



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

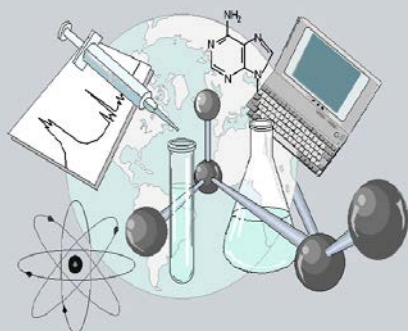
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO LIPÍDICA E DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE EM FILÉS DE TILÁPIAS DO NILO (*Oreochromis niloticus*) ALIMENTADAS COM DIFERENTES FONTES DE ÁCIDOS GRAXOS E ANTIOXIDANTES”**

Dissertação apresentada por **FABIANA CARBONERA** 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 Mestra em Química

**CEE**



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, FEVEREIRO/2014**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Avaliação da composição lipídica e da capacidade antioxidante em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de ácidos graxos e antioxidantes”**

Dissertação apresentada por **Fabiana Carbonera** ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer**

Maringá, Fevereiro de 2014.

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

C264a Carbonera, Fabiana  
Avaliação da composição lipídica e da capacidade antioxidante em filés de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de ácidos graxos e antioxidantes / Fabiana Carbonera. -- Maringá, 2014.  
106 f. : color., figs., tabs.

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

1. Tilápia. 2. Ômega-3. 3. Ácidos graxos conjugados. 4. Capacidade antioxidante. 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 23.ed. 639.3774

AHS-2872



**Universidade Estadual de Maringá**

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

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por **Fabiana Carbonera**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 20 de fevereiro de 2014.

**COMISSÃO JULGADORA:**

Prof. Dr. Jesus Vergilio Visentainer  
Presidente - DQI/UEM

Prof. Dr. Elton Guntendorfer Bonafe  
Membro - UTFPR

Profa. Dra. Liane Maldaner  
Membro - DQI/UEM

## **Agradecimentos**

A Deus, por me iluminar em todo o meu caminho e por me dar perseverança e dedicação em todos esses anos.

Aos meus pais, Carlos Roberto e Valdira, e ao meu irmão, Fernando, pela dedicação e por me apoiarem e me incentivarem em todas as minhas decisões.

Aos meus avós, tios e primos, em especial, à minha tia Lena e aos meus avós Thereza e Santo, por terem acompanhado com tanto carinho minha jornada até aqui.

Ao meu namorado Sylvio pelo carinho, paciência e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Jesuí Vergílio Visentainer, pela orientação e conhecimentos compartilhados.

À Universidade Estadual de Maringá e ao Programa de Pós-Graduação em Química, pela oportunidade de realização do mestrado.

A todos os professores do curso de Pós-Graduação, por todo conhecimento adquirido. E, em especial, ao Prof. Dr. Makoto Matsushita por toda ajuda e dedicação.

Aos amigos do CromAlimentos e APLE-A, em especial, Paula, Ingrid, Hevelyse, Joana, Érica, Bia, Polyana, Thiago, Swami e Oscar por toda atenção, companheirismo, aprendizado e principalmente pela amizade e momentos de alegria.

Ao técnico de laboratório André pelo empréstimo de materiais.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação, Claudemir e Cris, pela atenção e presteza.

À CAPES pelo apoio financeiro e a empresa Wacker Química do Brasil Ltda pela gentileza em fornecer a  $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho, muito obrigada.

## Resumo

O objetivo desse estudo foi avaliar a incorporação de ácidos graxos poli-insaturados e conjugados nos filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), especificamente o ácido alfa-linolênico (LNA) da série ômega-3 e os isômeros dos ácidos linoleico conjugado (CLA) e linolênico conjugado (CLnA), por meio da suplementação da dieta fornecida aos peixes com óleo de chia (fonte do LNA), concentrado de CLA (fonte dos isômeros do CLA) e óleo de tungue (fonte dos isômeros do CLnA). Além disso, a capacidade antioxidante dos filés de tilápia resultantes da alimentação com ração suplementada contendo substâncias que apresentam propriedade antioxidante, como a vitamina E, selênio e extrato etanólico de resíduo de acerola, também foi avaliada. O experimento foi realizado no laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Química, da Universidade Estadual de Maringá, no período de setembro a dezembro de 2012. Um total de 240 tilápias foram distribuídas em três tanques plásticos com fluxo contínuo de água e oxigenação constante. As tilápias passaram 30 dias em adaptação recebendo a ração Controle, contendo óleo de girassol como fonte lipídica, para a obtenção do tempo zero (0 dias de suplementação). Após esse período foram incluídos separadamente os diferentes tratamentos: Tratamento I (óleo de chia + óleo de tungue + CLA + vitamina E), Tratamento II (óleo de chia + óleo de tungue + CLA + vitamina E + selênio) e Tratamento III (óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola) ao longo de 60 dias de experimento. Novas amostragens foram realizadas nos períodos de 15, 30, 45 e 60 dias de suplementação, coletando-se 15 peixes/tanque. Foram avaliadas a composição proximal e em ácidos graxos de todas as rações desenvolvidas, bem como a capacidade antioxidante das mesmas. Nos filés das tilápias dos diferentes tratamentos foram identificados e quantificados os ácidos graxos em todos os períodos de suplementação (0, 15, 30, 45 e 60 dias) e também avaliada a capacidade antioxidante por meio dos ensaios DPPH, FRAP, ABTS e ORAC<sub>FL</sub>. Não houve diferença

significativa ( $p > 0,05$ ) entre as rações para os resultados de composição proximal. A composição em ácidos graxos das rações confirmou a transferência dos ácidos graxos de interesse, LNA e isômeros do CLA e CLnA, nas rações TI e TII e também alta quantidade de ácido linoleico (LA) nas rações Controle e TIII, proveniente do óleo de girassol. Os ensaios de capacidade antioxidante indicaram maiores resultados nas rações TI e TIII e mostraram a superioridade de contribuição dos antioxidantes hidrofílicos na capacidade antioxidante total (CAT) das rações. Nos filés dos Tratamentos I e II, foi observado um aumento de aproximadamente 3 vezes no teor de LNA, devido a adição de óleo de chia a essas rações. A inclusão de concentrado de CLA às rações TI e TII resultou na incorporação dos isômeros 18:2*c*9, *t*11 e 18:2*t*10, *c*12 nos filés das tilápias em níveis superiores aos encontrados naturalmente em produtos lácteos e carne de ruminantes. Foi verificada a incorporação dos ácidos linolênico conjugados nos filés dos Tratamentos I e II, com predominância de transferência do isômero alfa-ESA (ácido alfa-eleosteárico), proveniente do óleo de tungue adicionado às rações TI e TII. Nos filés do Tratamento III foi observada a ocorrência em altos níveis do LA e também do ácido araquidônico (AA), importante ácido graxo poli-insaturado de cadeia longa (AGPI-CL). A aplicação dos ensaios de determinação da capacidade antioxidante nas amostras de filé confirmou a superioridade das rações TI e TIII na contribuição do melhoramento da capacidade antioxidante da carne do pescado. Dessa forma, a suplementação mostrou-se uma boa opção para melhorar o valor nutricional do filé do pescado, contribuindo para o enriquecimento da composição lipídica e da capacidade antioxidante do mesmo, promovendo um melhor produto para o consumo humano.

**Palavras-chave:** Tilápia. Ômega-3. Ácidos graxos conjugados. Capacidade antioxidante.

## Abstract

The aim of this study was to evaluate the incorporation of polyunsaturated and conjugated fatty acids in tilapia fillets (*Oreochromis niloticus*), specifically alpha-linolenic acid (LNA) from the omega-3 series and isomers of conjugated linoleic acid (CLA) and conjugated linolenic acid (CLnA), through the supplementation of tilapia diet with chia oil (a source of LNA), concentrated of CLA (a source of CLA isomers) and tung oil (a source of CLnA isomers). Furthermore, the antioxidant capacity in tilapia fillets resulting from supplemented feeding diet containing substances which have antioxidant properties such as vitamin E, selenium and ethanolic extract of acerola fruit residue, was also evaluated. The experiment was conducted in the laboratory of Food Chemistry, Department of Chemistry of State University of Maringa, from September to December 2012. A total of 240 Nile tilapia were divided into three plastic tanks with continuous water flow and constant oxygenation. The fish spent 30 days in adaptation receiving the Control diet containing sunflower oil as the lipid source in order to obtain the zero time sample (0 days of supplementation). After this period, the different treatments were included separately: Treatment I (chia oil + tung oil + CLA + vitamin E), Treatment II (chia oil + tung oil + CLA + vitamin E + selenium) and Treatment III (sunflower oil + ethanolic extract of acerola fruit residue) during 60 days of experiment. New samples were taken at 15, 30, 45 and 60 days of supplementation, by collecting 15 fish/tank. The proximate and fatty acid compositions of all developed diets were evaluated, as well as the antioxidant capacity. In tilapia fillets from the different treatments, the fatty acids were identified and quantified in all periods of supplementation (0, 15, 30, 45 and 60 days) and the antioxidant capacity was also evaluated through the employment of DPPH, FRAP, ABTS and ORAC<sub>FL</sub> assays. There was no significant difference ( $p>0.05$ ) among the diets for the results of proximate composition. The fatty acid composition of the diets confirmed the transfer of the interest fatty



acids, LNA and the isomers of CLA and CLnA, to TI and TII diets, as well as high amounts of linoleic acid (LA) in the Control and TIII diets, coming from the sunflower oil. The antioxidant capacity assays indicated better results in TI and TIII diets, and also showed the superiority of contribution of hydrophilic antioxidants in the total antioxidant capacity (TAC) of the diets. In fillets from the Treatments I and II were observed an increase of about 3 times in the content of LNA due to the addition of chia oil to these diets. The inclusion of concentrated of CLA to TI and TII diets resulted in the incorporation of the 18:2*c*9, *t*11 and 18:2*t*10, *c*12 isomers in tilapia fillets at higher levels than found naturally in dairy products and in meat from ruminant animals. The incorporation of conjugated linolenic acids was observed in fillets from the Treatments I and II, with a predominance of the alpha-ESA (alpha-eleostearic acid) isomer transfer, derived from tung oil added to the TI and TII diets. In fillets from the Treatment III, high levels of LA and arachidonic acid (AA), an important polyunsaturated long chain fatty acid (PUFA-LC), were verified. The application of the antioxidant capacity assays in fillet samples confirmed the superiority of TI and TIII diets in improving the antioxidant capacity of the fish. Thus, supplementation showed to be a good option for improving the nutritional value of fish fillet, contributing to the enrichment of lipid composition and antioxidant capacity of it, promoting a better product for human consumption.

**Keywords:** Tilapia. Omega-3. Conjugated fatty acids. Antioxidant capacity.

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Ilustração da tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). .....	22
<b>Figura 2.</b> Representação da molécula de um triacilglicerol. ....	23
<b>Figura 3.</b> Estruturas de ácidos graxos. (a) Ácidos graxos saturados (ácido esteárico, 18:0); (b) Ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico, 18:1n-9); (c) Ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico, 18:2n-6). .....	24
<b>Figura 4.</b> Isômeros geométricos ( <i>trans</i> e <i>cis</i> ) do ácido oleico (18:1n-9).....	25
<b>Figura 5.</b> Conversão dos ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3 em ácidos graxos de cadeia longa e síntese de leucotrienos (Lt), prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) a partir dos ácidos 20:4n-6 e 20:5n-3 com enzimas lipoxigenase (LOX) e ciclo-oxigenase (COX).....	27
<b>Figura 6.</b> Via alternativa para a bioconversão de ácidos graxos em peixes. ....	28
<b>Figura 7.</b> Chia ( <i>Salvia hispanica</i> L.). .....	32
<b>Figura 8.</b> Estruturas químicas dos isômeros do ácido eleosteárico (ESA). (a) alfa-ESA (18:3c9, t11, t13); (b) beta-ESA (18:3t9, t11, t13). ....	33
<b>Figura 9.</b> Produção de ácido linoleico conjugado (CLA) em ruminantes. ....	35
<b>Figura 10.</b> Estruturas químicas dos isômeros predominantes do ácido linoleico conjugado (CLA). (a) 18:2c9, t11; (b) 18:2t10, c12. ....	35
<b>Figura 11.</b> Estrutura química da molécula de $\alpha$ -tocoferol. ....	38
<b>Figura 12.</b> Redução do radical livre DPPH pela quercetina. ....	42
<b>Figura 13.</b> Redução do complexo férrico $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$ a ferroso $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$ pela ação de um antioxidante. ....	43
<b>Figura 14.</b> Reação do radical ABTS na presença de um composto antioxidante.....	44
<b>Figura 15.</b> Reação de decomposição térmica do azo-composto 2,2'-azobis-(2-amidino-propano) dihidroclorato (AAPH). ....	45

<b>Figura 16.</b> Representação da atuação dos antioxidantes na proteção do ataque dos radicais peroxila à fluoresceína.....	46
<b>Figura 17.</b> Fluxograma simplificado do delineamento experimental utilizado.....	51
<b>Figura 18.</b> Ganho de massa e crescimento das tilápias após 60 dias de confinamento.....	65

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Formulações das rações utilizadas nos diferentes tratamentos (% em massa) .....	49
<b>Tabela 2.</b> Composição proximal (g 100 g <sup>-1</sup> de ração) e em ácidos graxos (mg de ácido graxo g <sup>-1</sup> de lipídios totais) das rações dos tratamentos Controle, TI, TII e TIII .....	61
<b>Tabela 3.</b> Capacidade antioxidante das rações dos tratamentos Controle, TI, TII e TIII determinada por diferentes ensaios (μmol ET g <sup>-1</sup> ) .....	63
<b>Tabela 4.</b> Composição em ácidos graxos (mg de ácido graxo g <sup>-1</sup> de lipídios totais) dos filés de tilápia nos diferentes tempos de confinamento (Tratamento I) .....	67
<b>Tabela 5.</b> Composição em ácidos graxos (mg de ácido graxo g <sup>-1</sup> de lipídios totais) dos filés de tilápia nos diferentes tempos de confinamento (Tratamento II).....	68
<b>Tabela 6.</b> Composição em ácidos graxos (mg de ácido graxo g <sup>-1</sup> de lipídios totais) dos filés de tilápia nos diferentes tempos de confinamento (Tratamento III) .....	72
<b>Tabela 7.</b> Qualidade nutricional da fração lipídica dos filés determinada a partir dos índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT) e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH).....	74
<b>Tabela 8.</b> Capacidade antioxidante dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio DPPH (μmol ET g <sup>-1</sup> ).....	76
<b>Tabela 9.</b> Capacidade antioxidante dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio FRAP (μmol ET g <sup>-1</sup> ).....	77
<b>Tabela 10.</b> Capacidade antioxidante dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ABTS (μmol ET g <sup>-1</sup> ).....	78
<b>Tabela 11.</b> Capacidade antioxidante das frações hidrofílicas (H-ORAC <sub>FL</sub> ) dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ORAC <sub>FL</sub> (μmol ET g <sup>-1</sup> ) .....	78

<b>Tabela 12.</b> Capacidade antioxidante das frações lipofílicas (L-ORAC <sub>FL</sub> ) dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ORAC <sub>FL</sub> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).....	79
<b>Tabela 13.</b> Capacidade antioxidante total dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ORAC <sub>FL</sub> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).....	80

## Lista de Abreviaturas e Siglas

AA - ácido araquidônico

AAPH - 2,2'-azobis-(2-amidino-propano) dihidroclorato

ABTS - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

AGI - ácidos graxos insaturados

AGMI - ácidos graxos monoinsaturados

AGPI - ácidos graxos poli-insaturados

AGPI-CL - ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa

AGPI n-3 - ácidos graxos poli-insaturados ômega-3

AGS - ácidos graxos saturados

alfa-ESA - ácido alfa-eleosteárico

AO - antioxidante

AUC - área abaixo da curva (*Area Under the Curve*)

beta-ESA - ácido beta-eleosteárico

CAT - capacidade antioxidante total

CLA - ácido linoleico conjugado (*Conjugated Linoleic Acid*)

CLnA - ácido linolênico conjugado (*Conjugated Linolenic Acid*)

COX - enzima ciclo-oxigenase

DHA - ácido docosahexaenoico

DIC - detector de ionização em chama

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EMAG - ésteres metílicos de ácidos graxos

EPA - ácido eicosapentaenoico

ERN - espécies reativas de nitrogênio

ERO - espécies reativas de oxigênio

ET - equivalente Trolox

FL - fluoresceína

FRAP - poder de redução férrico (*Ferric Reducing Ability Power*)

GSH-Px - enzima glutationa-peroxidase

HH - razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos

H-ORAC<sub>FL</sub> - fração hidrofílica do ensaio ORAC<sub>FL</sub>

IA - índice de aterogenicidade

IT - índice de trombogenicidade

LA - ácido linoleico (*Linoleic Acid*)

LNA - ácido alfa-linolênico (*Linolenic Acid*)

L-ORAC<sub>FL</sub> - fração lipofílica do ensaio ORAC<sub>FL</sub>

LOX - enzima lipoxigenase

Lt - leucotrienos

LT - lipídios totais

n-3 - ácidos graxos da série ômega-3

n-6 - ácidos graxos da série ômega-6

n-9 - ácidos graxos da série ômega-9

ORAC<sub>FL</sub> - capacidade de absorbância do radical de oxigênio (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*)

PG - prostaglandinas

QUENCHER - **QU**ick, **E**asy, **N**ew, **CHE**ap, **R**e producible

RMCD - β-ciclodextrina metilada aleatoriamente (*Randomly methylated β-cyclodextrin*)

Se - selênio

TAG - triacilgliceróis

TAH - transferência de átomo de hidrogênio

TE - transferência de elétron

TPTZ - 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina

TX - tromboxanos



## Sumário

<b>1. Introdução</b> .....	17
<b>2. Revisão Bibliográfica</b> .....	21
<b>2.1. Aquicultura</b> .....	21
<b>2.2. Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)</b> .....	21
<b>2.3. Óleos e Gorduras</b> .....	23
<b>2.4. Ácidos Graxos Ômega-3 e Ômega-6</b> .....	25
<b>2.5. Metabolismo de Ácidos Graxos em Peixes</b> .....	28
<b>2.6. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos</b> .....	29
<b>2.7. Óleo de Chia (<i>Salvia hispanica</i> L.)</b> .....	31
<b>2.8. Óleo de Tungue (<i>Aleurites fordii</i>)</b> .....	33
<b>2.9. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)</b> .....	34
<b>2.10. Antioxidantes</b> .....	36
<b>2.11. Vitamina E</b> .....	37
<b>2.12. Selênio</b> .....	39
<b>2.13. Resíduo de Acerola (<i>Malpighia emarginata</i> DC.)</b> .....	40
<b>2.14. Ensaio Utilizados para Determinar a Capacidade Antioxidante</b> .....	41
<b>2.14.1. Ensaio DPPH</b> .....	41
<b>2.14.2. Ensaio FRAP</b> .....	42
<b>2.14.3. Ensaio ABTS</b> .....	43
<b>2.14.4. Procedimento QUENCHER</b> .....	44
<b>2.14.5. Ensaio ORAC<sub>FL</sub></b> .....	45
<b>3. Objetivos</b> .....	47
<b>3.1. Objetivo Geral</b> .....	47
<b>3.2. Objetivos Específicos</b> .....	47
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	48

<b>4.1. Preparo das Rações</b> .....	48
<b>4.2. Sistema de Confinamento e Preparo das Amostras de Peixe</b> .....	50
<b>4.3. Preparo do Extrato Etanólico de Resíduo de Acerola</b> .....	51
<b>4.4. Determinação da Composição Proximal das Rações</b> .....	52
<b>4.5. Extração e Derivatização dos Lipídios Totais</b> .....	52
<b>4.6. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos</b> .....	53
<b>4.7. Determinação da Capacidade Antioxidante</b> .....	54
<b>4.7.1. Ensaio de Capacidade Antioxidante Seguindo Procedimento QUENCHER</b> .....	54
<b>4.7.1.1. Preparo da Solução de DPPH</b> .....	55
<b>4.7.1.2. Preparo da Solução de FRAP</b> .....	55
<b>4.7.1.3. Preparo da Solução de ABTS</b> .....	55
<b>4.7.1.4. Procedimento QUENCHER</b> .....	56
<b>4.7.2. Capacidade Antioxidante Determinada pelo Ensaio ORAC<sub>FL</sub></b> .....	56
<b>4.7.2.1. Preparo dos Extratos Lipofílicos (L-ORAC<sub>FL</sub>) do Ensaio ORAC<sub>FL</sub></b> .....	57
<b>4.7.2.2. Preparo dos Extratos Hidrofílicos (H-ORAC<sub>FL</sub>) do Ensaio ORAC<sub>FL</sub></b> .....	57
<b>4.7.2.3. Ensaio ORAC<sub>FL</sub></b> .....	58
<b>4.8. Análises Estatísticas</b> .....	59
<b>5. Resultados e Discussão</b> .....	60
<b>5.1. Rações Formuladas</b> .....	60
<b>5.1.1. Composição Proximal e em Ácidos Graxos</b> .....	60
<b>5.1.2. Capacidade Antioxidante</b> .....	63
<b>5.2. Filés de Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)</b> .....	65
<b>5.2.1. Crescimento e Ganho de Massa</b> .....	65
<b>5.2.2. Composição em Ácidos Graxos</b> .....	66
<b>5.2.3. Índices de Qualidade Nutricional</b> .....	73
<b>5.2.4. Capacidade Antioxidante</b> .....	75

