,97±0,47
20:1n-9	8,57±0,15	8,12±0,52	1,56±0,12	2,02±0,05	3,56±0,08	5,35±0,08
24:1n-9	11,63±0,28	11,39±0,41	4,15±1,02	5,79±0,85	6,67±0,43	9,79±0,31
AGMI	128,15± 1,10	136,47±2,16	44,55±1,20	48,80± 0,92	65,53±1,22	95,08±1,69
18:2n-6	13,36±0,08	13,12±0,22	6,45±0,08	10,78±0,08	2,97±0,32	1,71±0,23
18:3n-3	8,72±0,05	8,47±0,80	2,76±0,03	3,19±0,02	5,58±0,64	5,21±0,11
20:3n-6	5,19± 0,02	5,68±0,02	0,67±0,09	1,46±0,11	2,42±0,12	3,39±0,12
20:4n-6(AA)	23,86±0,26	23,79±0,35	10,67±0,34	6,02±0,23	13,47±0,08	16,39±0,52
20:5n-3(EPA)	78,34±0,25	73,46±1,02	21,71±1,02	15,78±0,27	41,94±1,23	48,23±1,54
22:6n-3(DHA)	296,69±8,23	291,35±8,63	192,52±5,65	166,62±8,54	55,39±0,56	67,02±1,23
AGPI	426,14± 8,23	415,87± 8,34	232,79±5,75	203,86±8,56	127,76±1,53	141,95±2,05

AGS= Somatório de ácidos graxos saturados; AGMI= Somatório de ácidos graxos monoinsaturado; AGPI= Somatório de ácidos graxos poli-insaturado.

Para a análise de ácidos graxos sobre a quantidade de lipídios totais, o somatório de AGPI foi maior para os dois métodos seguidos do somatório de AGS e AGMI.

Essa mesma tendência foi observada por Bandarra et al., 1997 estudando o efeito sazonal sobre a composição de ácidos graxos de sardinha (*Sardina pilchardus*).

Na separação de classe os dois métodos seguiram a mesma tendência. Na fração neutra as maiores quantidades foram de AGS seguidas de AGPI e AGMI.

Em muitos casos, a composição de ácidos graxos pode variar de acordo com algumas condições ambientais, tais como o estágio de maturação dos peixes, temperatura da água do mar, qualidade lipídica da presa, entre outros (Guil-Guerrero et al., 2011; Ackman et al., 1980). Contudo os principais componentes da fração neutra são os AGS e AGMI tais como 16:0, 18:0 e 18:1n-9 (Saito, et al., 2005).

Para a fração polar, os dois métodos apresentaram quantidades de AGPI maiores, seguido de AGMI e AGS. Geralmente a fração polar é mais rica em ácidos graxos poli-insaturados, principalmente o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) (Saito, et al., 2005).

A quantidade recuperada de DHA para os dois métodos foi maior na fração polar representando em média mais de 60 % da quantidade total desses ácidos graxo nessa fração.

3.3. Análise de PCA (*Principal Components Analysis*)

A matriz de dados das variáveis analisadas, somatório de ácidos graxos saturados, poli-insaturados e monoinsaturados dos lipídios totais e das frações neutra e polar para o metodologia proposta e para o Bligh & Dyer, foi submetida a análise de PCA, cuja análise multivariada pode resumir a variabilidade de um conjunto de dados complexos apresentando de forma mais interpretável em componentes principais (PC) (Ribeiro et al., 2013; Silva et al., 2013).

A Figura 2 mostra que cerca de 100% da variância do conjunto de dados original é explicado. Assim, os dois componentes foram retidos nas análises de componentes principais para o somatório dos ácidos graxos.