<b>6. Conclusões</b> .....	82
<b>Referências</b> .....	84
<b>APÊNDICE A</b> - Cromatograma representativo do óleo de chia ( <i>Salvia hispanica</i> L.) .....	96
<b>APÊNDICE B</b> - Cromatograma representativo do óleo de tungue ( <i>Aleurites fordii</i> ) .....	96
<b>APÊNDICE C</b> - Cromatograma representativo do concentrado de ácido linoleico conjugado (CLA) .....	97
<b>APÊNDICE D</b> - Fatores de correção utilizados no cálculo de concentrações de ácidos graxos em mg de ácido graxo g <sup>-1</sup> de lipídios totais em relação ao padrão interno tricosenoato de metila .....	98
<b>APÊNDICE E</b> - Cromatograma representativo da ração Controle .....	99
<b>APÊNDICE F</b> - Cromatograma representativo da ração do Tratamento I (TI) .....	99
<b>APÊNDICE G</b> - Cromatograma representativo da ração do Tratamento II (TII) .....	100
<b>APÊNDICE H</b> - Cromatograma representativo da ração do Tratamento III (TIII) .....	100
<b>APÊNDICE I</b> - Cromatograma representativo do filé de tilápia obtido no tempo zero (T0) de suplementação .....	101
<b>APÊNDICE J</b> - Cromatogramas representativos dos filés de tilápia do Tratamento I nos períodos de (A) 15 dias, (B) 30 dias, (C) 45 dias e (D) 60 dias de suplementação .....	102
<b>APÊNDICE K</b> - Variações de resposta dos ácidos graxos de suplementação nos filés de tilápia ao longo do fornecimento da ração do Tratamento I (TI) .....	103
<b>APÊNDICE L</b> - Cromatogramas representativos dos filés de tilápia do Tratamento II nos períodos de (A) 15 dias, (B) 30 dias, (C) 45 dias e (D) 60 dias de suplementação .....	104
<b>APÊNDICE M</b> - Variações de resposta dos ácidos graxos de suplementação nos filés de tilápia ao longo do fornecimento da ração do Tratamento II (TII) .....	105
<b>APÊNDICE N</b> - Cromatogramas representativos dos filés de tilápia do Tratamento III nos períodos de (A) 15 dias, (B) 30 dias, (C) 45 dias e (D) 60 dias de suplementação .....	106

## 1. Introdução

Entre os setores da produção animal, a aquicultura é o que se expande mais rapidamente, respondendo pela produção de aproximadamente 50% dos peixes consumidos no mundo (FAO, 2012). Nesse contexto, o Brasil se destaca como um dos países com maior potencial para o crescimento da aquicultura, visto que a produção aquícola nacional foi de 479.399 t no ano de 2010 (MPA, 2012).

No Brasil, a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), originária da África, é o peixe de água doce mais cultivado em sistemas de aquicultura (Santos, Furuya, Silva, Matsushita & Castro Silva, 2011). Essa espécie destaca-se por apresentar crescimento rápido e rusticidade e também carne de ótima qualidade (Boscolo, Signor, Coldebella, Bueno & Feiden, 2010), o que a torna uma espécie de grande interesse para a piscicultura. No entanto, quando comparados com os peixes de origem marinha, estes peixes de água doce, incluindo a tilápia, possuem baixo conteúdo dos ácidos graxos da série ômega-3 (n-3) (Visentainer, Souza, Makoto, Hayashi & Franco, 2005; Justi, Hayashi, Visentainer, Souza & Matsushita, 2003).

A série de ácidos graxos ômega-3 é semelhante à série ômega-6, pois ambas possuem precursores estritamente essenciais, o ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3) para a série n-3 e o ácido linoleico (LA, 18:2n-6) para a série n-6, devendo ser adquiridos através da dieta (Aguiar et al., 2011). A essencialidade se dá pelo fato do organismo humano não produzir as enzimas  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$  dessaturases, responsáveis pela síntese do LNA e LA (Barilli, 2009).

Os peixes, assim como os seres humanos, não apresentam as enzimas  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$  dessaturases em seu metabolismo. Dessa forma, não são capazes de sintetizar os ácidos graxos estritamente essenciais alfa-linolênico e linoleico. Portanto, os peixes devem obtê-los através da alimentação e, endogenamente sintetizar ácidos graxos essenciais de 20 e 22 átomos de carbono pela ação de enzimas elongases e dessaturases (Tocher, 2003).

Uma importância nutricional tem sido atribuída principalmente aos ácidos graxos da família ômega-3, isso porque a ingestão dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI n-3) está relacionada com a diminuição da taxa de colesterol no sangue, com a redução de doenças cardiovasculares, psoríase, artrite e câncer (Justi et al., 2003; Dubois, Breton, Linder, Fanni & Parmentier, 2007). Dessa forma, observa-se um aumento nas pesquisas sobre possíveis fontes desses ácidos graxos, com o intuito de elevar o teor de ácidos graxos ômega-3 no tecido muscular de peixes cultivados a partir da dieta fornecida ao pescado (Visentainer et al., 2005; Justi et al., 2003; Tonial, Stevanato, Matsushita, Souza, Furuya & Visentainer, 2009; Ng, Chong, Wang & Romano, 2013), a fim de obter-se uma alternativa para o aumento da ingestão de AGPI (n-3) na dieta humana (Valenzuela & Uauy, 1999).

A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) vem se demonstrando uma fonte promissora de ômega-3. Originária do México e norte da Guatemala (Martínez, Marín, Faller, Revol, Penci & Ribotta, 2012), apresenta alto teor de óleo, cerca de 25-38%. O óleo de chia é uma fonte dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico (18:2n-6; 17-26%) e alfa-linolênico (18:3n-3; até 68%) (Ayerza & Coates, 2000; Ayerza, 1995). Além disso, apresenta compostos com capacidade antioxidante, como tocoferóis (238-427 mg/kg) e polifenóis, sendo os principais compostos fenólicos, os ácidos clorogênico e cafeico, seguido por miricetina, quercetina e kaempferol (Ixtaina et al., 2011).

Outro grupo de ácidos graxos que desempenham papel nutricional importante é o dos ácidos linolênico conjugado (CLnA) e linoleico conjugado (CLA). O óleo de tungue, oriundo da semente da árvore de tungue (*Aleurites fordii*), nativo da América Central e China Ocidental (Roche, 2009), é reconhecido por apresentar os isômeros do CLnA, principalmente o ácido eleostearico (alfa-ESA = 18:3c9, t11, t13 e beta-ESA = 18:3t9, t11, t13) (Shinohara et al., 2012; Saha, Patra & Ghosh, 2012). O CLnA tem três insaturações conjugadas e foi recentemente relacionado com os isômeros do CLA, devido aos seus efeitos citotóxicos em tumores de

humanos, à inibição da carcinogênese e a alterações no metabolismo dos lipídios (Suzuki, Noguchi, Ota, Abe, Miyashita & Kawada, 2001). Dessa forma há um crescente interesse em estudos envolvendo este ácido graxo conjugado.

O ácido linoleico conjugado (CLA) é composto por um grupo de isômeros conjugados geométricos e posicionais do ácido linoleico (18:2n-6) que são encontrados naturalmente apenas em carne de ruminantes e produtos lácteos (Degen, Ecker, Piegholdt, Liebisch, Schmitz & Jahreis, 2011). A forma primária encontrada nesses produtos é apenas o *cis*-9, *trans*-11. Entretanto, sinteticamente, é possível obter o CLA com os isômeros predominantes *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 (Pariza, Park & Cook, 2001). O CLA atua na prevenção da arteriosclerose, como agente anticancerígeno e na resposta imune em humanos, assim como na redução dos lipídios corporais (Santos, Furuya, Silva, Michelato & Matsushita, 2009). Considerando o baixo consumo de CLA, encontrado somente em produtos derivados de ruminantes, a suplementação de CLA em dietas para peixes visa também aumentar as fontes desses ácidos graxos em produtos destinados ao consumo humano.

Outra característica nutricional que tem despertado muito interesse atualmente é o emprego de substâncias com capacidade antioxidante nos alimentos. Com isso, substâncias naturais como a vitamina E têm sido utilizadas pela indústria alimentícia como antioxidantes naturais, pois além dessa função é ainda um componente essencial ao organismo animal.

Vitamina E é a denominação genérica de oito compostos lipossolúveis, cada um dos quais com atividades biológicas específicas, sendo o  $\alpha$ -tocoferol o mais potente antioxidante (Batista, Costa & Pinheiro-Sant'Ana, 2007). A função de maior importância da vitamina E é a atuação como antioxidante *in vivo*, protegendo os lipídios dos tecidos do ataque dos radicais livres (Morrissey, Buckley & Sheehy, 1994). Sendo a oxidação lipídica a mais relevante alteração química do pescado (Nunes, Batista & Cardoso, 2007), a utilização de antioxidantes,

como a vitamina E na dieta, é uma alternativa para retardar os efeitos oxidativos e inibir a peroxidação dos ácidos graxos insaturados *in vivo* (Morrissey et al., 1994).

Para aumentar a estabilidade oxidativa, cofatores como o selênio (Se), são adicionados à dieta dos animais de cultivo, melhorando a qualidade da carne, tornando-a menos susceptível aos danos causados pela oxidação (Downs, Hess & Bilgili, 2000). O Se é um micro mineral essencial na nutrição humana e animal, incluindo os peixes (Watanabe, Kiron & Satoh, 1997). Além de proteger as células contra o processo oxidativo e prevenir a ocorrência de doenças metabólicas e infecciosas, possui importante papel nas selenoenzimas como a glutathiona-peroxidase (GSH-Px). Além disso, atuando em conjunto com a vitamina E provoca um efeito aditivo na prevenção da peroxidação dos lipídios de membrana (Watanabe et al., 1997).

Outras fontes potenciais de substâncias que retardam os efeitos oxidativos são as frutas, com especial destaque à acerola (*Malpighia emarginata* DC.), que apresenta elevados teores de polifenóis, carotenóides e vitamina C (Lima, Mélo, Maciel, Prazeres, Musser & Lima, 2005; Vendramini & Trugo, 2004; Mezdri, Pérez-Gálvez & Hornero-Méndez, 2005). Além do consumo em sua forma *in natura*, a acerola também é utilizada industrialmente, na produção de sucos concentrados, geleias, polpas e extratos, gerando resíduos (sementes e cascas), que quando descartados inadequadamente causam problemas ambientais (Oliveira et al., 2009a; Babbar, Oberoi, Uppal & Patil, 2011). Porém, de acordo com Oliveira et al. (2009a) tais resíduos também possuem compostos com capacidade antioxidante, o que permite o uso em produtos alimentícios para o homem e para animais.

Considerando que a composição química da carne de peixes cultivados é afetada de forma geral pela dieta fornecida ao pescado, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito da suplementação de dietas para tilápias do Nilo com diferentes fontes de ácidos graxos e antioxidantes sobre a composição lipídica e a capacidade antioxidante dos filés, ao longo de um período de 60 dias.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1. Aquicultura**

Entre os setores da produção animal, a aquicultura é o que se expande mais rapidamente, respondendo pela produção de aproximadamente 50% dos peixes consumidos no mundo (FAO, 2012). Aquicultura refere-se ao cultivo de organismos cujo ciclo de vida em condições naturais se dá total ou parcialmente em meio aquático, podendo ser tanto continental (água doce) como marinha (água salgada). Essa técnica de cultivo é praticada pelo ser humano há milhares de anos, existindo registros de que os chineses tinham conhecimentos sobre estas técnicas há muitos séculos e de que os egípcios criavam a tilápia há cerca de quatro mil anos (MPA, 2012).

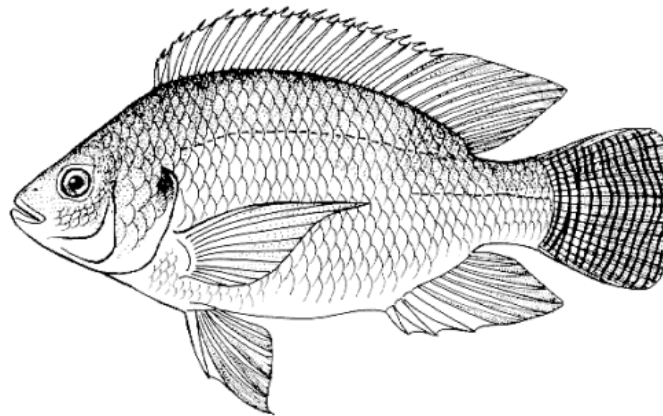
O Brasil se destaca como um dos países com maior potencial para o crescimento da aquicultura, sendo crescente a demanda mundial por alimentos de origem aquática, não apenas em função da expansão populacional, mas também pela preferência por alimentos mais saudáveis (Queiroz, Lourenço & Kitamura, 2002). Em 2010, a produção aquícola nacional foi de 479.399 t, sendo a maior parcela oriunda da aquicultura continental, na qual se destaca a piscicultura continental que representou 82,3% da produção total nacional. A Região Sul foi a que assinalou a maior produção de pescado do país, com 133.425,1 t, respondendo por 33,8% da produção nacional nesta modalidade, sendo o Paraná responsável pela produção de 35.811,1 t (MPA, 2012).

### **2.2. Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)**

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) (Figura 1), procedente da Costa do Marfim, África (Castagnolli, 1992), foi introduzida no Brasil em 1971 pelo DNOCS (Departamento



Nacional de Obras Contra a Seca) e se adaptou de maneira satisfatória às condições climáticas encontradas (Souza, Baccarin, Viegas & Kronka, 2004), recebendo esse nome por ser originária da bacia do Nilo (Nova, Godoy & Aldrigue, 2005).



**Figura 1.** Ilustração da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

No Brasil, a tilápia do Nilo é o peixe de água doce mais cultivado em sistemas de aquicultura (Santos et al., 2011), sendo responsável por aproximadamente 40% da produção total nacional nessa modalidade (MPA, 2012). A nível mundial, a tilápia ocupa o quarto lugar em produção, sendo que no ano de 2010 foram produzidos mais de 3 milhões de toneladas dessa espécie (FAO, 2012).

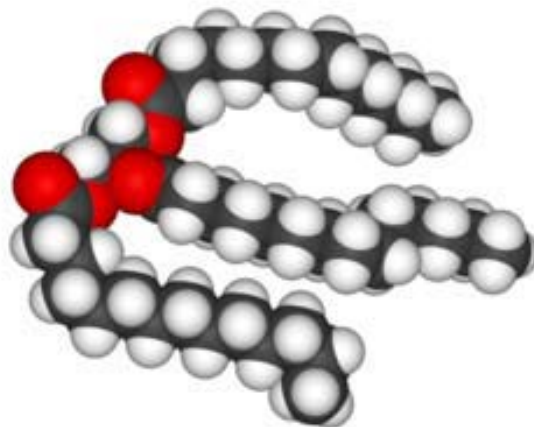
Essa espécie destaca-se por apresentar crescimento rápido e rusticidade. Apresenta carne de ótima qualidade, sendo apropriada para a indústria de filetagem, por não apresentar espinhos em "y" em seu filé (Boscolo et al., 2010). Além disso, a tilápia do Nilo apresenta boa aceitação e elevado valor comercial, excelente conversão alimentar e, conseqüentemente, custos de produção relativamente baixos (Moraes, Seiffert, Tavares & Fracalossi, 2009), o que a torna uma espécie de grande interesse para a piscicultura.

No entanto, quando comparados com os peixes de origem marinha, estes peixes de água doce, incluindo a tilápia, apresentam baixo conteúdo dos ácidos graxos alfa-linolênico (LNA,

18:3n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) e de outros ácidos graxos da série ômega-3 (n-3) (Visentainer et al., 2005; Justi et al., 2003). Com isso, diversos estudos estão sendo realizados com o intuito de aumentar o teor de ácidos graxos ômega-3 no tecido muscular de peixes cultivados a partir da dieta fornecida ao pescado (Visentainer et al., 2005; Justi et al., 2003; Tonial et al., 2009; Ng et al., 2013).

### 2.3. Óleos e Gorduras

Óleos e gorduras consistem principalmente de moléculas de triacilgliceróis (TAG), as quais são constituídas de três ácidos graxos, que variam com a extensão da cadeia carbônica, número, orientação e posição das ligações duplas (Meher, Dharmagadda & Naik, 2006), ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol (Figura 2) (Geris, Santos, Amaral, Maia, Castro & Carvalho, 2007).

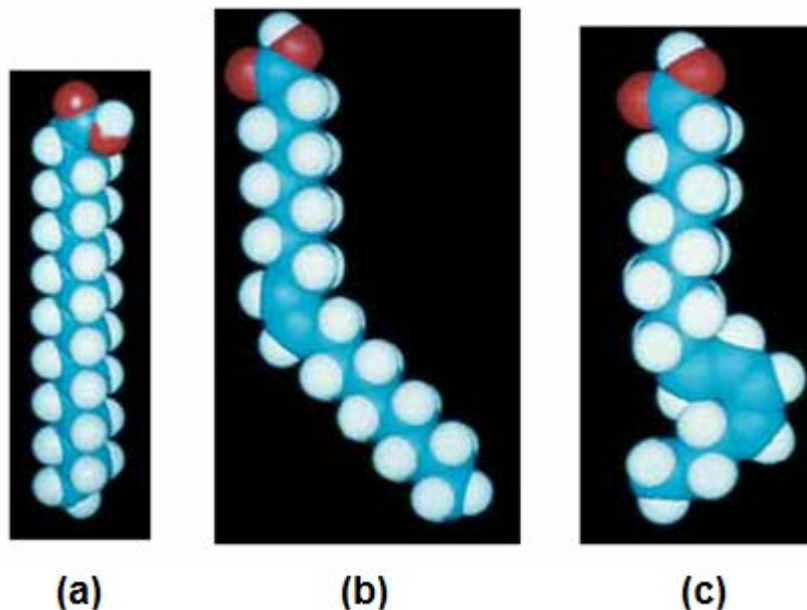


**Figura 2.** Representação da molécula de um triacilglicerol.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, classificados de acordo com o comprimento da cadeia carbônica, em ácidos graxos de cadeia curta (< 8 carbonos), média (8 a 16 carbonos)

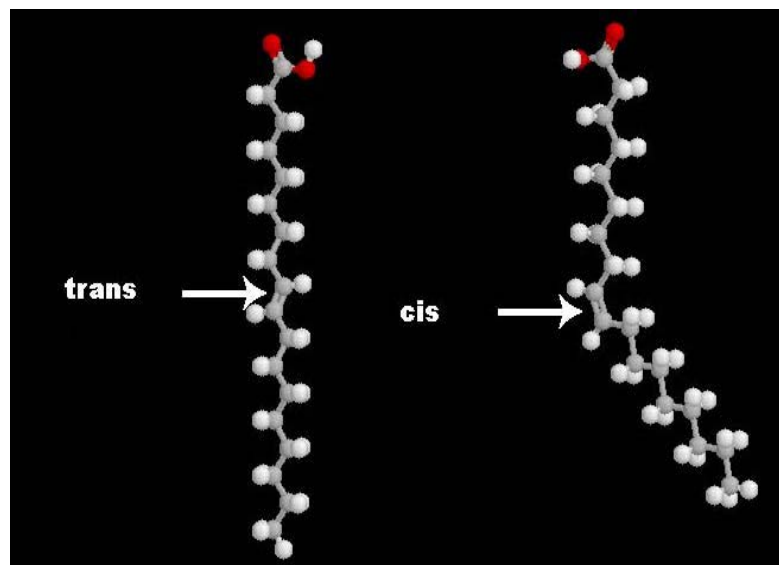
e longa ( $\geq 18$  carbonos); de acordo com as insaturações, em saturado (sem insaturações), monoinsaturado (uma insaturação) e poli-insaturado (duas ou mais insaturações) (Figura 3) e de acordo com as ramificações, podendo ser iso e anteiso (Fennema, 1996).

Os ácidos graxos saturados (AGS) apresentam uma conformação linear, flexível em estado de menor energia quando comparado com os ácidos graxos insaturados (AGI), que apresentam dobramentos na cadeia carbônica e uma angulação de 30 graus por dupla ligação presente. Este comportamento permite maior interação entre as moléculas de AGS, aumentando o ponto de fusão, quando comparado às moléculas de AGI que devido à presença de duplas ligações, apresentam interações intermoleculares menos eficientes (Curi, Pompéia, Miyasaka & Procopio, 2002).



**Figura 3.** Estruturas de ácidos graxos. (a) Ácidos graxos saturados (ácido esteárico, 18:0); (b) Ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico, 18:1n-9); (c) Ácidos graxos poli-insaturados (ácido linoleico, 18:2n-6).

As insaturações na cadeia carbônica dos ácidos graxos podem levar a ocorrência de isomeria na configuração *cis* ou *trans* (Souza & Visentainer, 2006) (Figura 4). A configuração *trans* promove um aumento na linearidade da cadeia carbônica que favorece as interações intermoleculares, tornando as propriedades físicas destes compostos semelhantes a dos AGS (Christie, 1989). A configuração *cis*, mesmo sendo termodinamicamente desfavorável, é predominante no reino animal e vegetal (Sommerfeld, 1983).



**Figura 4.** Isômeros geométricos (*trans* e *cis*) do ácido oleico (18:1n-9).

#### 2.4. Ácidos Graxos Ômega-3 e Ômega-6

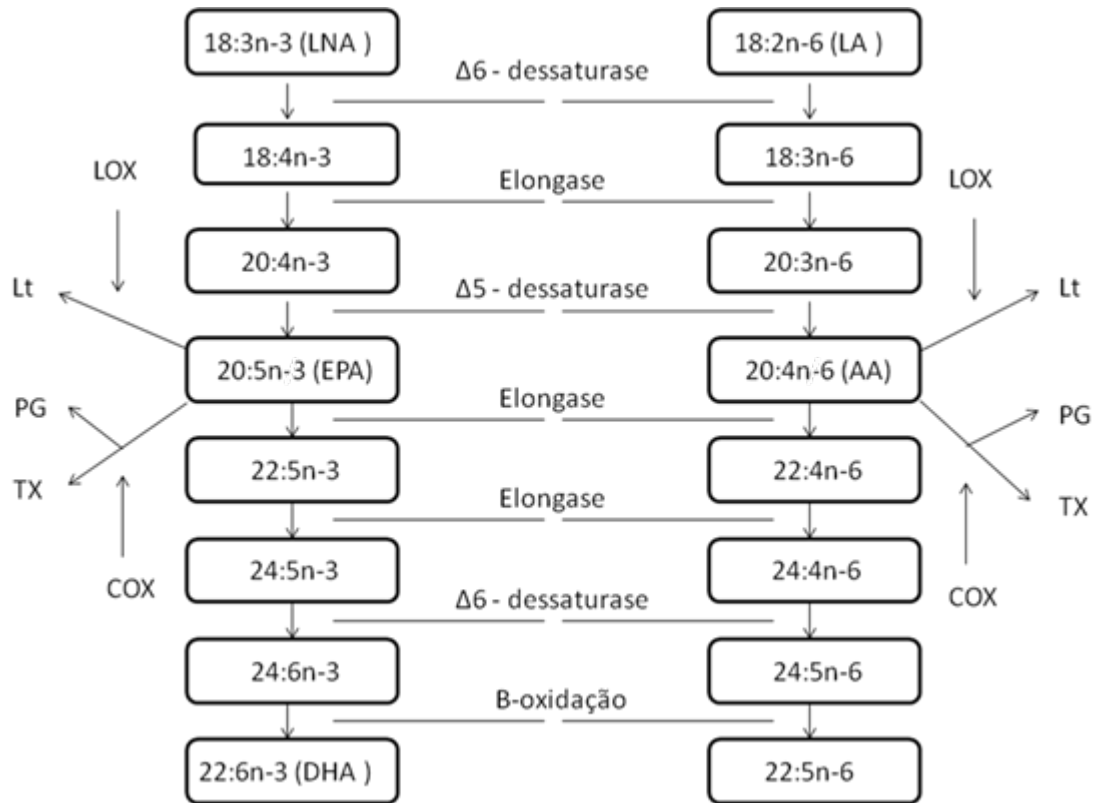
As duas séries de ácidos graxos, ômega-3 e ômega-6, compreendem os mais importantes ácidos graxos poli-insaturados (AGPI), incluindo os ácidos com duas ou mais duplas ligações e cadeia contendo 18 ou mais átomos de carbono (Barilli, 2009). Essas duas séries são semelhantes, pois ambas possuem um precursor, o ácido alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3) para a série n-3 e o ácido linoleico (LA, 18:2n-6) para a série n-6, sendo que ambos são ácidos graxos estritamente essenciais, portanto, devem ser adquiridos através da dieta alimentar (Aguiar et

al., 2011). A essencialidade se dá pelo fato do organismo humano não produzir as enzimas  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$  dessaturases, responsáveis pela síntese do LNA e LA (Barilli, 2009).

Os ácidos graxos das séries n-3 e n-6 podem ser considerados de séries “nobres”, pois os ácidos graxos n-3 não podem ser transformados em membros da série n-6, e vice-versa, devido à inclusão de uma dupla ligação pela  $\Delta$ -dessaturase e a inclusão de dois átomos de carbono pela enzima elongase ocorrer entre a carboxila e a primeira dupla da cadeia carbônica do ácido graxo. Dessa forma, a posição da dupla ligação em relação ao grupo metil terminal da cadeia carbônica não é alterada (Tocher, 2003).

Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), como o ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3), tem importância no crescimento e desenvolvimento funcional do cérebro em bebês e é necessário para a manutenção da função cerebral normal em adultos, além de sua inclusão na dieta melhorar a capacidade de aprendizagem (Horrocks & Yeo, 1999). O ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) é precursor de eicosanoides, substâncias que atuam nos processos anti-inflamatórios, antitrombóticos, anti-hipertensivos e antiarrítmicos (Dubois et al., 2007).

A Figura 5 apresenta uma representação do metabolismo dos ácidos graxos essenciais das séries n-3 e n-6 que ocorre no retículo endoplasmático. Durante o processo de alongação e dessaturação as mesmas enzimas são compartilhadas para síntese de ácidos graxos de cadeia longa, como o ácido araquidônico (AA, 20:4n-6) e eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), precursores de eicosanoides (Dubois et al., 2007). Deste modo, existe uma competição entre os ácidos graxos das séries n-3 e n-6 por essas enzimas, sendo que o excesso de um determinado ácido graxo afeta diretamente no metabolismo do outro. Consequentemente, a produção de eicosanoides, que são leucotrienos, tromboxanos e prostaglandinas, também é alterada (Brody, 1999).

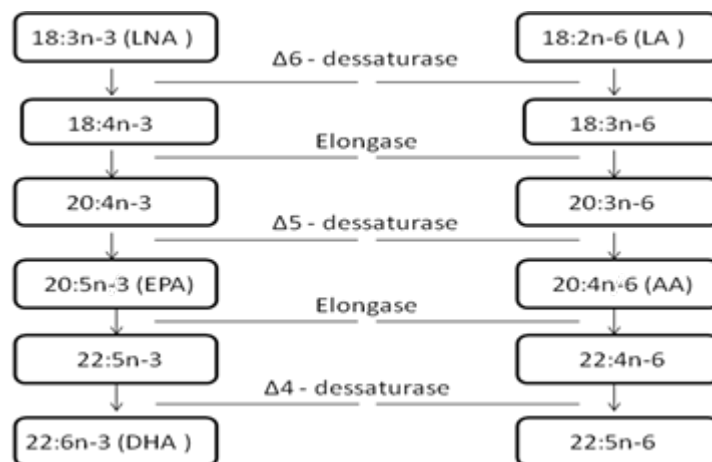


**Figura 5.** Conversão dos ácidos 18:2n-6 e 18:3n-3 em ácidos graxos de cadeia longa e síntese de leucotrienos (Lt), prostaglandinas (PG) e tromboxanos (TX) a partir dos ácidos 20:4n-6 e 20:5n-3 com enzimas lipoxigenase (LOX) e ciclo-oxigenase (COX). Fonte: (Dubois et al., 2007).

O entendimento do metabolismo é necessário, pois o equilíbrio na ingestão de ambos os ácidos graxos n-3 e n-6 é essencial para uma dieta saudável devido às duas séries de ácidos graxos fornecerem efeitos antagônicos. Enquanto a série n-3 apresenta funções anti-inflamatórias, antitrombóticas e anti-hipertensivas, o excesso de ácidos graxos da série n-6 gera processos inflamatórios, trombose, hipertensão e metabólitos arrítmicos (Abeywardena & Head, 2001).

## 2.5. Metabolismo de Ácidos Graxos em Peixes

Os peixes, assim como os seres humanos, não apresentam as enzimas  $\Delta^{12}$  e  $\Delta^{15}$  dessaturases em seu metabolismo. Dessa forma, não são capazes de sintetizar os ácidos graxos estritamente essenciais alfa-linolênico (LNA) e linoleico (LA) (Tocher, 2003). Portanto, os peixes devem obtê-los através da alimentação e, endogenamente sintetizar ácidos graxos essenciais de 20 e 22 átomos de carbono através da atuação das enzimas elongases e dessaturases (Tocher, 2003). As elongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis* (Martin et al., 2006; Monroig, Webb, Ibarra-Castro, Holt & Tocher, 2011), conforme ilustrado na Figura 6.



**Figura 6.** Via alternativa para a bioconversão de ácidos graxos em peixes.

Os ácidos graxos saturados (AGS), além de serem obtidos através da dieta, podem ser sintetizados a partir de fontes não lipídicas pela síntese *de novo*. No entanto, a síntese *de novo* dos saturados é inversamente proporcional aos níveis de ácidos graxos saturados obtidos através da dieta (Henderson & Tocher, 1987), ou seja, quanto maior a quantidade ingerida, menor será

a sintetizada e vice-versa. Os ácidos graxos monoinsaturados (AGMI) podem ter suas origens em função da dieta lipídica ou serem sintetizados pela  $\Delta^9$  dessaturase a partir de um ácido graxo saturado, sendo possível sintetizar apenas o ácido oleico (18:1n-9), um precursor da série n-9.

## 2.6. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

Os primeiros estudos com cromatografia foram realizados pelo botânico russo Mikhail Semenovich Tswett em 1906. O termo cromatografia deriva das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphie* (escrever), embora ele tenha explicitado que o processo não depende da cor, exceto para facilitar a identificação dos componentes separados (Collins, Braga & Bonato, 2006).

Com a expansão da cromatografia surgiu a cromatografia em fase gasosa, onde a fase móvel líquida utilizada para transportar a amostra pela coluna foi substituída por uma fase móvel gasosa denominada de gás de arraste. As primeiras colunas utilizadas na cromatografia em fase gasosa foram as colunas empacotadas, que apresentavam normalmente de 1 a 3 metros de comprimento e de 2 a 4 mm de diâmetro interno. Estas colunas apresentavam baixa eficiência na separação, devido ao baixo número de pratos teóricos (Tvrzická, Vecka, Stanková & Zák, 2002).

A eficiência da separação foi melhorada a partir da introdução das colunas capilares por Golay em 1958, que por apresentarem grande número de pratos teóricos, possuem maior eficiência e promovem resultados mais precisos devido a melhor resolução (Collins et al., 2006; Freedman, Kwolek & Pryde, 1986). Atualmente as colunas capilares mais usadas variam de 50 a 100 metros de comprimento e o número de pratos teóricos é suficiente para promover resolução cromatográfica adequada para separar misturas de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) complexos (Seppanen-Laakso, Laakso & Hiltunen, 2002). A separação dos EMAG pode ser realizada em três diferentes tipos de coluna, com fase estacionária apolar, polar e muito



polar (Christie, 1989), que são as quimicamente ligadas, sendo estas as mais utilizadas devido a maior resistência da fase estacionária e maior estabilidade térmica, resultando no aumento do tempo de vida útil da coluna (Milinski, 2007).

A cromatografia em fase gasosa tem ocupado lugar de destaque entre os métodos de análises pela facilidade e eficiência de executar a separação dos diferentes componentes lipídicos de uma mistura, sendo acoplada a detectores, que auxiliam na identificação e quantificação absoluta dos constituintes. No entanto, é um método que exige substâncias estáveis à temperatura durante a análise cromatográfica e o analito deve ser volátil ou apresentar derivados voláteis, como nas análises de lipídios. Neste caso, o preparo dos ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) é feito através da reação de derivatização, conhecida como transesterificação, convertendo os ésteres de alto ponto de ebulição, como triacilgliceróis, a outro éster de ponto de ebulição inferior, como os EMAG (Zara, 2008).

O detector de ionização de chama (DIC) é o mais conveniente e usado nas análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos pelo baixo custo, alta eficiência, resposta rápida, grande faixa de linearidade, resposta quase universal e alta sensibilidade, aproximadamente  $10^{-12}$  g (Craske & Bannon, 1987). No entanto, a identificação dos compostos utilizando o DIC não pode ser conclusiva. Para aumentar a eficiência desta identificação, utiliza-se a adição de padrão “*spiking*”, utilização de padrão secundário, métodos gráficos e índices sistemáticos de retenção.

No Brasil, os trabalhos realizados nas análises de EMAG para alimentos, normalmente utilizam o método da normalização de área, onde os resultados são expressos em porcentagem de área relativa (Visentainer & Franco, 2012; Tarley, Visentainer, Matsushita & Souza, 2004). Nesse método, todos os componentes da amostra devem ser detectados e, na ocorrência de omissão ou estimativa de um componente, a área dos demais componentes é afetada. Além disso, os resultados apresentados por este método apresentam dificuldades de interpretação (Aguilar et al., 2011).

Trabalhos recentes expressam os resultados em quantidade absoluta, ou seja, concentrações em massa de EMAG por massa de matéria-prima ou de amostra. É um dos melhores métodos para quantificação de ácidos graxos, pois fornece resultados confiáveis que são facilmente interpretados, proporcionando resultados com maior exatidão permitindo comparações com trabalhos que utilizam técnicas modernas de quantificação. Com isso, o uso de padrão interno vem se destacando, uma vez que permite quantificar os analitos de interesse bem como minimizar erros experimentais (Visentainer et al., 2012).

O uso da metodologia de padrão interno requer alguns requisitos como a substância não poderá fazer parte da amostra, deverá apresentar alto grau de pureza, ser acessível e de baixo custo, além de não coeluir com componentes da amostra, mas ao mesmo tempo, eluir próximo a eles (Brondz, 2002; Visentainer et al., 2012; Visentainer, 2012). Como os ésteres metílicos de ácidos graxos respondem diferencialmente no DIC, é necessário utilizar fatores de correção para os ésteres metílicos em relação ao padrão interno, que também é um éster. Os fatores utilizados são o fator de correção experimental ou empírico ( $F_{CEA}$ ), cujo valor é determinado experimentalmente e o fator de correção teórico ( $F_{CT}$ ), determinado teoricamente, a partir do número de carbonos ativos ( $C^*$ ), sendo que ambos os fatores são obtidos baseando-se em comparações entre ésteres metílicos analisados e o padrão interno (Visentainer et al., 2012).

## **2.7. Óleo de Chia (*Salvia hispanica* L.)**

A semente de chia (*Salvia hispanica* L.) (Figura 7) vem se demonstrando uma fonte promissora de ômega-3. Originária do México e norte da Guatemala (Martínez et al., 2012), apresenta alto teor de óleo, cerca de 25-38%.



**Figura 7.** Chia (*Salvia hispanica* L.).

A chia se torna cada vez mais importante para a saúde e nutrição humana pelos efeitos benéficos que podem surgir a partir de sua ingestão. Entre estes efeitos benéficos, pode-se destacar: controle do peso corporal, controle nos níveis de glicemia, melhora no perfil lipídico, entre outros. Assim, sua ingestão pode auxiliar na redução de doenças como obesidade, diabetes, hipertensão arterial e outras doenças cardiovasculares (Ayerza & Coates, 2005a; Ayerza & Coates, 2007).

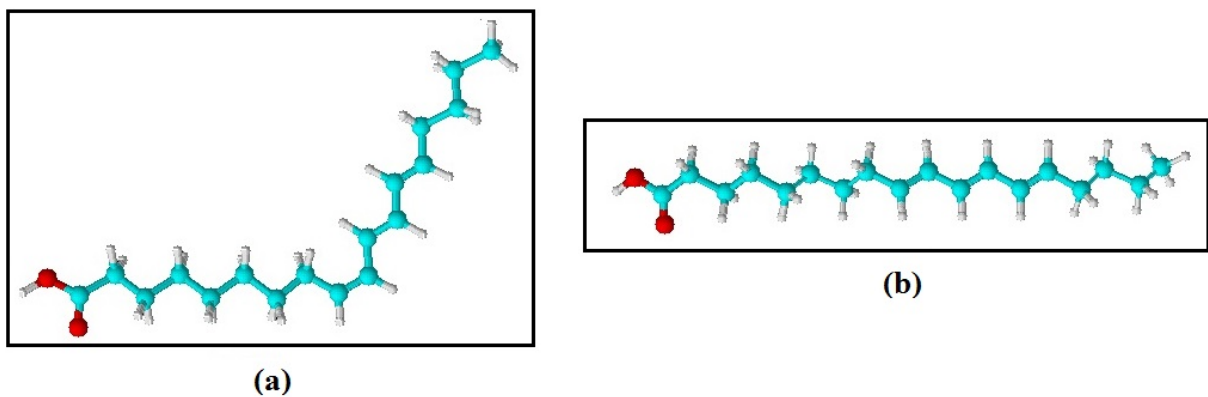
Os benefícios da ingestão da chia podem ser associados às substâncias presentes em seu óleo. O óleo de chia é uma fonte dos ácidos graxos poli-insaturados linoleico (18:2n-6; 17-26%) e alfa-linolênico (18:3n-3; até 68%) (Ayerza et al., 2000; Ayerza, 1995) (APÊNDICE A). Além disso, apresenta compostos com capacidade antioxidante, como tocoferóis (238-427 mg/kg) e polifenóis, sendo os principais compostos fenólicos, os ácidos clorogênico e cafeico, seguido por miricetina, quercetina e kaempferol (Ixtaina et al., 2011).

Estudos recentes mostram que é possível utilizar óleo de chia, na alimentação de animais, com o objetivo de obter produtos de origem animal enriquecidos com AGPI (Peiretti & Meineri, 2008). As sementes e o óleo de chia têm sido utilizados com sucesso no incremento do teor de ácidos graxos n-3 em produtos de origem animal, como ovos, carne de aves e de coelhos e leite de vaca, reduzindo o teor de ácidos graxos saturados e os valores de razão n-6/n-

3 desses alimentos (Ayerza et al., 2007). Além disso, o efeito da alimentação com óleo de chia na redução do conteúdo de triacilgliceróis e na elevação dos níveis das lipoproteínas de alta densidade (*High Density Lipoproteins* - HDL) no plasma de ratos foram reportados por Ayerza & Coates (2005b).

## 2.8. Óleo de Tungue (*Aleurites fordii*)

O óleo de tungue, oriundo da semente da árvore de tungue (*Aleurites fordii*), nativa da América Central e China Ocidental (Roche, 2009), é reconhecido por apresentar os isômeros do ácido linolênico conjugado (CLnA), principalmente o ácido eleosteárico (alfa-ESA = 18:3*c*9, *t*11, *t*13 e beta-ESA = 18:3*t*9, *t*11, *t*13) (Figura 8) (Shinohara et al., 2012; Saha et al., 2012) (APÊNDICE B).



**Figura 8.** Estruturas químicas dos isômeros do ácido eleosteárico (ESA). (a) alfa-ESA (18:3*c*9, *t*11, *t*13); (b) beta-ESA (18:3*t*9, *t*11, *t*13).