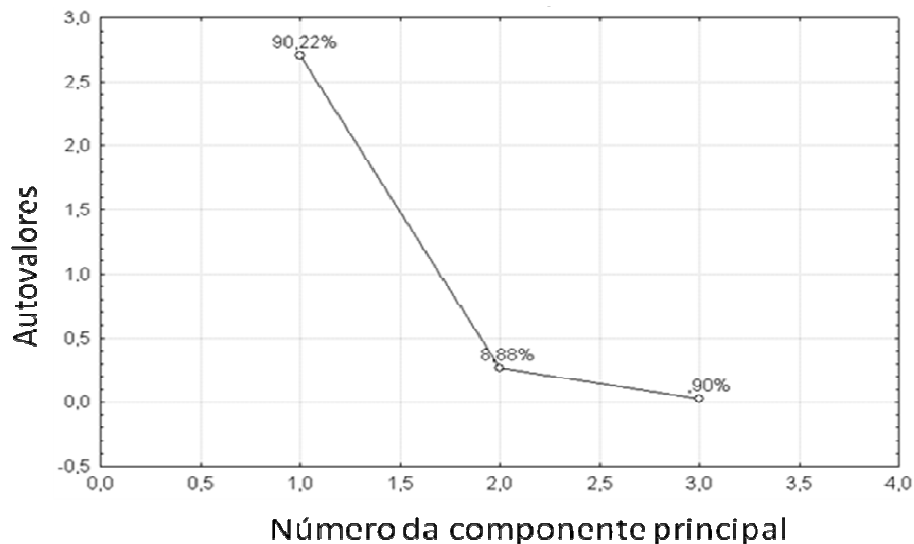


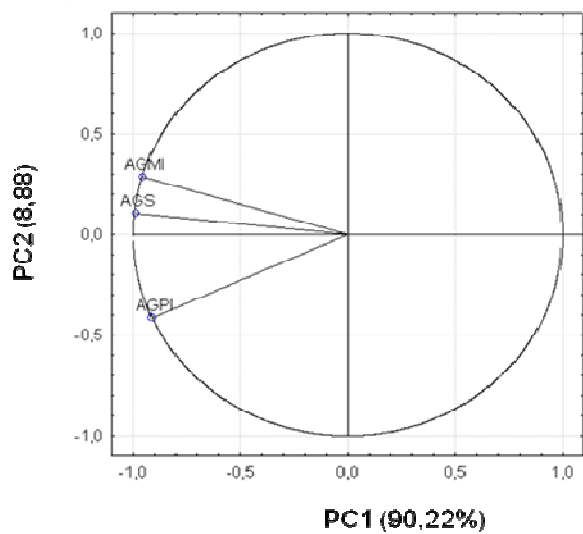
Figura 2. Percentual de variância explicada para a componente principal.

A primeira componente (PC1) explica 90,22% da variância total no conjunto de dados, sendo que os escores mais significativos para esta PC são o AGMI, AGPI e AGS (Figura 3A).

A segunda componente (PC2) está associada a 8,88% da variância total no conjunto de dados, sendo que o AGPI é o escore mais importante para PC2 (Figura 3A). Pois na composição da fração polar a concentração de AGPI é mais elevada que na fração neutra, em que AGS e AGMI são predominantes.

Na Figura 3B podemos observar que as frações polares e neutras, assim como os LT da metodologia proposta e do Bligh & Dyer, foram agrupadas próximos, indicando a similaridade entre os dois métodos.

(A)



(B)

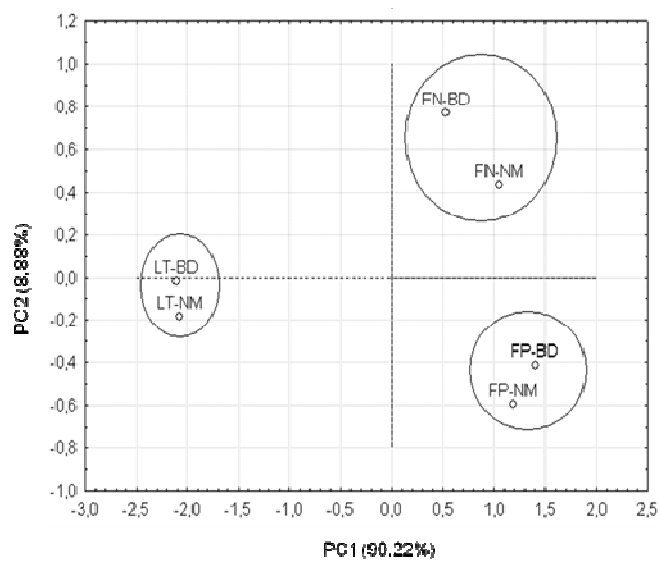


Figura 3. *Loading plot* PC1–PC2 (A), *Scores plot* PC1–PC2 (B) para o somatório de ácidos graxos da metodologia proposta e de Bligh & Dyer .

4. Conclusão

A utilização dos solventes hexano e acetona na extração de lipídios totais de tecido muscular de peixe se mostrou eficiente quando se utilizou uma proporção de 1:1,2:1,5 de hexano:acetona:água.

A viabilidade da nova metodologia é comprovada pela quantidade de lipídios totais obtida e pela composição de ácidos graxos na fração polar e neutra, comparáveis a metodologia de referência de Bligh & Dyer, observação que pode ser visualizada de maneira conclusiva nas análises de PCA.

5. Referências

Ackman, R. G., Sebedio, J. L., Kovacs, M. I. P. (1980). Role of Eicosenoic and Docosenoic Fatty acids in freshwater and marine lipids. *Marine Chemistry*, 9, 157-164.

Bandarra, N. M., Batista, I., Nunes, M. L., Empis, J. M., Christie, W. W. (1997). Seasonal changes in lipid composition of sardine (*Sardina pilchardus*). *Journal of Food Science*, 62, 40–42.