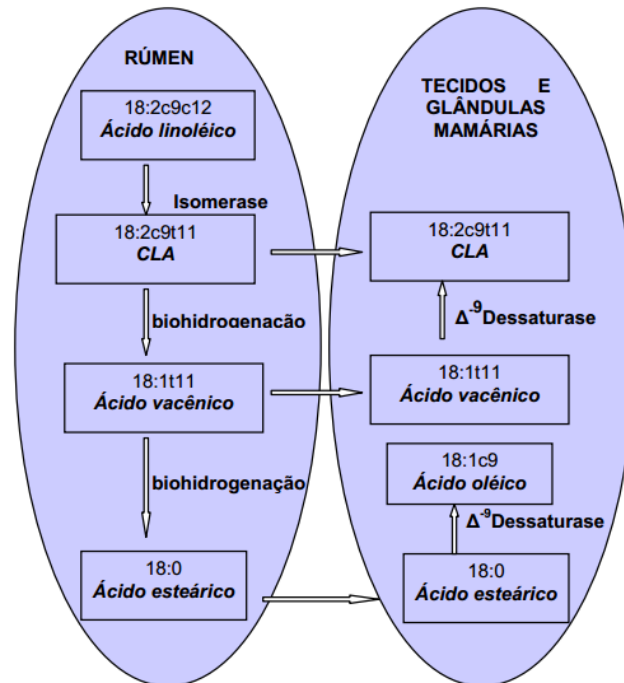
Os CLnAs apresentam três insaturações conjugadas, isto é, são ácidos trienoicos conjugados, os quais são isômeros do ácido alfa-linolênico (18:3*n*-3, LNA) (Shinohara et al., 2012). Esses ácidos graxos foram recentemente relacionados com os isômeros do ácido

linoleico conjugado (CLA), devido aos seus efeitos citotóxicos em tumores de humanos, à inibição da carcinogênese e a alterações no metabolismo dos lipídios (Suzuki et al., 2001).

Estudos prévios mostram que o ácido alfa-eleosteárico (alfa-ESA), presente em altas concentrações no óleo de tungue (60-80%), possui um efeito antitumoral mais forte do que o CLA em células tumorais humanas (Tsuzuki, Tokuyama, Igarashi & Miyazawa, 2004; Igarashi & Miyazawa, 2000), indicando a possibilidade de utilização desse ácido graxo como suplemento alimentar para a prevenção do câncer (Shinohara et al., 2012).

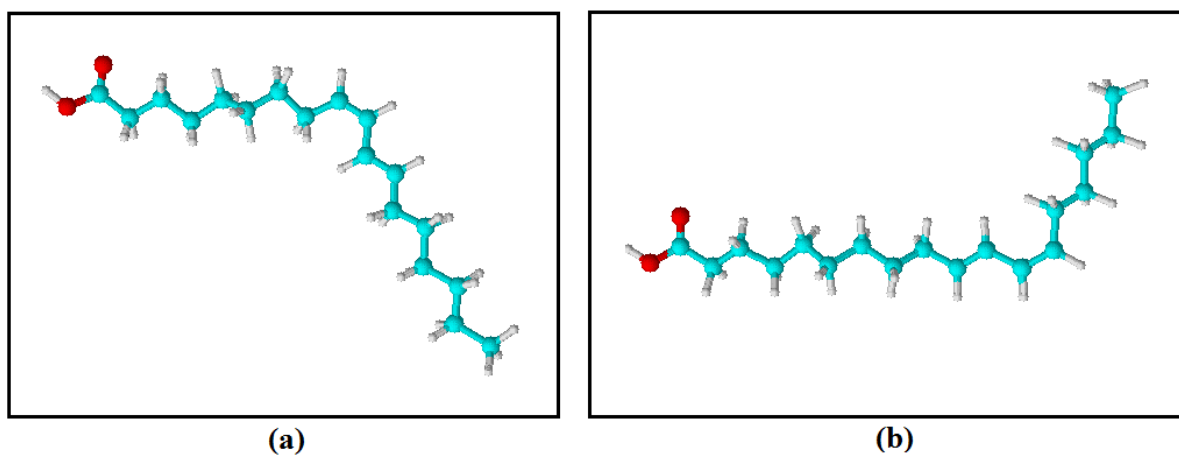
## **2.9. Ácido Linoleico Conjugado (CLA)**

O ácido linoleico conjugado (CLA) é composto por um grupo de isômeros conjugados geométricos e posicionais do ácido linoleico (18:2n-6) que são encontrados naturalmente apenas em carne de ruminantes e produtos lácteos, pois sua produção é realizada apenas por bactérias ruminais, através da biohidrogenação do ácido linoleico ou, enzimaticamente, por meio da dessaturação parcial ( $\Delta^9$ ) do ácido *trans* vacênico (18:1 $\Delta^9$ ) nas glândulas mamárias (Figura 9) (Degen et al., 2011).



**Figura 9.** Produção de ácido linoleico conjugado (CLA) em ruminantes. O quadro da esquerda se refere aos processos que ocorrem no rúmen; o quadro da direita, aos ocorridos na glândula mamária ou tecido adiposo. Adaptado de Bauman, Baumgard, Corl & Griinari (2000).

A forma primária encontrada nesses produtos é apenas o *cis*-9, *trans*-11. Entretanto, sinteticamente, é possível obter o CLA com os isômeros predominantes *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 (Figura 10) (Pariza et al., 2001) (APÊNDICE C).



**Figura 10.** Estruturas químicas dos isômeros predominantes do ácido linoleico conjugado (CLA). (a) 18:2c9, t11; (b) 18:2t10, c12.

O CLA atua na prevenção da arteriosclerose, como agente anticancerígeno e na resposta imune em humanos, assim como na redução dos lipídios corporais (Santos et al., 2009). Além disso, estudos recentes mostram que a suplementação da dieta para peixes com CLA resulta na diminuição do colesterol plasmático e dos níveis de triacilgliceróis, sem efeitos negativos sobre o desempenho de crescimento dos peixes, obtendo-se filés com níveis reduzidos de lipídios e com altos valores de proteína (Santos et al., 2011).

Santos et al. (2009), estudando o efeito da suplementação com CLA em dietas para Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), observaram uma redução nos teores dos ácidos graxos n-6 nos filés após o fornecimento da ração suplementada aos peixes, assim como uma redução nos níveis do ácido alfa-linolênico. Dessa forma, recomenda-se a utilização de uma fonte complementar de ácidos graxos n-3 para obter-se dietas mais equilibradas em termos da composição em ácidos graxos (Santos et al., 2011).

Considerando o baixo consumo de CLA, encontrado somente em produtos derivados de ruminantes, a suplementação de CLA em dietas para peixes visa também aumentar as fontes desses ácidos graxos em produtos destinados ao consumo humano.

## **2.10. Antioxidantes**

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, presentes em baixas concentrações quando comparadas com um extrato oxidável, inibem ou atrasam efetivamente sua oxidação (Sies & Stahl, 1995). Isto é, os antioxidantes podem inibir a formação dos radicais livres (ação preventiva) ou podem desativar espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) geradas pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, as duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados e

as bases do DNA, evitando a formação de lesões e perda de integridade celular (Bianchi & Antunes, 1999; Huang, Ou & Prior, 2005).

Os antioxidantes geralmente apresentam estruturas que possibilitam a inibição dos radicais livres, seja pela presença de ressonância, que estabiliza o elétron desemparelhado, ou pela habilidade em formar complexos com íons metálicos (Huang et al., 2005).

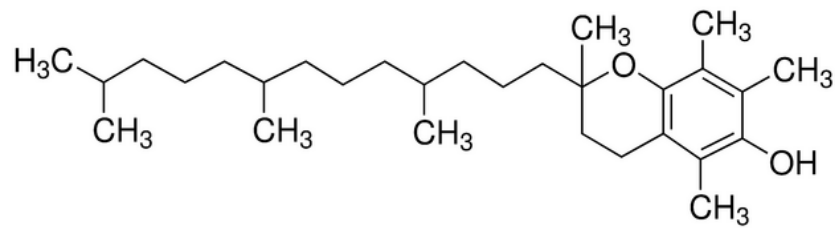
Estudos realizados nos últimos anos indicam que compostos que apresentam capacidade antioxidante desempenham um importante papel no sistema de defesa do organismo, reduzindo a incidência de doenças cardiovasculares, cânceres e processos degenerativos, relacionados às espécies reativas de oxigênio (Gökmen, Serpen & Fogliano, 2009). Estas substâncias também têm sido utilizadas na suplementação de dietas para animais com o intuito de obter-se produtos de melhor qualidade para o consumo humano (Navarro, Navarro, Filho, Ferreira, Pereira & Filho, 2012).

### **2.11. Vitamina E**

O emprego de antioxidantes sintéticos em alimentos tem sido relacionado a efeitos deletérios ao organismo humano e, por isso, desde a década de 90 até o presente momento, há uma crescente preocupação no sentido de obter substâncias naturais que tenham função antioxidante com a mesma eficiência dos sintéticos (Babbar et al., 2011). Com isso, substâncias naturais como a vitamina E têm sido empregadas pela indústria alimentícia como antioxidantes naturais, pois além dessa função é ainda um componente essencial ao organismo animal.

Vitamina E é a denominação genérica de oito compostos lipossolúveis, cada um dos quais com atividades biológicas específicas, sendo o  $\alpha$ -tocoferol (Figura 11) o mais potente antioxidante (Batista et al., 2007).





**Figura 11.** Estrutura química da molécula de  $\alpha$ -tocoferol.

A vitamina E é utilizada na dieta com a finalidade de melhorar o crescimento, a resistência ao estresse e a doenças, assim como a sobrevivência de peixes (Fogaça, 2005). Mas a função de maior importância é a atuação como antioxidante *in vivo*, protegendo os lipídios dos tecidos do ataque dos radicais livres (Morrissey et al., 1994).

Sendo a oxidação lipídica a mais relevante alteração química do pescado (Nunes et al., 2007), apresentando-se como o processo primário de deterioração da qualidade dos peixes e seus produtos e, manifestando-se por mudanças no cheiro, coloração, textura, valor nutritivo e possível produção de compostos tóxicos (Jensen, Lauridsen & Bertelsen, 1998), a utilização de antioxidantes, como a vitamina E na dieta, é uma alternativa para retardar os efeitos oxidativos e inibir a peroxidação dos ácidos graxos insaturados *in vivo* (Morrissey et al., 1994). E, portanto, um fator pré-abate importante no processamento e preservação da qualidade dos filés.

Navarro et al. (2012), avaliando a qualidade lipídica de tilápias do Nilo suplementadas com vitamina E, mostraram que as carcaças das tilápias que receberam suplementação com vitamina E em níveis de 100 e 150 mg/kg de ração tiveram a qualidade lipídica melhorada, apresentando um aumento nos valores de razão AGPI/AGS e também altos níveis dos ácidos graxos poli-insaturados das séries ômega-3 (ácido alfa-linolênico; 18:3n-3) e ômega-6 (ácido linoleico; 18:2n-6). Além disso, diversos estudos evidenciam o papel da vitamina E na prevenção da oxidação lipídica em produtos cárneos (Hosseini, Abedian-Kenari, Rezaei, Nazari, Feás & Rabbani, 2010; Fogaça & Sant'Ana, 2007; Ng et al., 2013). No entanto, são

escassos os estudos que avaliam a capacidade antioxidante *in situ* que tal substância apresenta quando incorporada em tecidos animais.

## 2.12. Selênio

Para aumentar a estabilidade oxidativa, cofatores como o selênio (Se), são adicionados à dieta dos animais de cultivo, melhorando a qualidade da carne, tornando-a menos susceptível aos danos causados pela oxidação (Downs et al., 2000).

O Se é um micro mineral essencial na nutrição humana e animal, incluindo os peixes (Watanabe et al., 1997). Além de proteger as células contra o processo oxidativo e prevenir a ocorrência de doenças metabólicas e infecciosas, possui importante papel nas selenoenzimas como a glutathiona-peroxidase (GSH-Px).

As glutathiona-peroxidases são as selenoproteínas mais conhecidas, capazes de proteger as membranas celulares dos danos causados pela oxidação, destruindo os peróxidos de hidrogênio e os hidroperóxidos, convertendo-os em formas menos reativas. O Se auxilia também na proteção contra a toxicidade de metais pesados como o cádmio e o mercúrio, e atuando em conjunto com a vitamina E provoca um efeito aditivo na prevenção da peroxidação dos lipídios de membrana (Watanabe et al., 1997).

Chiu, Hsieh, Yeh, Jian, Cheng & Liu (2010) reportaram o aumento da imunidade e resistência a doenças do camarão gigante de água doce (*Macrobrachium rosenbergii*) alimentado com dieta enriquecida com selênio, confirmando o efeito potenciador antioxidante que o Se possui no incremento da atividade de diversas enzimas, como as glutathiona-peroxidases. Além disso, esse estudo evidencia o benefício da utilização da forma inorgânica do selênio (selenito ou selenato de sódio,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  ou  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$ ) na suplementação de dietas de

animais de cultivo, devido à sua maior capacidade antioxidante e menor custo em relação à forma orgânica do selênio (selenometionina).

### **2.13. Resíduo de Acerola (*Malpighia emarginata* DC.)**

As frutas são outras fontes potenciais de substâncias que retardam os efeitos oxidativos, apresentando compostos com capacidade antioxidante, tais como polifenóis, carotenóides e vitaminas C e E (Oliveira et al., 2009a).

No Brasil, muitas frutas comestíveis são processadas em sucos naturais ou concentrados, geleias, polpas e extratos. Nestes processos, sementes, cascas e outras partes são rotineiramente descartadas, causando problemas ambientais (Oliveira et al., 2009a). A fabricação de produtos nutracêuticos utilizando compostos bioativos a partir de resíduos de frutas ajuda no uso eficiente, barato e ambientalmente correto desses resíduos. Sendo os resíduos de fruta baratos, facilmente disponíveis, além de possuírem moléculas bioativas, o emprego dos mesmos como fonte de compostos com capacidade antioxidante tem sido foco de investigações (Babbar et al., 2011).

A acerola (*Malpighia emarginata* DC.), originária da América Central, sendo encontrada também na América do Sul, incluindo o Brasil, devido à boa adaptação ao solo e clima (Vendramini & Trugo, 2000), se destaca por ser fonte de vitamina C e também de fitoquímicos como carotenóides e polifenóis (Lima et al., 2005; Vendramini et al., 2004; Mezadri et al., 2005). Além disso, apresenta compostos fenólicos como o ácido clorogênico, (-)-galato de epigallocatequina, (-)-epicatequina, rutina e procianidina B1 (Mezadri, Villaño, Fernández-Pachón, García-Parrilla & Troncoso, 2008).

Oliveira et al. (2009a) estudando a capacidade antioxidante de resíduos de frutas tropicais, encontrou elevado teor de compostos fenólicos com atividade antioxidante nos

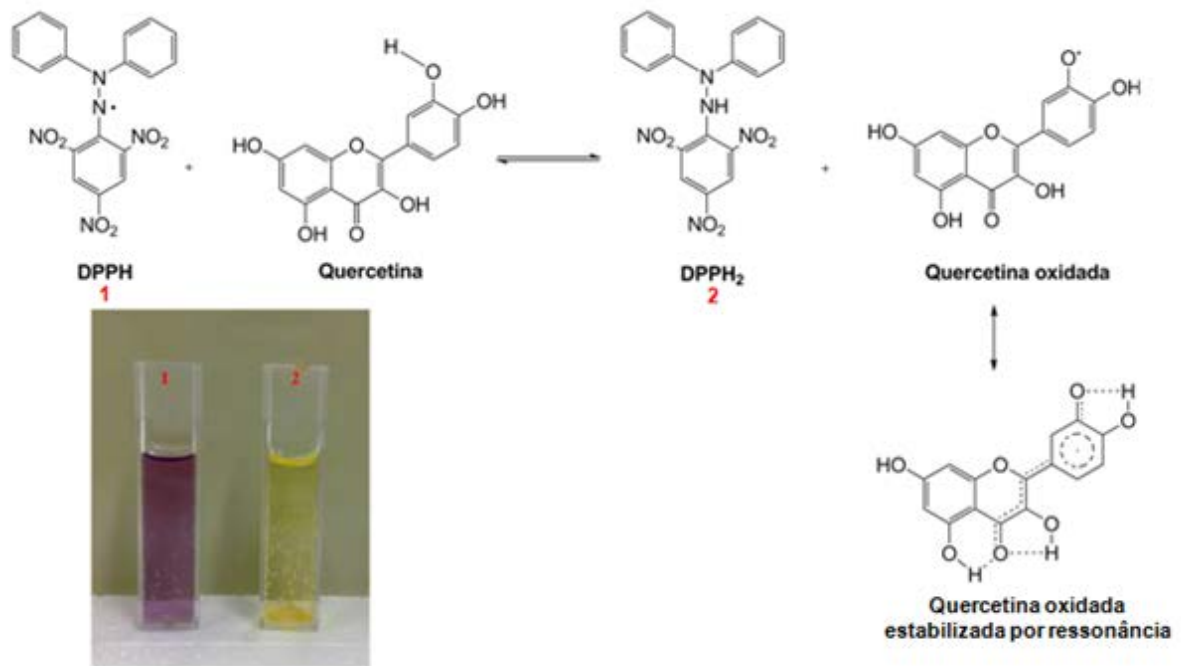
extratos metanólicos desses resíduos, com destaque para aqueles de acerola, sugerindo que os resíduos dessa fruta podem trazer benefícios para a saúde quando utilizados em alimentos funcionais. Além disso, o estudo evidencia a necessidade da realização de mais pesquisas para determinar a atividade *in situ*, a biodisponibilidade e também os efeitos benéficos reais destes antioxidantes naturais *in vivo*.

## **2.14. Ensaios Utilizados para Determinar a Capacidade Antioxidante**

### **2.14.1. Ensaio DPPH**

O ensaio espectrofotométrico DPPH recebe o nome do seu reagente principal. O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) apresenta dois anéis aromáticos de 6 membros, contendo átomos de carbono e hidrogênio, e um anel picril-hidrazila, constituído por um anel aromático de 6 membros ligado a três grupos nitro (NO<sub>2</sub>) e uma hidrazina, onde o átomo de nitrogênio ligado diretamente ao anel está com um elétron desemparelhado, o que caracteriza a espécie como um radical livre.

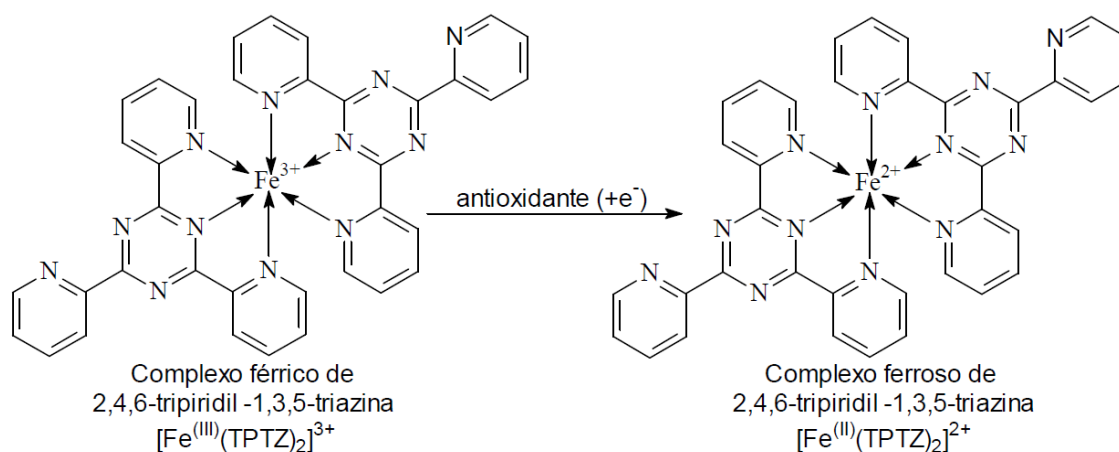
No ensaio DPPH ocorre uma reação de oxidação-redução, onde o radical DPPH, que apresenta coloração violeta, é reduzido, ou seja, o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio de um antioxidante, tornando a solução amarela e ocorrendo a formação do DPPH-H, reduzido e estável (Figura 12). É essa característica de mudança de coloração que permite o monitoramento da absorbância com máximo de absorção em 525 nm (Karadag, Ozcelik & Saner, 2009; Oliveira, Valentim, Goulart, Silva, Bechara & Trevisan, 2009b).



**Figura 12.** Redução do radical livre DPPH pela quercetina.

### 2.14.2. Ensaio FRAP

O ensaio FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*) determina o poder de redução de antioxidantes utilizando o complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) como reagente. O complexo Fe(III)-TPTZ é formado por duas moléculas de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina, que atuam como ligantes e um íon metálico central Fe(III). Na presença de uma substância antioxidante redutora em meio ácido (pH 3,6), o complexo  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2]^{3+}$  recebe um elétron e é reduzido à forma  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  (Figura 13), que apresenta intensa coloração azul com máximo de absorção em 593 nm (Benzie & Strain, 1996).