Bligh, E.G., Dyer, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification Canadian Journal of Biochemistry, 37, 911-917.

Bonafe, E., Aguiar, A., Boroski, M., Monteiro, J., Souza, N., Matsushita, M., Visentainer, J. (2011). Quantification of EPA and DHA in seafood of the south coast of Brasil. *Nutrition & Food Science*, 41, 401-411.

Brum, A. A. S., Arruda, L. F., Regitano-d`Arce, M. A. B. (2009). Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 4, 849-854.

Folch, J., Lees, M., Stanley, G. H. S., (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological chemistry*, 226, 497-509.

Guil-Guerrero, J. L., Venegas-Venegas E., Rincon-Cervera, M. A., Suárez, M. D., (2011). Fatty acid profiles of livers from selected marine fish species. *Journal of Food Composition and Analysis* 24, 217–222.

Iverson, S. J., Lang S.L.C., Cooper M. H. (2001). Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for the total lipid determination in broad range of marine tissue. *Lipids*, 36, 1283-1287.

Johnston, J.J., Ghanbari, H.A., Wheeler, W.B., Kirk, J.R. (1983). Characterization of shrimp lipids. *Journal of Food Science*, 48, 33-35.

Joseph, J. D., Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatography method for analysis of encapsulated fish oil and fish oil ethyl esters: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 75, 488-506.

Maia, E.L., Rodriguez-Amaya, D. B. (1992). Fatty acid composition of the total, neutral and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Colossoma macropomum*. *Food Sciences and Human Nutrition*, 7, 633-642.

Manirakiza, P., Covaci, A., Schepes, P. (2001). Comparative Study on Total Lipid Determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and Modified Bligh & Dyer Extraction Methods. *Journal of food composition and analysis*, 14, 93-100.

Muriel. E., Ruiz, J., Ventanas, J., Antequera, T. (2002). Free-range rearing increases (n-3) Polyunsaturated fatty acids of neutral and polar lipids in swine muscles. *Food Chemistry*, 78, 219-225.

Prado, A. G. S. (2003). Química Verde, os desafios da química do novo milênio. *Química Nova*, 5, 738-744.

Priego-Capote, F. Castro, M. D. L. (2005). Focused microwave-assisted Soxhlet extraction: a convincing alternative for total fat isolation from bakery products. *Talanta*, 65, 81-86.

Ramalhosa, M. J., Paíga, P., Morais, S., Alves, M. R., Delure-Matos, C., Oliveira, M. B. P. P. (2012). Lipid content of frozen fish: Comparison of different extraction methods and variability during freezing storage. *Food Chemistry*, 131, 328-336.

Ribeiro, A. B., Bonafé, E. G., Silva, B. C., Montanher, P. F., Santos, O. O., Boeing, J. S., Visentainer, J. V. (2013). Antioxidant Capacity, Total Phenolic Content, Fatty Acids and Correlation by Principal Component Analysis of Exotic and Native Fruits from Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 24, 797-804.

Saito, H., Seike, Y., Loka, H., Osako, K., Tanaka, M., Takashima, A., Keriko, J. M., Kose, S., Souza, J. C. R. (2005). High Docosahexaenoic Acid Levels in Both Neutral and Polar Lipids of a Highly Migratory Fish: *Thunnus tonggol* (Bleeker). *Lipids*, 40, 941-954.

Silva, B. C., Santos, H. M. C., Montanher, P. F., Boeing, J. S., Almeida, V. C., Visentainer, J. V. (2013). Incorporation of Omega-3 Fatty Acids in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed Chia (*Salvia hispanica* L.) Bran. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 429-437.

Soxhlet, F. (1879). Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes Dinglers *Polytechnisches Journal*, 232, 461.

Visentainer, J. V., (2012). Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. *Química Nova*, 35, 274-279.

Xiao, L., Mjos, S. A., Haugsgjerd, B. O. (2012). Efficiencies of three common lipid extraction methods evaluated by calculating mass balances of the fatty acids. *Journal of Food Composition and Analysis*, 25, 198-207.

Considerações Finais

De maneira geral as espécies de peixes marinhos estudados apresentaram níveis elevados de ácidos graxos poli-insaturados, principalmente EPA o DHA, além de boa capacidade antioxidante, sendo a cromatografia em fase gasosa acoplada ao detector de ionização em chama uma técnica satisfatória para essa determinação.

As tilápias do Nilo criadas em cativeiro adaptaram-se bem a ração suplementada com óleo de Chia e com o extrato etanólico da casca do abacate, melhorando sua qualidade lipídica, devido ao aumento da quantidade de LNA no filé, além de um aumento na capacidade antioxidante.

O Método desenvolvido para a análise de lipídios totais em tecidos muscular de peixes, empregando os solventes hexano e acetona, foi satisfatório tanto na extração de lipídios neutros quanto de polares.