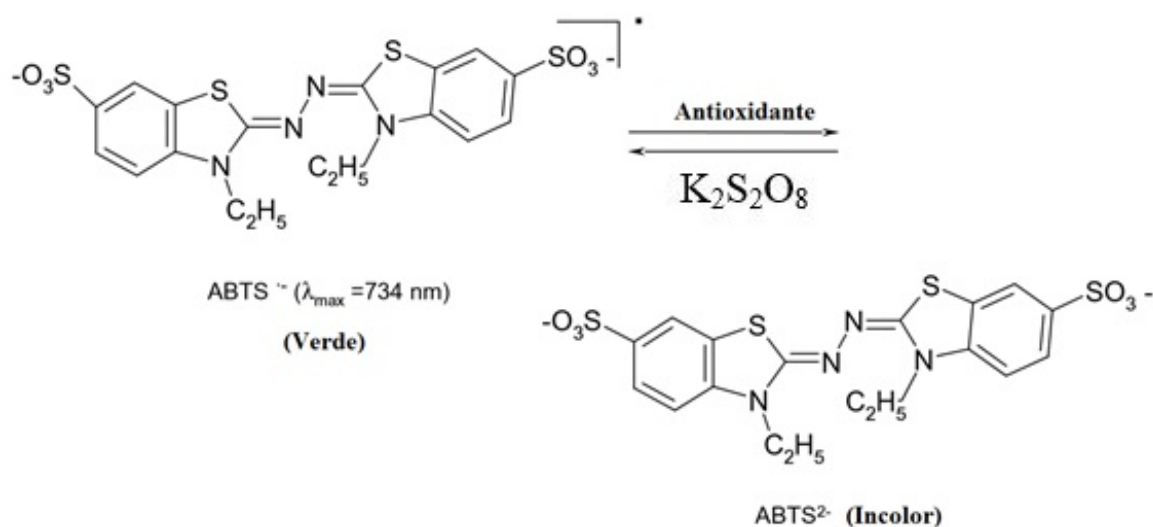


**Figura 13.** Redução do complexo férrico  $[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$  a ferroso  $[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$  pela ação de um antioxidante.

### 2.14.3. Ensaio ABTS

Outro ensaio para avaliar a capacidade antioxidante é realizado através da captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). O radical ABTS é gerado pela reação química entre o ABTS e o persulfato de potássio e apresenta coloração verde escuro com máximo de absorvância em 734 nm (Re, Proteggente, Pannala, Yang & Rice-Evans, 1999).

O ensaio baseia-se no fato de que quando existem compostos antioxidantes na reação, eles capturam os radicais livres ABTS com diminuição da cor e redução da absorvância, correspondendo quantitativamente com a concentração de antioxidantes presentes na amostra, como mostra a Figura 14 (Zulueta, Esteve & Frígola, 2009).



**Figura 14.** Reação do radical ABTS na presença de um composto antioxidante. Adaptado de Zulueta et al., 2009.

#### 2.14.4. Procedimento QUENCHER

No presente estudo, o procedimento QUENCHER foi utilizado para medir a capacidade antioxidante nos ensaios DPPH, FRAP e ABTS. Esse procedimento traz uma nova abordagem de determinação da capacidade antioxidante em alimentos. Ele baseia-se na medição direta da capacidade antioxidante de amostras sólidas em contato com os radicais livres, e subsequente medição espectrofotométrica.

QUENCHER é uma abreviação das palavras inglesas **QU**ick, **E**asy, **N**ew, **CHE**ap e **R**eproducibile (Gökmen et al., 2009), dado que o procedimento é considerado rápido, fácil, novo, barato e reprodutível.

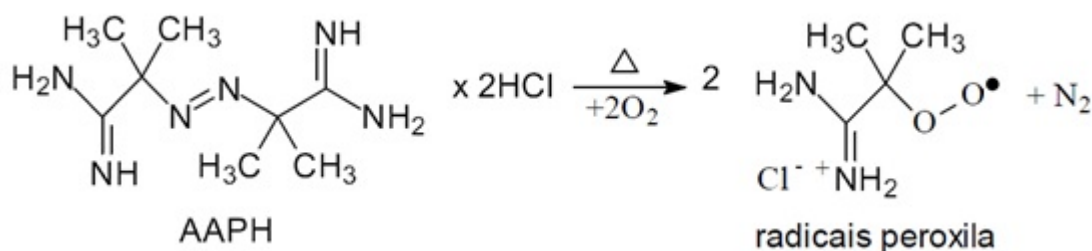
O procedimento QUENCHER evita etapas de extração com solventes e etapas de hidrólise. Considerando que ambas as partes solúveis e insolúveis dos alimentos ficam simultaneamente em contato com as espécies radicais, a medida da capacidade antioxidante total de um determinado alimento se torna mais precisa. Além disso, estes resultados são mais

realistas quanto à atividade antioxidante de alimentos no trato gastrointestinal humano, uma vez que as ações simultâneas de todos os antioxidantes presentes nas amostras são levadas em consideração (Gökmen et al., 2009).

#### 2.14.5. Ensaio ORAC<sub>FL</sub>

O ensaio fluorimétrico baseado na capacidade de absorvância do radical de oxigênio, utilizando fluoresceína (FL) como marcador da capacidade antioxidante (ORAC<sub>FL</sub>) também está se tornando um método amplamente utilizado para avaliação em amostras de alimentos (Prior et al., 2003; Wu, Beecher, Holden, Haytowitz, Gebhardt & Prior, 2004).

O ensaio ORAC<sub>FL</sub> baseia-se na inibição da oxidação dos radicais peroxila induzida inicialmente pela decomposição térmica do azo-composto 2,2'-azobis-(2-amidino-propano) dihidrocloreto (AAPH) (Figura 15).



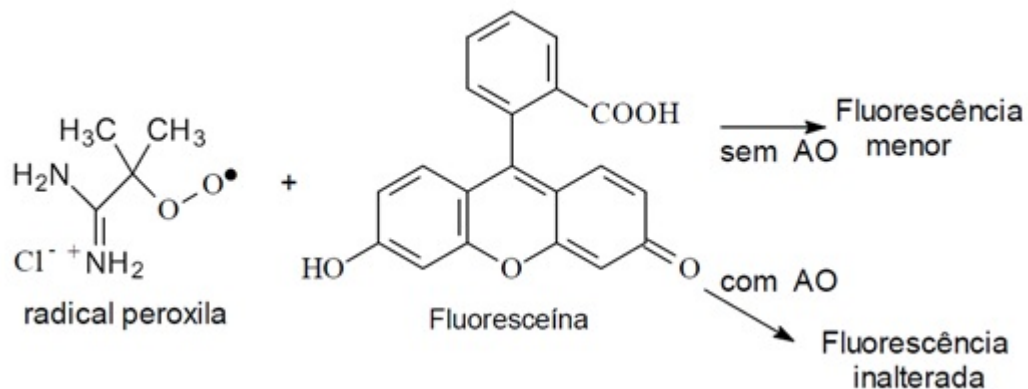
**Figura 15.** Reação de decomposição térmica do azo-composto 2,2'-azobis-(2-amidino-propano) dihidrocloreto (AAPH). Adaptado de Zulueta et al., 2009.

Dessa forma, o ensaio ORAC<sub>FL</sub> utiliza uma fonte de radical biológica relevante e é o único método que combina tanto tempo quanto grau de inibição por um antioxidante num único valor, reproduzindo o mecanismo de atuação e prevenção dos radicais livres no organismo



humano (Prior et al., 2003; Wu, Duckett, Neel, Fontenot & Clapham, 2008; Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan & Prior, 2002a).

Os radicais peroxila formados (Figura 15) reagem com uma substância fluorescente que é utilizada como substrato oxidável, a fluoresceína. As substâncias antioxidantes (AO) presentes na amostra protegem a fluoresceína da oxidação provocada pelos radicais peroxila, através da doação de um átomo de hidrogênio aos radicais livres, evitando o decréscimo de fluorescência (Figura 16).



**Figura 16.** Representação da atuação dos antioxidantes na proteção do ataque dos radicais peroxila à fluoresceína. Adaptado de Zulueta et al., 2009.

A perda de fluorescência da fluoresceína pela ação dos radicais peroxila se deve pela alteração estrutural que ela sofre, passando por várias etapas, sendo que a estrutura final ainda não foi confirmada.

Além disso, uma pequena modificação no ensaio  $\text{ORAC}_{\text{FL}}$  introduzida por Huang, Ou, Hampsch-Woodill, Flanagan & Deemer (2002b) aplicando a  $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente (Randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin – RMCD) para aumentar a solubilidade de substâncias lipofílicas em soluções aquosas, permite a medição da capacidade antioxidante de ambos componentes lipofílicos e hidrofílicos numa determinada amostra separadamente usando a mesma fonte radicalar, o AAPH (Wu et al., 2004).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da suplementação de dietas para tilápias do Nilo com diferentes fontes de ácidos graxos e antioxidantes sobre a composição lipídica e a capacidade antioxidante dos filés, ao longo de um período de 60 dias.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Adicionar óleo de tungue, óleo de chia e CLA à ração verificando a deposição e síntese de ácidos graxos no tecido muscular das tilápias;
- Adicionar vitamina E, selênio e extrato etanólico de resíduo de acerola à ração observando a incorporação de antioxidantes nos filés das tilápias;
- Verificar a adaptação das tilápias frente às rações formuladas assim como ao local de confinamento;
- Obter a composição proximal (umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais e carboidratos) e o valor energético das rações desenvolvidas;
- Identificar e quantificar os ácidos graxos presentes nas rações e nos filés das tilápias;
- Determinar a capacidade antioxidante das rações e dos filés de tilápia por diferentes ensaios (DPPH, FRAP, ABTS e ORAC<sub>FL</sub>).

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1. Preparo das Rações

Foram desenvolvidos quatro tipos de rações, atendendo as normas nutricionais para tilápias (NRC,1993), sendo que:

- Ração Controle = ração acrescida de 1,90% de óleo de girassol;
- Tratamento I (TI) = ração acrescida de 0,63% de óleo de tungue + 0,63% de óleo de chia + 0,63% de CLA + 0,015% (150 mg kg<sup>-1</sup>) de vitamina E;
- Tratamento II (TII) = ração acrescida de 0,63% de óleo de tungue + 0,63% de óleo de chia + 0,63% de CLA + 0,015% (150 mg kg<sup>-1</sup>) de vitamina E + 0,000025% (0,25 mg kg<sup>-1</sup>) de selênio;
- Tratamento III (TIII) = ração acrescida de 1,90% de óleo de girassol + 0,28% de extrato etanólico de resíduo de acerola.

Para o preparo das rações, os ingredientes moídos e peneirados foram misturados com água para a obtenção dos pellets, sendo que estes foram posteriormente secos em estufa com circulação de ar a 55°C por 10 horas, resfriados a temperatura ambiente e separados em pequenas porções, que foram acondicionadas a vácuo, protegidas da luz e mantidas a temperatura de -18°C até a utilização na alimentação dos peixes.

A Tabela 1 apresenta as formulações das quatro rações desenvolvidas, sendo que foram produzidos 3,0 kg de cada tratamento para utilização durante todo o período do experimento (60 dias).

**Tabela 1.** Formulações das rações utilizadas nos diferentes tratamentos (% em massa)

Ingredientes Alimentares	Tratamentos			
	Controle (%)	TI (%)	TII (%)	TIII (%)
Farelo de Milho	37,39	37,39	37,39	37,11
Farelo de Soja	32,08	32,08	32,08	32,08
Farelo de Vísceras de Aves	14,00	14,00	14,00	14,00
Farinha de Trigo Integral	8,00	8,00	8,00	8,00
Farinha de Arroz	5,00	5,00	5,00	5,00
Fosfato Bicálcico	0,22	0,22	0,22	0,22
Premix*	0,50	0,50	0,50	0,50
Sal Comum (NaCl)	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
Propionato de Cálcio	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina C Fosfatada (35%)	0,08	0,08	0,08	0,08
BHT**	0,02	0,02	0,02	0,02
L -Tryptofano	0,02	0,02	0,02	0,02
Óleo de Girassol	1,90	-	-	1,90
Óleo de Tungue	-	0,63	0,63	-
Óleo de Chia	-	0,63	0,63	-
LUTA-CLA® (BASF-Brasil)***	-	0,63	0,63	-
Vitamina E (50%)	-	0,015	0,015	-
Selenito de Sódio (45%)	-	-	0,000025	-
Extrato Etanólico de Resíduo de Acerola	-	-	-	0,28

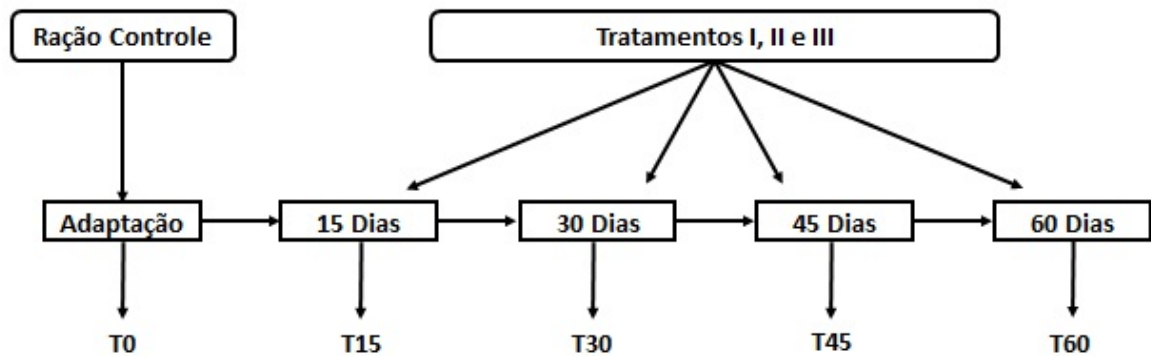
\*Suplemento mineral e vitamínico; \*\*BHT = butil-hidroxitolueno; \*\*\*Produto comercial composto de 60% dos isômeros (*cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 - 18:2) e 40% do veículo [ácido oleico (18:1n-9) e outros ácidos graxos]; CLA = ácido linoleico conjugado. Controle: óleo de girassol; TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

## 4.2. Sistema de Confinamento e Preparo das Amostras de Peixe

O estudo foi conduzido no laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, no período de setembro a dezembro de 2012.

Foi utilizado um total de 240 tilápias adquiridas no comércio de Maringá - PR, com peso médio inicial de  $15,00 \pm 0,10$  g, sendo 80 indivíduos para cada tratamento. As tilápias foram distribuídas em três tanques plásticos com dimensões de 1,0 x 0,6 x 0,6 m com fluxo contínuo de água e oxigenação constante. Os peixes foram alimentados com duas porções diárias, sendo 40% da ração distribuída na parte da manhã e o restante (60%) na parte da tarde, onde a quantidade total de ração distribuída em cada tanque representava 3% em massa do total de peixes contidos em cada tanque.

Primeiramente, as tilápias adquiridas passaram 30 dias em adaptação recebendo a ração Controle. Após esse período, uma amostragem foi removida e foram realizadas as análises do tempo zero (0 dias de suplementação). Logo após, iniciou-se o experimento fornecendo as rações suplementadas (TI, TII e TIII) aos peixes e novas amostragens foram realizadas nos períodos de 15, 30, 45 e 60 dias de suplementação, coletando-se 15 peixes/tanque. A cada coleta a quantidade de ração administrada foi recalculada pela variação da quantidade e massa dos peixes. A Figura 17 mostra um fluxograma simplificado do delineamento experimental utilizado.



**Figura 17.** Fluxograma simplificado do delineamento experimental utilizado.

Após cada amostragem, as tilápias foram sacrificadas, pesadas, medidas, evisceradas e filetadas. Os filés foram embalados em sacos de polietileno sob atmosfera de nitrogênio ( $N_2$ ) e mantidos a  $-18^\circ C$  para análises posteriores. Antes de cada análise os filés foram descongelados, triturados em multiprocessador de alimentos e devidamente homogeneizados.

#### 4.3. Preparo do Extrato Etanólico de Resíduo de Acerola

À ração do Tratamento III foi adicionado extrato etanólico de resíduo de acerola. O resíduo foi produzido utilizando-se acerolas *in natura* obtidas no comércio de Maringá-PR. Nesse procedimento, porções contendo aproximadamente 350 g de acerola foram trituradas, posteriormente peneiradas (50 *mesh*) e o resíduo de acerola retido na peneira foi lavado com 200 mL de água. Para a extração dos antioxidantes, 40,0 g da amostra de resíduo de acerola foram misturadas com 400,0 mL de etanol. A solução resultante foi agitada por 2 h ao abrigo da luz, filtrada com papel filtro Whatman (nº 1) com posterior remoção do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida, a  $40^\circ C$ . Esse procedimento foi repetido até a

obtenção da quantidade necessária de extrato para a realização de todo o experimento. Para o preparo da ração o extrato obtido da rota-*evaporação* foi posteriormente liofilizado a  $-52^{\circ}\text{C}$  e 0,060 mbar durante 24 h em um liofilizador da marca CHRIST, modelo ALPHA 1-2 LD plus.

#### **4.4. Determinação da Composição Proximal das Rações**

Os teores de umidade e cinzas foram determinados gravimetricamente, conforme técnicas da AOAC (Cunniff, 1998), por aquecimento em estufa e mufla a 105 e  $600^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. A análise do teor de proteína bruta foi baseada no processo semi-micro Kjeldahl, também conforme técnica da AOAC (Cunniff, 1998). Os lipídios totais foram extraídos com uma mistura clorofórmio-metanol-água (2:2:1,8, v/v/v), segundo Bligh & Dyer (1959), sendo o teor determinado gravimetricamente. Os valores de carboidratos foram estimados por diferença e o valor energético foi calculado considerando os seguintes fatores de conversão: carboidratos  $4 \text{ kcal g}^{-1}$  ( $17 \text{ kJ g}^{-1}$ ), proteína  $4 \text{ kcal g}^{-1}$  ( $17 \text{ kJ g}^{-1}$ ) e lipídios  $9 \text{ kcal g}^{-1}$  ( $37 \text{ kJ g}^{-1}$ ) (Brasil, 1998).

#### **4.5. Extração e Derivatização dos Lipídios Totais**

Assim como nas rações, os lipídios totais dos filés de tilápia foram extraídos segundo Bligh & Dyer (1959). A metilação dos ácidos graxos dos lipídios totais foi realizada segundo o método de Hartman & Lago (1973), com modificações propostas por Maia & Rodriguez-Amaya (1993).

#### 4.6. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram separados em cromatógrafo a gás 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  $\mu\text{m}$  de cianopropil). As vazões dos gases foram de 1,2  $\text{mL min}^{-1}$  para o gás de arraste ( $\text{H}_2$ ); 30  $\text{mL min}^{-1}$  para o gás auxiliar ( $\text{N}_2$ ) e 35 e 350  $\text{mL min}^{-1}$  para o  $\text{H}_2$  e para o ar sintético, respectivamente, para a chama do detector. O volume injetado foi de 2,0  $\mu\text{L}$ , utilizando divisão da amostra (*split*) de 1:80. As temperaturas do injetor e do detector foram de 200 e 240°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada a 165°C durante 7,00 min, seguido por rampa de aquecimento de 4°C  $\text{min}^{-1}$  até atingir 185°C, permanecendo assim por 4,67 min, seguido por nova rampa de aquecimento de 6°C  $\text{min}^{-1}$  até que a coluna atingisse 235°C, mantidos por 5,00 min, totalizando assim 30,00 min de análise. Os tempos de retenção e as áreas dos picos dos EMAG foram determinados utilizando o software ChromQuest 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 EMAG foi realizada através da padronização interna, utilizando como padrão o metil éster do ácido tricosanoico (23:0), da marca SIGMA (USA), e os cálculos realizados segundo método de Joseph & Ackman (1992). Fatores de correção teóricos (Visentainer, 2012) foram empregados para a determinação dos valores de concentrações (APÊNDICE D). A quantidade de ácidos graxos nas amostras foi calculada em  $\text{mg g}^{-1}$  de lipídios totais ( $\text{mg g}^{-1}$  de LT) utilizando a Equação 1.

$$M_x = \frac{A_x M_p F_{CT}}{A_p M_A F_{CEA}} \quad \text{Equação 1}$$



Onde:  $M_x$  é a concentração do ácido graxo X em  $\text{mg g}^{-1}$  de lipídios totais,  $A_x$  é a área do pico do ácido graxo X,  $A_p$  é a área do pico do padrão interno (23:0),  $M_p$  é a massa de padrão interno adicionada à amostra em mg,  $M_A$  é a massa da amostra em g,  $F_{CT}$  é o fator de correção teórico do detector de ionização em chama (DIC) e  $F_{CEA}$  é o fator de conversão de éster metílico para ácido graxo.

#### **4.7. Determinação da Capacidade Antioxidante**

As capacidades antioxidantes das rações e dos filés de tilápia foram determinadas por meio dos ensaios DPPH, FRAP e ABTS e também, analisando-se as frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) e lipofílicas (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub>. Como padrão de referência foi utilizado Trolox (ácido ( $\pm$ )-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), para converter a capacidade de inibição de cada amostra para capacidade antioxidante em equivalente Trolox (ET).

##### **4.7.1. Ensaios de Capacidade Antioxidante Seguindo Procedimento QUENCHER**

Os ensaios DPPH, FRAP e ABTS foram realizados seguindo procedimento QUENCHER (Serpen, Gökmen & Fogliano, 2012). Antes da realização do procedimento as amostras foram secas e peneiradas (80 *mesh*) para evitar qualquer interferência granulométrica, pois a capacidade antioxidante é medida através do contato direto do radical com a amostra.

#### 4.7.1.1. Preparo da Solução de DPPH

A solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi preparada pela dissolução de 40 mg do radical DPPH em 200 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v). O valor de absorbância entre 0,75 e 0,80 em 525 nm foi determinado diluindo-se os 200 mL da solução estoque com aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v) (Serpen et al., 2012). Soluções metanólicas de Trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração ( $y = 2,7892x + 5,3686$ ;  $R^2 = 0,9959$ ), sendo a capacidade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

#### 4.7.1.2. Preparo da Solução de FRAP

A solução de FRAP foi preparada pela diluição de uma solução aquosa  $10 \text{ mmol L}^{-1}$  de TPTZ (2,4,6-Tris(2 piridil)-1,3,5-triazina) e  $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de cloreto férrico em uma solução tampão  $300 \text{ mmol L}^{-1}$  de acetato de sódio (pH 3,6) na proporção de 1:1:10 (v/v/v), como descrito por Benzie & Strain (1996). As leituras de absorbância foram realizadas em 593 nm. Soluções metanólicas de Trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção das curvas de calibração ( $y = 0,04457x + 0,006$ ;  $r^2 = 0,9977$  para volume final de 10 mL e  $y = 0,03949x - 0,0127$ ;  $R^2 = 0,9926$  para volume final de 25 mL), sendo a capacidade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

#### 4.7.1.3. Preparo da Solução de ABTS

No ensaio ABTS, a solução de trabalho foi preparada de acordo com Re et al. (1999), reagindo-se a solução estoque de ABTS ( $7 \text{ mmol L}^{-1}$ ) com solução de persulfato de potássio

(2,45 mmol L<sup>-1</sup>). A solução final ficou em repouso, ao abrigo da luz e temperatura ambiente, durante 12-16 h antes da utilização. O valor de absorbância entre 0,75 e 0,80 em 734 nm foi determinado diluindo-se 10 mL da solução final com aproximadamente 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v) (Serpen et al., 2012). Soluções metanólicas de Trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração ( $y = 3,7574x + 3,2715$ ;  $R^2 = 0,9968$ ), sendo a capacidade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ .

#### **4.7.1.4. Procedimento QUENCHER**

Para a realização dos ensaios DPPH, FRAP e ABTS seguindo procedimento QUENCHER, 10 ( $\pm 1,0$ ) mg de cada amostra foram pesados em tubos de centrífuga protegidos da luz e 10 mL das respectivas soluções de trabalho adicionados aos tubos para iniciar as reações. Com exceção das amostras de filé, onde para o emprego do ensaio FRAP foi necessária uma diluição, sendo utilizado então 5 ( $\pm 1,0$ ) mg de amostra liofilizada e adicionados 25 mL da solução do reagente. Todos os tubos foram agitados por 60 min, seguidos de centrifugação a 4000 rpm por 10 min. A absorbância dos sobrenadantes foi medida em um espectrofotômetro UV-Vis da marca Thermo SCIENTIFIC, modelo GENESYS 10uv Scanning, nos comprimentos de onda de 525 nm (para ensaio DPPH), 593 nm (para ensaio FRAP) e 734 nm (para ensaio ABTS) (Serpen et al., 2012).

#### **4.7.2. Capacidade Antioxidante Determinada pelo Ensaio ORAC<sub>FL</sub>**

Os procedimentos de preparo dos extratos hidrofílicos (H-ORAC<sub>FL</sub>) e lipofílicos (L-ORAC<sub>FL</sub>) para o ensaio ORAC<sub>FL</sub> foram realizados de acordo com Prior et al. (2003).

#### 4.7.2.1. Preparo dos Extratos Lipofílicos (L-ORAC<sub>FL</sub>) do Ensaio ORAC<sub>FL</sub>

Para o preparo dos extratos lipofílicos do ensaio ORAC<sub>FL</sub>, 0,5 g de cada amostra seca e peneirada foi pesada em tubos de centrífuga e o conteúdo lipofílico foi primeiramente extraído com adição de 10 mL de hexano. Após a adição de solvente, os tubos foram agitados por 30 s, seguidos de sonicação a 37°C por 5 min. Os tubos foram agitados duas vezes durante a etapa de sonicação para suspender as amostras. Na sequência, os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 10 min com agitação ocasional. Posteriormente, todas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 min e os sobrenadantes foram coletados em balões de fundo chato. O resíduo de cada amostra foi submetido ao mesmo procedimento descrito anteriormente. Os sobrenadantes resultantes das duas extrações sequenciais foram combinados, concentrados em evaporador rotatório a 30°C e o extrato hexânico seco foi dissolvido em 1,5 mL de acetona e 4,5 mL de solução 7% de RMCD ( $\beta$ -ciclodextrina metilada aleatoriamente) (50% acetona:50% água, v/v).

No ensaio L-ORAC<sub>FL</sub>, os extratos foram diluídos com solução 7% de RMCD em acetona/água (50:50, v/v) até uma concentração apropriada para estar dentro do intervalo de concentração da curva padrão ( $y = 0,1885x + 2,1336$ ,  $R^2 = 0,9905$ ). A solução 7% de RMCD foi utilizada como branco e para dissolver os padrões de Trolox no ensaio lipofílico.

#### 4.7.2.2. Preparo dos Extratos Hidrofílicos (H-ORAC<sub>FL</sub>) do Ensaio ORAC<sub>FL</sub>

As extrações hidrofílicas foram realizadas com os resíduos das extrações lipofílicas pela adição de 10 mL de uma mistura acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) e aplicando o mesmo procedimento utilizado nas extrações lipofílicas. As amostras foram centrifugadas a

4000 rpm por 15 min e os sobrenadantes foram coletados em balões volumétricos. A extração foi repetida, sendo os sobrenadantes combinados e diluídos para um volume final de 25 mL.

No ensaio H-ORAC<sub>FL</sub>, os extratos foram diluídos com acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) até o intervalo de concentração apropriado para a curva padrão ( $y = 0,3505x + 1,3897$ ,  $R^2 = 0,9961$ ). Padrões de Trolox foram preparados em acetona/água/ácido acético (70:29,5:0,5, v/v/v) bem como o branco para o ensaio H-ORAC<sub>FL</sub>.

#### 4.7.2.3. Ensaio ORAC<sub>FL</sub>

Os ensaios H-ORAC<sub>FL</sub> e L-ORAC<sub>FL</sub> foram realizados a 37°C em um fluorímetro da marca PerkinElmer, modelo VICTOR™ X4, utilizando microplacas pretas de 96 poços, em que a medida de excitação/emissão é feita a partir do topo da placa.

Uma alíquota de 20 µL das amostras diluídas foi adicionada à cada uma das células da microplaca seguida pela adição de 200 µL de solução 95,7 nmol L<sup>-1</sup> de fluoresceína sódica preparada como descrito por Prior et al. (2003). A microplaca foi inserida no fluorímetro por 5 min para estabilização da temperatura. Em seguida, 75 µL da solução de AAPH (2,2'-azobis-(2-amidino-propano) dihidrocloro), diluída em tampão fosfato 0,075 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) com concentração de 17,2 mg mL<sup>-1</sup> para o ensaio L-ORAC<sub>FL</sub> e 8,6 mg mL<sup>-1</sup> para o ensaio H-ORAC<sub>FL</sub> foram adicionados a cada célula. As leituras foram iniciadas imediatamente em intervalos de 1 min durante 30 ciclos de análise. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 485 e 515 nm, respectivamente.

Os valores finais de H-ORAC<sub>FL</sub> e L-ORAC<sub>FL</sub> foram calculados utilizando um modelo de regressão linear ( $y = ax + b$ ) entre concentração de Trolox (µmol L<sup>-1</sup>) e a área líquida sob a curva de decaimento da fluoresceína, de acordo com Prior et al. (2003). A área abaixo da curva (AUC) de decaimento da fluoresceína foi calculada utilizando a seguinte equação:

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

Onde:  $f_0$  é a intensidade de fluorescência inicial e  $f_n$  é a intensidade de fluorescência no tempo  $n$ .

O valor de AUC líquido foi obtido subtraindo-se a área abaixo da curva de decaimento da fluorescência do branco (AUC) do valor da amostra ou padrão (Wu et al., 2008).

Os resultados de capacidade antioxidante foram expressos em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

A capacidade antioxidante total (CAT) foi calculada somando-se os valores obtidos nos ensaios H-ORAC<sub>FL</sub> e L-ORAC<sub>FL</sub>.

#### **4.8. Análises Estatísticas**

Os resultados foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do teste-t, utilizando o software Microsoft Office Excel, versão 2013 (MICROSOFT, 2013) e do teste de Tukey, através do programa Statistica, versão 7.0 (STATSOFT, 1996). O nível de significância utilizado para rejeição da hipótese nula foi 5% ( $p < 0,05$ ).

## **5. Resultados e Discussão**

### **5.1. Rações Formuladas**

#### **5.1.1. Composição Proximal e em Ácidos Graxos**

Os resultados obtidos nas análises de umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais e carboidratos das rações dos tratamentos Controle, TI, TII e TIII, assim como suas composições em ácidos graxos, são apresentados na Tabela 2. Comparando-se os resultados obtidos não foi observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre a composição proximal das rações formuladas, garantindo assim a característica desejada de serem isoproteicas e isocalóricas, para que não ocorram variáveis desordenadas no delineamento experimental.

**Tabela 2.** Composição proximal (g 100 g<sup>-1</sup> de ração) e em ácidos graxos (mg de ácido graxo g<sup>-1</sup> de lipídios totais) das rações dos tratamentos Controle, TI, TII e TIII

	Tratamentos			
	Controle	TI	TII	TIII
Umidade	7,51 ± 0,10 <sup>a</sup>	7,64 ± 0,05 <sup>a</sup>	7,36 ± 0,25 <sup>a</sup>	7,43 ± 0,04 <sup>a</sup>
Cinzas	5,35 ± 0,17 <sup>a</sup>	5,27 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,31 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,24 ± 0,03 <sup>a</sup>
Proteína Bruta	28,71 ± 0,74 <sup>a</sup>	28,34 ± 0,68 <sup>a</sup>	28,33 ± 0,66 <sup>a</sup>	28,04 ± 0,20 <sup>a</sup>
Lipídios Totais	6,10 ± 0,05 <sup>a</sup>	6,02 ± 0,36 <sup>a</sup>	5,72 ± 0,03 <sup>a</sup>	5,87 ± 0,13 <sup>a</sup>
Carboidratos*	52,33 ± 0,74 <sup>a</sup>	52,73 ± 0,37 <sup>a</sup>	53,28 ± 0,37 <sup>a</sup>	53,42 ± 0,18 <sup>a</sup>
Valor Energético**	379,06 ± 0,33 <sup>a</sup>	378,46 ± 1,46 <sup>a</sup>	377,91 ± 0,75 <sup>a</sup>	378,68 ± 0,50 <sup>a</sup>
<b>Ácidos Graxos</b>				
16:0	130,40 ± 8,23 <sup>a</sup>	129,54 ± 4,45 <sup>a</sup>	124,31 ± 4,07 <sup>a</sup>	129,09 ± 5,20 <sup>a</sup>
16:1n-7	11,91 ± 0,71 <sup>a</sup>	12,53 ± 0,22 <sup>a</sup>	11,49 ± 0,51 <sup>a</sup>	11,73 ± 0,59 <sup>a</sup>
18:0	37,05 ± 1,93 <sup>a</sup>	36,81 ± 0,75 <sup>a</sup>	36,76 ± 0,35 <sup>a</sup>	36,58 ± 1,13 <sup>a</sup>
18:1n-9	249,18 ± 11,82 <sup>a</sup>	236,62 ± 2,23 <sup>a</sup>	234,80 ± 6,50 <sup>a</sup>	245,75 ± 9,43 <sup>a</sup>
18:1n-7	10,64 ± 0,79 <sup>a</sup>	10,28 ± 0,09 <sup>a</sup>	10,15 ± 0,38 <sup>a</sup>	10,17 ± 0,43 <sup>a</sup>
18:2n-6	391,75 ± 15,37 <sup>a</sup>	278,49 ± 0,30 <sup>b</sup>	258,76 ± 7,47 <sup>b</sup>	388,26 ± 17,30 <sup>a</sup>
18:3n-3	15,51 ± 0,28 <sup>c</sup>	56,96 ± 1,26 <sup>a</sup>	52,24 ± 1,68 <sup>b</sup>	15,53 ± 0,10 <sup>c</sup>
18:2c9t11	nd	23,85 ± 0,22 <sup>a</sup>	22,98 ± 0,63 <sup>a</sup>	nd
19:2n-7	nd	2,39 ± 0,02 <sup>a</sup>	2,35 ± 0,07 <sup>a</sup>	nd
18:2t10c12	nd	26,01 ± 0,52 <sup>a</sup>	22,80 ± 0,61 <sup>b</sup>	nd
18:3c9t11t13 (alfa-ESA)	nd	34,68 ± 0,37 <sup>a</sup>	32,83 ± 1,07 <sup>a</sup>	nd
18:3t9t11t13 (beta-ESA)	nd	15,43 ± 0,01 <sup>a</sup>	15,03 ± 0,27 <sup>a</sup>	nd
AGS	167,45 ± 8,45 <sup>a</sup>	166,35 ± 4,52 <sup>a</sup>	161,07 ± 4,08 <sup>a</sup>	165,67 ± 5,32 <sup>a</sup>
AGMI	271,73 ± 11,87 <sup>a</sup>	259,43 ± 2,24 <sup>a</sup>	256,45 ± 6,53 <sup>a</sup>	267,65 ± 9,46 <sup>a</sup>
AGPI	407,26 ± 15,38 <sup>a</sup>	437,81 ± 1,46 <sup>a</sup>	406,99 ± 7,79 <sup>a</sup>	403,79 ± 17,30 <sup>a</sup>
n-6	391,75 ± 15,38 <sup>a</sup>	278,49 ± 0,30 <sup>b</sup>	258,76 ± 7,47 <sup>b</sup>	388,26 ± 17,30 <sup>a</sup>
n-3	15,51 ± 0,28 <sup>c</sup>	56,96 ± 1,26 <sup>a</sup>	52,24 ± 1,68 <sup>b</sup>	15,53 ± 0,10 <sup>c</sup>
CLA	nd	49,86 ± 0,57 <sup>a</sup>	45,77 ± 0,88 <sup>b</sup>	nd
CLnA	nd	50,11 ± 0,37 <sup>a</sup>	47,87 ± 1,11 <sup>a</sup>	nd
n-6/n-3	25,25 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,89 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,95 ± 0,04 <sup>b</sup>	25,01 ± 0,05 <sup>a</sup>
AGPI/AGS	2,43 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,63 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,53 ± 0,03 <sup>a,b</sup>	2,44 ± 0,05 <sup>b</sup>

Média dos valores ± desvio padrão; n = 3. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey e pelo teste-t. \*Valores calculados por diferença; \*\*Expresso em kcal 100 g<sup>-1</sup> de ração; 18:2c9t11 e 18:2t10c12 (isômeros do ácido linoleico conjugado - CLA); 18:3c9t11t13 e 18:3t9t11t13 (isômeros do ácido linolênico conjugado - CLnA); alfa-ESA = ácido alfa-eleosteárico; beta-ESA = ácido beta-eleosteárico; nd = não detectado; AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos ω-6; n-3 = somatório de ácidos graxos ω-3; CLA = somatório dos isômeros do ácido linoleico conjugado; CLnA = somatório dos isômeros do ácido linolênico conjugado; n-6/n-3 = razão entre os somatórios de ácidos graxos ω-6 e ω-3; AGPI/AGS = razão entre os somatórios de ácidos graxos poli-insaturados e saturados. Controle: óleo de girassol; TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.



Com relação à composição em ácidos graxos (APÊNDICES E, F, G e H), todas as rações desenvolvidas apresentaram como ácido graxo saturado majoritário o ácido palmítico (16:0) e o maior contribuinte no somatório de ácidos graxos monoinsaturados o ácido oleico (18:1n-9), sendo que não houve diferença significativa ( $p>0,05$ ) entre as quantidades encontradas desses ácidos graxos nos diferentes tratamentos.

Para a classe de ácidos graxos poli-insaturados, foram encontrados valores elevados de ácido linoleico (18:2n-6) nas rações Controle e TIII (391,75 e 388,26 mg g<sup>-1</sup> de LT, respectivamente) em comparação com as rações TI e TII, que apresentaram valores iguais à 278,49 e 258,76 mg g<sup>-1</sup> de LT, respectivamente. No entanto, valores muito superiores do ácido alfa-linolênico (18:3n-3) foram obtidos nas rações TI e TII, 56,96 e 52,24 mg g<sup>-1</sup> de LT, respectivamente, em comparação com as rações Controle e TIII (15,51 e 15,53 mg g<sup>-1</sup> de LT, respectivamente), o que resultou em uma grande diferença entre as razões n-6/n-3 dos tratamentos.

O teor de LNA (18:3n-3) obtido nas rações TI e TII foi aproximadamente 3 vezes superior ao encontrado nas rações Controle e TIII. Isso pode ser explicado pela adição de óleo de chia, que é rico nesse ácido graxo da família n-3, às rações TI e TII, enquanto que nas rações Controle e TIII a fonte lipídica utilizada foi o óleo de girassol, caracterizado por apresentar baixos teores de LNA.

Justi et al. (2003) encontraram a mesma superioridade dos ácidos graxos palmítico (16:0), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6) e alfa-linolênico (18:3n-3), nos tratamentos para tilápias do Nilo suplementados com óleo de linhaça.

Observando-se os ácidos graxos provenientes do óleo de tungue (alfa-ESA e beta-ESA) e isômeros do CLA (18:2c9t11 e 18:2t10c12), adicionados às rações dos Tratamentos I e II, pode-se perceber que houve diferença significativa ( $p<0,05$ ) apenas entre as quantidades

encontradas do isômero 18:2 $\omega$ 10c12 do ácido linoleico conjugado nas rações dos dois tratamentos.

### 5.1.2. Capacidade Antioxidante

Quanto à capacidade antioxidante das rações, os resultados encontrados na aplicação dos ensaios DPPH, FRAP, ABTS e ORAC<sub>FL</sub> estão dispostos na Tabela 3.

**Tabela 3.** Capacidade antioxidante das rações dos tratamentos Controle, TI, TII e TIII determinada por diferentes ensaios ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ )

	DPPH	FRAP	ABTS	H-ORAC <sub>FL</sub>	L-ORAC <sub>FL</sub>	CAT*
Controle	10,24 $\pm$ 0,58 <sup>d</sup>	15,57 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	17,39 $\pm$ 1,00 <sup>c</sup>	36,83 $\pm$ 0,99 <sup>d</sup>	1,28 $\pm$ 0,09 <sup>c</sup>	38,11 $\pm$ 0,99 <sup>d</sup>
TI	14,80 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	16,18 $\pm$ 0,58 <sup>b</sup>	20,29 $\pm$ 0,96 <sup>b</sup>	69,56 $\pm$ 5,29 <sup>a</sup>	2,91 $\pm$ 0,09 <sup>a</sup>	72,47 $\pm$ 5,29 <sup>a</sup>
TII	13,01 $\pm$ 0,56 <sup>c</sup>	15,32 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	20,78 $\pm$ 0,35 <sup>a,b</sup>	50,43 $\pm$ 0,36 <sup>c</sup>	1,36 $\pm$ 0,21 <sup>c</sup>	51,79 $\pm$ 0,41 <sup>c</sup>
TIII	16,31 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	18,11 $\pm$ 0,88 <sup>a</sup>	21,79 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	60,16 $\pm$ 1,82 <sup>b</sup>	1,76 $\pm$ 0,13 <sup>b</sup>	61,92 $\pm$ 1,83 <sup>b</sup>

Média dos valores $\pm$ desvio padrão; n = 4. Diferentes letras na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey. \*Capacidade Antioxidante Total = H-ORAC<sub>FL</sub> + L-ORAC<sub>FL</sub>. Controle: óleo de girassol; TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

Em todos os ensaios aplicados seguindo procedimento QUENCHER (DPPH, FRAP e ABTS), a ração do Tratamento III, com adição de extrato etanólico de resíduo de acerola, foi a que apresentou os maiores valores de capacidade antioxidante. No entanto, de forma geral, todas as rações suplementadas (TI, TII e TIII) apresentaram capacidade antioxidante superior à ração Controle. Exceto na aplicação do ensaio FRAP, em que não foi observada diferença significativa (p>0,05) entre os valores de capacidade antioxidante das rações Controle, TI e TII.

No ensaio ORAC<sub>FL</sub>, a ração do Tratamento I apresentou resultados superiores em ambas frações analisadas (H-ORAC<sub>FL</sub> e L-ORAC<sub>FL</sub>), enquanto que a ração do Tratamento III

apresentou resultados intermediários de capacidade antioxidante, seguida pela ração do Tratamento II que apresentou os menores valores.

A existência de compostos fenólicos, como os ácidos clorogênico e cafeico, miricetina, quercetina e kaempferol, presentes no óleo de chia (Ixtaina et al., 2011), adicionado às rações dos Tratamentos I e II, pode estar relacionada com o fato da ração do Tratamento I ter apresentado alto valor de H-ORAC<sub>FL</sub>, isso porque esses compostos apresentam caráter hidrofílico. Enquanto que o alto valor de capacidade antioxidante encontrado na fração lipofílica (L-ORAC<sub>FL</sub>) para a ração TI pode estar relacionado com a inclusão de vitamina E e também pela existência, em concentrações consideráveis, de tocoferóis no óleo de chia (Ixtaina et al., 2011). No entanto, o mesmo comportamento não foi observado na ração do Tratamento II, indicando um possível efeito antagônico devido à inclusão de selênio na ração desse tratamento.

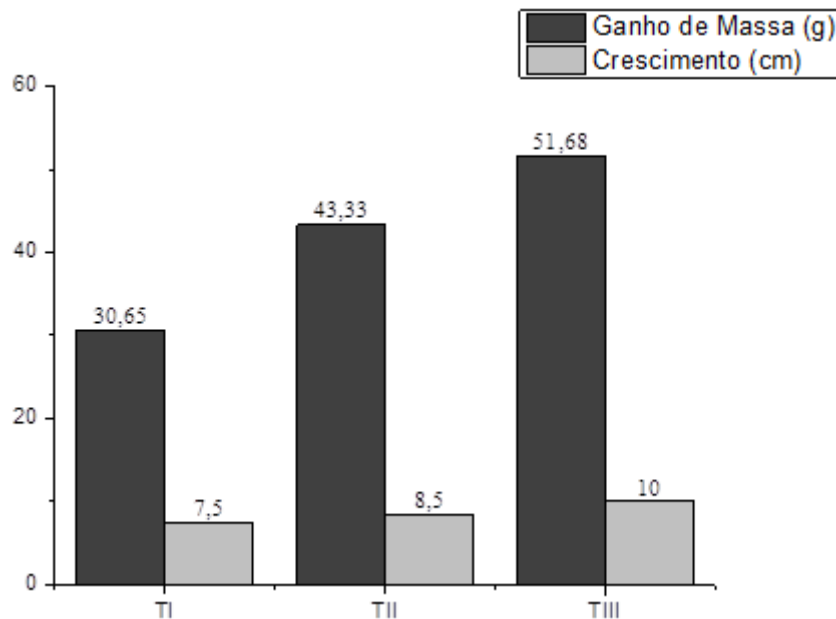
O resultado também elevado de capacidade antioxidante encontrado no ensaio H-ORAC<sub>FL</sub> para a ração do Tratamento III, suplementada com extrato etanólico de resíduo de acerola, foi observado possivelmente porque a acerola apresenta em sua composição compostos fenólicos como os ácidos p-cumárico, ferulico, cafeico e clorogênico, que possuem característica hidrofílica (Vendramini et al., 2004).

Além disso, o ensaio ORAC<sub>FL</sub> indicou que os antioxidantes hidrofílicos são os maiores contribuintes na capacidade antioxidante total (CAT) das rações, sendo responsáveis por mais de 90% do valor total. Resultado semelhante foi observado em diferentes matrizes alimentares, como frutas e vegetais, em estudos realizados por Wu et al. (2004).

## 5.2. Filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*)

### 5.2.1. Crescimento e Ganho de Massa

As diferentes rações suplementadas foram inseridas na dieta dos peixes quando estes apresentavam massa média de 15,00 g e comprimento médio de 6,00 cm. Durante os 60 dias de confinamento as tilápias apresentaram boa aceitabilidade e adaptabilidade frente aos tratamentos empregados, apresentando expressivo crescimento e ganho de massa. A Figura 18 traz o ganho de massa e o crescimento das tilápias que receberam as rações dos Tratamentos I, II e III após os 60 dias de confinamento.



**Figura 18.** Ganho de massa e crescimento das tilápias após 60 dias de confinamento.

As tilápias alimentadas com a ração do Tratamento III apresentaram os maiores crescimentos, seguidas pelas alimentadas com o Tratamento II, enquanto que o menor desenvolvimento foi apresentado pelas tilápias alimentadas com o Tratamento I.

O tamanho médio das tilápias passou de 6,00 cm para 13,50 cm e o peso médio de 15,00 g para 45,65 g para o Tratamento I. As tilápias alimentadas com o Tratamento II passaram de 6,00 cm para 14,50 cm e o peso médio aumentou de 15,00 g para 58,33 g, enquanto que as tilápias que receberam o Tratamento III passaram de 6,00 cm para 16,00 cm e tiveram um grande ganho de massa, passando de 15,00 g para 66,68 g em média ao longo dos 60 dias de experimento.

### **5.2.2. Composição em Ácidos Graxos**

As composições em ácidos graxos dos filés de tilápia em 0, 15, 30, 45 e 60 dias de suplementação com as rações dos Tratamentos I, II e III, são encontradas respectivamente nas Tabelas 4, 5 e 6 (APÊNDICES I, J, K, L, M e N).

Um total de 28 ácidos graxos foram identificados e quantificados nos filés das tilápias alimentadas com os Tratamentos I e II, enquanto que nos filés resultantes do Tratamento III, foram encontrados 23 ácidos graxos. Assim como na composição lipídica das rações desenvolvidas (Tabela 2), o ácido graxo saturado majoritário nos filés de tilápia de todos os tratamentos foi o ácido palmítico (16:0), bem como o maior contribuinte no somatório de ácidos graxos monoinsaturados o ácido oleico (18:1n-9), havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) na quantidade desses ácidos graxos nos diferentes tempos de confinamento.

**Tabela 4.** Composição em ácidos graxos (mg de ácido graxo g<sup>-1</sup> de lipídios totais) dos filés de tilápia nos diferentes tempos de confinamento (Tratamento I)

Ácidos Graxos	0 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias	60 Dias
14:0	19,35±0,85 <sup>a</sup>	13,57±0,20 <sup>c</sup>	11,30±0,14 <sup>d</sup>	17,02±0,05 <sup>b</sup>	16,22±0,37 <sup>b</sup>
16:0	187,16±6,72 <sup>a</sup>	154,21±0,33 <sup>c</sup>	149,01±4,61 <sup>c</sup>	172,15±1,67 <sup>b</sup>	169,36±5,56 <sup>b</sup>
16:1n-9	6,70±0,19 <sup>a</sup>	4,14±0,07 <sup>b</sup>	3,48±0,11 <sup>c</sup>	3,94±0,10 <sup>b</sup>	3,93±0,07 <sup>b</sup>
16:1n-7	37,71±1,03 <sup>a</sup>	25,49±0,13 <sup>c</sup>	21,54±0,78 <sup>d</sup>	27,34±0,32 <sup>b</sup>	24,13±0,87 <sup>c</sup>
16:1n-5	2,05±0,02 <sup>c</sup>	1,90±0,09 <sup>c</sup>	1,91±0,02 <sup>c</sup>	2,95±0,11 <sup>a</sup>	2,63±0,11 <sup>b</sup>
18:0	56,81±2,39 <sup>b</sup>	57,52±0,44 <sup>b</sup>	57,98±2,74 <sup>b</sup>	61,87±0,56 <sup>a,b</sup>	65,33±3,27 <sup>a</sup>
18:1n-11	2,84±0,08 <sup>a</sup>	1,86±0,07 <sup>c</sup>	0,98±0,05 <sup>e</sup>	2,25±0,08 <sup>b</sup>	1,64±0,02 <sup>d</sup>
18:1n-9	246,52±8,53 <sup>a</sup>	219,19±0,76 <sup>b</sup>	203,95±6,20 <sup>b</sup>	245,20±4,14 <sup>a</sup>	241,31±7,41 <sup>a</sup>
18:1n-7	21,58±0,88 <sup>a</sup>	19,74±0,14 <sup>a,b</sup>	17,94±0,71 <sup>b</sup>	20,58±0,73 <sup>a</sup>	18,71±0,74 <sup>b</sup>
18:2n-6	122,32±4,48 <sup>c</sup>	130,52±1,14 <sup>c</sup>	144,88±3,86 <sup>b</sup>	153,24±2,08 <sup>a,b</sup>	156,59±5,32 <sup>a</sup>
18:3n-6	6,87±0,27 <sup>a</sup>	5,27±0,17 <sup>b</sup>	4,67±0,27 <sup>b</sup>	5,02±0,18 <sup>b</sup>	4,83±0,28 <sup>b</sup>
18:3n-3	6,56±0,20 <sup>d</sup>	11,07±0,34 <sup>c</sup>	15,14±0,55 <sup>b</sup>	18,00±0,12 <sup>a</sup>	19,03±0,80 <sup>a</sup>
18:2c9t11	nd	4,71±0,21 <sup>d</sup>	8,29±0,35 <sup>c</sup>	10,17±0,36 <sup>b</sup>	11,49±0,54 <sup>a</sup>
19:2n-7	nd	1,36±0,05 <sup>b,c</sup>	1,33±0,09 <sup>c</sup>	1,56±0,07 <sup>a</sup>	1,51±0,08 <sup>a,b</sup>
18:2t10c12	nd	3,69±0,06 <sup>c</sup>	5,76±0,18 <sup>b</sup>	7,25±0,35 <sup>a</sup>	7,96±0,40 <sup>a</sup>
20:1n-9	12,04±0,30 <sup>b</sup>	11,09±0,28 <sup>b,c</sup>	10,55±0,81 <sup>c</sup>	13,46±0,45 <sup>a</sup>	12,30±0,38 <sup>a,b</sup>
20:2n-6	2,73±0,10 <sup>a</sup>	1,90±0,04 <sup>b</sup>	1,08±0,04 <sup>d</sup>	1,28±0,07 <sup>c</sup>	1,06±0,04 <sup>d</sup>
20:3n-6	6,06±0,11 <sup>c</sup>	6,38±0,08 <sup>c</sup>	6,76±0,20 <sup>b</sup>	7,14±0,06 <sup>a</sup>	6,75±0,18 <sup>b</sup>
21:0	9,85±0,36 <sup>a</sup>	9,77±0,27 <sup>a</sup>	8,70±0,32 <sup>b</sup>	8,07±0,19 <sup>b,c</sup>	7,61±0,21 <sup>c</sup>
20:4n-6 (AA)	15,71±0,41 <sup>a</sup>	16,55±0,36 <sup>a</sup>	15,85±0,57 <sup>a</sup>	10,82±0,23 <sup>b</sup>	10,69±0,20 <sup>b</sup>
20:4n-3	1,14±0,05 <sup>e</sup>	2,16±0,09 <sup>d</sup>	2,73±0,08 <sup>c</sup>	3,07±0,14 <sup>b</sup>	3,46±0,15 <sup>a</sup>
18:3c9t11t13 (alfa-ESA)	nd	4,58±0,05 <sup>d</sup>	7,06±0,11 <sup>c</sup>	9,61±0,10 <sup>b</sup>	10,51±0,08 <sup>a</sup>
20:5n-3 (EPA)	1,35±0,07 <sup>a</sup>	1,14±0,05 <sup>b</sup>	0,96±0,02 <sup>c</sup>	0,92±0,03 <sup>c</sup>	0,85±0,03 <sup>c</sup>
18:3t9t11t13 (beta-ESA)	nd	0,99±0,04 <sup>d</sup>	1,57±0,10 <sup>c</sup>	2,23±0,09 <sup>b</sup>	2,50±0,05 <sup>a</sup>
22:4n-6	7,12±0,15 <sup>a</sup>	6,44±0,20 <sup>b</sup>	5,70±0,24 <sup>c</sup>	4,50±0,08 <sup>d</sup>	3,79±0,11 <sup>e</sup>
22:5n-6	14,66±0,54 <sup>a</sup>	14,55±0,30 <sup>a</sup>	13,34±0,47 <sup>b</sup>	7,84±0,19 <sup>c</sup>	6,75±0,26 <sup>d</sup>
24:0	3,68±0,12 <sup>a</sup>	3,04±0,05 <sup>b</sup>	2,85±0,07 <sup>b</sup>	2,22±0,08 <sup>c</sup>	2,41±0,04 <sup>c</sup>
22:6n-3 (DHA)	14,67±0,64 <sup>a</sup>	12,79±0,39 <sup>b</sup>	11,73±0,40 <sup>b</sup>	6,74±0,25 <sup>c</sup>	6,45±0,04 <sup>c</sup>
AGS	276,84±7,19 <sup>a</sup>	238,10±0,65 <sup>b</sup>	229,85±5,38 <sup>b</sup>	261,33±1,78 <sup>a</sup>	260,93±6,47 <sup>a</sup>
AGMI	329,44±8,65 <sup>a</sup>	283,42±0,84 <sup>c</sup>	260,34±6,35 <sup>d</sup>	315,73±4,25 <sup>a,b</sup>	304,64±7,51 <sup>b</sup>
AGPI	199,19±4,59 <sup>c</sup>	224,10±1,38 <sup>b</sup>	246,85±4,04 <sup>a</sup>	249,40±2,20 <sup>a</sup>	254,21±5,45 <sup>a</sup>
n-6	175,47±4,54 <sup>b</sup>	181,61±1,26 <sup>a,b</sup>	192,29±3,95 <sup>a</sup>	189,84±2,11 <sup>a</sup>	190,46±5,34 <sup>a</sup>
n-3	23,72±0,68 <sup>c</sup>	27,16±0,53 <sup>b</sup>	30,56±0,68 <sup>a</sup>	28,73±0,31 <sup>a,b</sup>	29,78±0,82 <sup>a</sup>
CLA	nd	8,39±0,22 <sup>d</sup>	14,05±0,39 <sup>c</sup>	17,43±0,50 <sup>b</sup>	19,45±0,67 <sup>a</sup>
CLnA	nd	5,57±0,07 <sup>d</sup>	8,63±0,14 <sup>c</sup>	11,84±0,13 <sup>b</sup>	13,01±0,09 <sup>a</sup>
n-6/n-3	7,40±0,04 <sup>a</sup>	6,69±0,02 <sup>b</sup>	6,29±0,03 <sup>c</sup>	6,61±0,02 <sup>b,c</sup>	6,39±0,04 <sup>b,c</sup>
AGPI/AGS	0,72±0,03 <sup>d</sup>	0,94±0,01 <sup>c</sup>	1,07±0,03 <sup>a</sup>	0,95±0,01 <sup>b,c</sup>	0,97±0,03 <sup>b</sup>

Média dos valores±desvio padrão; n = 3. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey. 18:2c9t11 e 18:2t10c12 (isômeros do ácido linoleico conjugado - CLA); 18:3c9t11t13 e 18:3t9t11t13 (isômeros do ácido linolênico conjugado - CLnA); alfa-ESA = ácido alfa-eleosteárico; beta-ESA = ácido beta-eleosteárico; AA = ácido araquidônico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DHA = ácido

docosahexaenoico; nd = não detectado; AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos  $\omega$ -6; n-3 = somatório de ácidos graxos  $\omega$ -3; CLA = somatório dos isômeros do ácido linoleico conjugado; CLnA = somatório dos isômeros do ácido linolênico conjugado; n-6/n-3 = razão entre os somatórios de ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3; AGPI/AGS = razão entre os somatórios de ácidos graxos poli-insaturados e saturados. TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E.

**Tabela 5.** Composição em ácidos graxos (mg de ácido graxo g<sup>-1</sup> de lipídios totais) dos filés de tilápia nos diferentes tempos de confinamento (Tratamento II)

Ácidos Graxos	0 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias	60 Dias
14:0	19,35±0,85 <sup>a</sup>	14,23±0,27 <sup>c</sup>	12,88±0,17 <sup>d</sup>	15,67±0,08 <sup>b</sup>	16,36±0,03 <sup>b</sup>
16:0	187,16±6,72 <sup>a</sup>	153,79±3,46 <sup>c</sup>	150,70±3,15 <sup>c</sup>	158,12±1,97 <sup>c</sup>	171,17±0,81 <sup>b</sup>
16:1n-9	6,70±0,19 <sup>a</sup>	4,25±0,14 <sup>b</sup>	3,74±0,09 <sup>c</sup>	4,00±0,14 <sup>b,c</sup>	4,15±0,01 <sup>b</sup>
16:1n-7	37,71±1,03 <sup>a</sup>	24,64±0,68 <sup>b</sup>	20,66±0,35 <sup>c</sup>	23,59±0,06 <sup>b</sup>	24,69±0,22 <sup>b</sup>
16:1n-5	2,05±0,02 <sup>c</sup>	1,94±0,07 <sup>d</sup>	2,02±0,03 <sup>c,d</sup>	2,81±0,01 <sup>b</sup>	3,21±0,01 <sup>a</sup>
18:0	56,81±2,39 <sup>b</sup>	58,38±1,47 <sup>b</sup>	61,52±1,24 <sup>a,b</sup>	60,01±0,61 <sup>a,b</sup>	64,01±2,79 <sup>a</sup>
18:1n-11	2,84±0,08 <sup>a</sup>	2,06±0,04 <sup>c,d</sup>	1,94±0,02 <sup>d</sup>	2,17±0,08 <sup>b,c</sup>	2,22±0,02 <sup>b</sup>
18:1n-9	246,52±8,53 <sup>a</sup>	220,68±2,96 <sup>b,c</sup>	207,93±2,78 <sup>c</sup>	223,76±0,25 <sup>b,c</sup>	229,54±9,85 <sup>b</sup>
18:1n-7	21,58±0,88 <sup>a</sup>	19,43±0,70 <sup>b</sup>	17,66±0,47 <sup>c</sup>	18,71±0,06 <sup>b,c</sup>	18,89±0,66 <sup>b,c</sup>
18:2n-6	122,32±4,48 <sup>b</sup>	126,57±3,43 <sup>b</sup>	137,09±3,21 <sup>a</sup>	145,64±0,16 <sup>a</sup>	144,41±4,57 <sup>a</sup>
18:3n-6	6,87±0,27 <sup>a</sup>	5,38±0,17 <sup>b</sup>	4,92±0,20 <sup>b</sup>	5,24±0,03 <sup>b</sup>	5,06±0,20 <sup>b</sup>
18:3n-3	6,56±0,20 <sup>d</sup>	12,16±0,40 <sup>c</sup>	15,51±0,68 <sup>b</sup>	17,81±0,01 <sup>a</sup>	18,58±0,18 <sup>a</sup>
18:2c9t11	nd	5,80±0,19 <sup>c</sup>	9,13±0,20 <sup>b</sup>	10,89±0,04 <sup>a</sup>	11,16±0,47 <sup>a</sup>
19:2n-7	nd	1,61±0,04 <sup>c</sup>	1,66±0,04 <sup>b,c</sup>	1,75±0,04 <sup>a</sup>	1,72±0,03 <sup>a,b</sup>
18:2t10c12	nd	4,25±0,15 <sup>c</sup>	6,58±0,13 <sup>b</sup>	7,66±0,01 <sup>a</sup>	8,01±0,19 <sup>a</sup>
20:1n-9	12,04±0,30 <sup>c</sup>	13,26±0,22 <sup>a</sup>	12,48±0,30 <sup>b,c</sup>	13,45±0,06 <sup>a</sup>	13,03±0,41 <sup>a,b</sup>
20:2n-6	2,73±0,10 <sup>a</sup>	2,03±0,08 <sup>b</sup>	1,59±0,06 <sup>c</sup>	1,52±0,01 <sup>c</sup>	1,43±0,01 <sup>c</sup>
20:3n-6	6,06±0,11 <sup>d</sup>	6,61±0,14 <sup>b,c</sup>	6,85±0,18 <sup>a,b</sup>	7,08±0,09 <sup>a</sup>	6,43±0,15 <sup>c</sup>
21:0	9,85±0,36 <sup>a</sup>	9,19±0,05 <sup>b</sup>	8,78±0,36 <sup>b</sup>	8,01±0,13 <sup>c</sup>	7,43±0,11 <sup>c</sup>
20:4n-6 (AA)	15,71±0,41 <sup>a</sup>	14,29±0,41 <sup>b</sup>	12,73±0,37 <sup>c</sup>	11,52±0,14 <sup>d</sup>	9,65±0,13 <sup>e</sup>
20:4n-3	1,14±0,05 <sup>d</sup>	2,58±0,09 <sup>c</sup>	3,24±0,11 <sup>b</sup>	3,48±0,05 <sup>a</sup>	3,33±0,11 <sup>a,b</sup>
18:3c9t11t13 (alfa-ESA)	nd	5,43±0,22 <sup>c</sup>	7,99±0,25 <sup>b</sup>	9,69±0,01 <sup>a</sup>	10,14±0,32 <sup>a</sup>
20:5n-3 (EPA)	1,35±0,07 <sup>a</sup>	1,16±0,02 <sup>b</sup>	0,98±0,04 <sup>c</sup>	0,98±0,02 <sup>c</sup>	0,89±0,02 <sup>c</sup>
18:3t9t11t13 (beta-ESA)	nd	1,19±0,03 <sup>d</sup>	2,20±0,09 <sup>c</sup>	2,62±0,04 <sup>b</sup>	2,86±0,10 <sup>a</sup>
22:4n-6	7,12±0,15 <sup>a</sup>	6,17±0,10 <sup>b</sup>	5,29±0,24 <sup>c</sup>	4,49±0,02 <sup>d</sup>	3,97±0,01 <sup>e</sup>
22:5n-6	14,66±0,54 <sup>a</sup>	13,97±0,12 <sup>a</sup>	12,54±0,69 <sup>b</sup>	10,37±0,16 <sup>c</sup>	8,32±0,10 <sup>d</sup>
24:0	3,68±0,12 <sup>a</sup>	3,18±0,09 <sup>b</sup>	2,91±0,13 <sup>c</sup>	2,52±0,05 <sup>d</sup>	2,21±0,04 <sup>e</sup>
22:6n-3 (DHA)	14,67±0,64 <sup>a</sup>	11,60±0,02 <sup>b</sup>	9,45±0,49 <sup>c</sup>	7,06±0,25 <sup>d</sup>	5,57±0,09 <sup>e</sup>
AGS	276,84±7,19 <sup>a</sup>	238,78±3,77 <sup>c</sup>	236,79±3,41 <sup>c</sup>	244,32±2,07 <sup>c</sup>	261,17±2,90 <sup>b</sup>
AGMI	329,44±8,65 <sup>a</sup>	286,26±3,13 <sup>b</sup>	266,41±2,86 <sup>c</sup>	288,49±0,32 <sup>b</sup>	295,74±9,88 <sup>b</sup>
AGPI	199,19±4,59 <sup>c</sup>	220,81±3,51 <sup>b</sup>	237,75±3,45 <sup>a</sup>	247,81±0,39 <sup>a</sup>	241,53±4,63 <sup>a</sup>
n-6	175,47±4,54 <sup>a</sup>	175,02±3,47 <sup>a</sup>	181,01±3,33 <sup>a</sup>	185,86±0,28 <sup>a</sup>	179,27±4,58 <sup>a</sup>

n-3	23,72±0,68 <sup>b</sup>	27,50±0,41 <sup>a</sup>	29,18±0,84 <sup>a</sup>	29,33±0,26 <sup>a</sup>	28,37±0,23 <sup>a</sup>
CLA	nd	10,05±0,24 <sup>c</sup>	15,71±0,24 <sup>b</sup>	18,55±0,04 <sup>a</sup>	19,17±0,51 <sup>a</sup>
CLnA	nd	6,63±0,22 <sup>c</sup>	10,19±0,27 <sup>b</sup>	12,32±0,04 <sup>a</sup>	13,01±0,33 <sup>a</sup>
n-6/n-3	7,40±0,04 <sup>a</sup>	6,36±0,02 <sup>b</sup>	6,20±0,03 <sup>b</sup>	6,34±0,01 <sup>b</sup>	6,32±0,03 <sup>b</sup>
AGPI/AGS	0,72±0,03 <sup>c</sup>	0,92±0,02 <sup>b</sup>	1,00±0,02 <sup>a</sup>	1,01±0,01 <sup>a</sup>	0,92±0,02 <sup>b</sup>

Média dos valores±desvio padrão; n = 3. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. 18:2c9t11 e 18:2t10c12 (isômeros do ácido linoleico conjugado - CLA); 18:3c9t11t13 e 18:3t9t11t13 (isômeros do ácido linolênico conjugado - CLnA); alfa-ESA = ácido alfa-eleosteárico; beta-ESA = ácido beta-eleosteárico; AA = ácido araquidônico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico; nd = não detectado; AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos  $\omega$ -6; n-3 = somatório de ácidos graxos  $\omega$ -3; CLA = somatório dos isômeros do ácido linoleico conjugado; CLnA = somatório dos isômeros do ácido linolênico conjugado; n-6/n-3 = razão entre os somatórios de ácidos graxos  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3; AGPI/AGS = razão entre os somatórios de ácidos graxos poli-insaturados e saturados. TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio.

Com relação aos ácidos graxos poli-insaturados encontrados nos filés dos Tratamentos I e II (Tabelas 4 e 5), pode-se destacar a incorporação do ácido graxo essencial alfa-linolênico (18:3n-3), precursor da família de ácidos graxos ômega-3, nos filés de tilápia. Esse ácido graxo incorporado à dieta dos peixes por meio da suplementação da ração com óleo de chia, resultou em um aumento de 2,90 e 2,83 vezes o teor desse ácido graxo nos filés das tilápias alimentadas com os Tratamentos I e II, respectivamente, ao longo dos 60 dias de experimento. Os resultados obtidos foram superiores aos encontrados por Visentainer et al. (2005) na suplementação de tilápias do Nilo com óleo de linhaça, onde foi observada a incorporação de 18,8 mg de LNA g<sup>-1</sup> de LT nos filés suplementados com 1,25% de óleo de linhaça, enquanto que no presente trabalho, níveis semelhantes do ácido alfa-linolênico foram alcançados utilizando-se apenas 0,63% de óleo de chia na composição alimentar dos tratamentos, em um menor período de suplementação.

Analisando-se a incorporação do ácido linoleico conjugado (CLA), pode-se perceber uma predominância do isômero c9, t11 em relação ao isômero t10, c12, nos filés de ambos os Tratamentos (I e II). Sendo que a quantidade nesses ácidos graxos foi aumentada de 4,71 mg g<sup>-1</sup> de LT para 11,49 mg g<sup>-1</sup> de LT (18:2c9t11) e de 3,69 mg g<sup>-1</sup> de LT para 7,96 mg g<sup>-1</sup> de LT (18:2t10c12) nos filés das tilápias que receberam o Tratamento I, enquanto que nos filés



resultantes da alimentação com o Tratamento II um aumento de 5,80 mg g<sup>-1</sup> de LT para 11,16 mg g<sup>-1</sup> de LT foi encontrado para o isômero 18:2c9t11 e uma elevação de 4,25 mg g<sup>-1</sup> de LT para 8,01 mg g<sup>-1</sup> de LT foi verificada para o isômero 18:2t10c12.

Em geral, os resultados obtidos foram superiores aos encontrados em produtos lácteos e carne de ruminantes (fontes naturais de CLA), os quais possuem níveis muito baixos de CLA, ao redor de 3 e 6 mg g<sup>-1</sup> de LT (Santos et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Santos, Furuya, Matsushita, Silva, Silva & Botaro (2007) na suplementação de tilápias do Nilo utilizando 2% de CLA por um período de 90 dias.

A suplementação com óleo de tungue nas rações dos Tratamentos I e II resultou na incorporação dos ácidos linolênico conjugados (CLnAs) alfa-ESA e beta-ESA nos filés das tilápias, com superioridade do primeiro nos filés de ambos os tratamentos. Um aumento de mais de duas vezes do valor inicial desses ácidos graxos foi verificado, exceto para o ácido graxo alfa-ESA nos filés do Tratamento II, o qual apresentou um aumento de apenas 1,87 em relação ao valor inicial.

Foi verificada uma diminuição nas razões n-6/n-3 e um aumento nas razões AGPI/AGS nos diferentes tempos de confinamento nos filés dos Tratamentos I e II. Os valores de AGPI/AGS ao redor de 1,00 para os filés de ambos os tratamentos estão dentro do recomendado por Simopoulos (2002a), no qual afirma que valores inferiores a 0,4 não são adequados para a saúde em relação à prevenção de doenças cardíacas.

Como os filés referentes ao tempo zero foram oriundos da alimentação com a ração Controle, estes não apresentaram os diferentes ácidos graxos (18:2c9t11; 18:2t10c12; alfa-ESA e beta-ESA) incorporados às rações dos Tratamentos I e II.

Analisando-se a composição em ácidos graxos poli-insaturados dos filés que receberam o Tratamento III (Tabela 6), pode-se perceber que o ácido linoleico (18:2n-6), assim como nos filés dos Tratamentos I e II, é o componente principal desse grupo de ácidos graxos, porém os

valores encontrados para esse ácido graxo essencial, precursor da família de ácidos graxos ômega-6, foram superiores aos obtidos nos filés das tilápias que receberam os Tratamentos I e II, chegando ao valor máximo de 207,12 mg g<sup>-1</sup> de LT no período de 60 dias de confinamento. No entanto, valores muito inferiores do ácido graxo alfa-linolênico (18:3n-3) foram apresentados nos filés das tilápias que receberam o Tratamento III em comparação com os filés dos demais tratamentos desenvolvidos. Sendo que, os valores obtidos foram aproximadamente 3 vezes menores que os encontrados nos filés dos Tratamentos I e II. Essa diferença foi evidenciada nas razões n-6/n-3 que alcançaram valores muito acima do recomendado (Simopoulos, 2002b), mostrando a influência direta da alimentação na composição e qualidade da carne do pescado (Visentainer et al., 2005).

**Tabela 6.** Composição em ácidos graxos (mg de ácido graxo g<sup>-1</sup> de lipídios totais) dos filés de tilápia nos diferentes tempos de confinamento (Tratamento III)

Ácidos Graxos	0 Dias	15 Dias	30 Dias	45 Dias	60 Dias
14:0	19,35±0,85 <sup>b</sup>	14,80±0,59 <sup>c</sup>	14,25±0,63 <sup>c</sup>	14,40±0,60 <sup>c</sup>	22,25±0,90 <sup>a</sup>
16:0	187,16±6,72 <sup>a</sup>	163,86±3,59 <sup>b</sup>	164,51±4,30 <sup>b</sup>	159,28±5,83 <sup>b</sup>	199,36±0,52 <sup>a</sup>
16:1n-9	6,70±0,19 <sup>a</sup>	5,12±0,08 <sup>c</sup>	4,69±0,22 <sup>c</sup>	4,81±0,26 <sup>c</sup>	5,76±0,08 <sup>b</sup>
16:1n-7	37,71±1,03 <sup>a</sup>	28,42±0,76 <sup>b</sup>	26,64±1,23 <sup>b</sup>	27,10±1,46 <sup>b</sup>	36,75±0,79 <sup>a</sup>
16:1n-5	2,05±0,02 <sup>c</sup>	2,35±0,05 <sup>b,c</sup>	3,34±0,32 <sup>a</sup>	2,48±0,11 <sup>b</sup>	2,67±0,16 <sup>b</sup>
18:0	56,81±2,39 <sup>a</sup>	52,24±0,84 <sup>b</sup>	50,22±0,78 <sup>b</sup>	46,31±0,95 <sup>c</sup>	52,90±1,44 <sup>b</sup>
18:1n-11	2,84±0,08 <sup>a</sup>	2,09±0,07 <sup>c,d</sup>	1,90±0,10 <sup>d</sup>	2,28±0,05 <sup>c</sup>	2,59±0,15 <sup>b</sup>
18:1n-9	246,52±8,53 <sup>c</sup>	241,65±9,71 <sup>c,d</sup>	228,61±5,95 <sup>d</sup>	301,27±3,26 <sup>a</sup>	264,77±4,11 <sup>b</sup>
18:1n-7	21,58±0,88 <sup>a</sup>	21,29±0,38 <sup>a</sup>	20,80±0,78 <sup>a</sup>	20,18±1,52 <sup>a</sup>	21,56±0,07 <sup>a</sup>
18:2n-6	122,32±4,48 <sup>e</sup>	150,24±2,11 <sup>d</sup>	179,25±3,17 <sup>c</sup>	189,62±2,48 <sup>b</sup>	207,12±3,17 <sup>a</sup>
18:3n-6	6,87±0,27 <sup>c,d</sup>	6,80±0,16 <sup>d</sup>	7,58±0,42 <sup>b,c</sup>	7,80±0,17 <sup>b</sup>	8,97±0,42 <sup>a</sup>
18:3n-3	6,56±0,20 <sup>b</sup>	5,61±0,21 <sup>d</sup>	5,95±0,05 <sup>c,d</sup>	6,16±0,07 <sup>b,c</sup>	7,03±0,26 <sup>a</sup>
20:1n-9	12,04±0,30 <sup>a</sup>	11,67±0,10 <sup>a</sup>	9,82±0,29 <sup>b</sup>	10,21±0,35 <sup>b</sup>	10,40±0,22 <sup>b</sup>
20:2n-6	2,73±0,10 <sup>a</sup>	2,47±0,03 <sup>b</sup>	1,83±0,11 <sup>d</sup>	1,88±0,04 <sup>c,d</sup>	2,05±0,02 <sup>c</sup>
20:3n-6	6,06±0,11 <sup>c</sup>	6,91±0,10 <sup>b</sup>	7,99±0,04 <sup>a</sup>	7,98±0,28 <sup>a</sup>	8,37±0,21 <sup>a</sup>
21:0	9,85±0,36 <sup>b,c</sup>	10,04±0,25 <sup>b,c</sup>	10,44±0,17 <sup>a,b</sup>	9,80±0,15 <sup>c</sup>	10,72±0,15 <sup>a</sup>
20:4n-6 (AA)	15,71±0,41 <sup>b</sup>	15,99±0,66 <sup>b</sup>	17,63±0,49 <sup>a</sup>	14,72±0,69 <sup>b</sup>	16,05±0,25 <sup>b</sup>
20:4n-3	1,14±0,05 <sup>a</sup>	1,04±0,05 <sup>a,b</sup>	1,12±0,06 <sup>a,b</sup>	1,01±0,03 <sup>b</sup>	1,04±0,02 <sup>a,b</sup>
20:5n-3 (EPA)	1,35±0,07 <sup>a</sup>	0,75±0,04 <sup>b</sup>	0,65±0,04 <sup>b,c</sup>	0,61±0,03 <sup>c</sup>	0,64±0,04 <sup>b,c</sup>
22:4n-6	7,12±0,15 <sup>b</sup>	7,69±0,26 <sup>a</sup>	8,02±0,10 <sup>a</sup>	6,73±0,04 <sup>b,c</sup>	6,68±0,20 <sup>c</sup>
22:5n-6	14,66±0,54 <sup>c</sup>	18,30±0,70 <sup>b</sup>	22,23±0,47 <sup>a</sup>	16,98±0,57 <sup>b</sup>	17,60±0,20 <sup>b</sup>
24:0	3,68±0,12 <sup>a</sup>	2,09±0,09 <sup>b</sup>	1,77±0,03 <sup>c</sup>	1,26±0,03 <sup>d</sup>	1,14±0,02 <sup>d</sup>
22:6n-3 (DHA)	14,67±0,64 <sup>a</sup>	9,37±0,45 <sup>b</sup>	8,26±0,27 <sup>c</sup>	5,24±0,30 <sup>d</sup>	4,82±0,01 <sup>d</sup>
AGS	276,84±7,19 <sup>a</sup>	243,03±3,74 <sup>b</sup>	241,19±4,42 <sup>b</sup>	231,05±5,94 <sup>b</sup>	286,37±1,78 <sup>a</sup>
AGMI	329,44±8,65 <sup>b,c</sup>	312,57±9,75 <sup>c,d</sup>	295,79±6,15 <sup>d</sup>	368,33±3,91 <sup>a</sup>	344,50±4,20 <sup>b</sup>
AGPI	199,19±4,59 <sup>d</sup>	225,19±2,40 <sup>c</sup>	260,51±3,29 <sup>b</sup>	258,72±2,68 <sup>b</sup>	280,36±3,23 <sup>a</sup>
n-6	175,47±4,54 <sup>d</sup>	208,42±2,34 <sup>c</sup>	244,53±3,28 <sup>b</sup>	245,71±2,66 <sup>b</sup>	266,82±3,22 <sup>a</sup>
n-3	23,72±0,68 <sup>a</sup>	16,77±0,50 <sup>b</sup>	15,98±0,28 <sup>b</sup>	13,01±0,31 <sup>c</sup>	13,54±0,26 <sup>c</sup>
n-6/n-3	7,40±0,04 <sup>e</sup>	12,43±0,03 <sup>d</sup>	15,30±0,02 <sup>c</sup>	18,88±0,03 <sup>b</sup>	19,71±0,02 <sup>a</sup>
AGPI/AGS	0,72±0,03 <sup>d</sup>	0,93±0,02 <sup>c</sup>	1,08±0,02 <sup>a</sup>	1,12±0,03 <sup>a</sup>	0,98±0,01 <sup>b</sup>

Média dos valores±desvio padrão; n = 3. Diferentes letras na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey. AA = ácido araquidônico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenoico. AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poli-insaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos ω-6; n-3 = somatório de ácidos graxos ω-3; n-6/n-3 = razão entre os somatórios de ácidos graxos ω-6 e ω-3; AGPI/AGS = razão entre os somatórios de ácidos graxos poli-insaturados e saturados. TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

Os níveis de EPA (20:5n-3), DHA (22:6n-3) e AA (20:4n-6), importantes ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AGPI-CL), diminuíram ao longo dos 60 dias de experimento

nos filés dos Tratamentos I e II. O mesmo comportamento foi verificado por Santos et al. (2009) na suplementação de dietas para pacu com CLA. De acordo com Berge, Ruyter & Asgard (2004), o CLA afeta o metabolismo dos ácidos graxos de tal forma a contribuir para uma utilização mais eficiente dos ácidos graxos essenciais e para menor deposição dos ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa. Além disso, a suplementação com CLA inibe a produção de ácidos graxos adipogênicos, como o ácido araquidônico (AA) (Santos et al., 2007).

No entanto, nos filés do Tratamento III, um aumento no teor do AA foi verificado devido à ocorrência em altos níveis do ácido graxo precursor da família  $\omega$ -6 (18:2n-6), enquanto que uma redução foi apresentada nos teores do EPA e DHA, pela baixa ocorrência nesse tratamento do ácido alfa-linolênico (18:3n-3), precursor da família de ácidos graxos  $\omega$ -3. Além disso, durante o processo de alongação e dessaturação, os dois grupos de ácidos graxos compartilham as mesmas enzimas responsáveis pela conversão dos ácidos graxos de cadeia longa. Com isso, existe uma competição entre os ácidos graxos n-3 e n-6, onde o excesso de um grupo causa um significativo decréscimo no rendimento de conversão do outro (Dubois et al., 2007).

### **5.2.3. Índices de Qualidade Nutricional**

Para estimar a qualidade lipídica de um alimento são aplicados três índices que avaliam a qualidade nutricional com respeito a composição em ácidos graxos. São eles, os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT) e a razão entre os ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH).

Os índices de aterogenicidade (IA) e trombogenicidade (IT), relacionam os ácidos graxos pró e antiaterogênicos e pró e antitrombogênicos, respectivamente. Quanto menores os valores de ambos os índices, melhor será a qualidade nutricional da dieta, reduzindo o risco

potencial para doenças cardiovasculares. Enquanto que a razão entre os ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH) considera o efeito específico dos ácidos graxos no metabolismo do colesterol, sendo que altos valores desta relação são desejáveis (Filho, Ramos, Hiane & Souza, 2010).

Os índices (IA e IT) e a razão (HH) foram calculados com base na composição em ácidos graxos dos filés do tempo zero e também dos filés resultantes dos Tratamentos I, II e III no período máximo de suplementação (60 dias). Os resultados encontrados estão dispostos na Tabela 7.

**Tabela 7.** Qualidade nutricional da fração lipídica dos filés determinada a partir dos índices de aterogenicidade (IA), trombogenicidade (IT) e razão entre ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos (HH)

Índices	Tempo Zero	60 Dias		
		Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
IA	0,50	0,45	0,47	0,46
IT	0,81	0,74	0,78	0,79
HH	1,97	2,34	2,18	2,26

IA = Índice de Aterogenicidade =  $[(4 \times 14:0) + 16:0] / [\Sigma \text{MUFA} + \Sigma (n-6) + \Sigma (n-3)]$ ; 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 =  $[(\Sigma 18:1\text{cis-9}, 18:2n-6, 20:4n-6, 18:3n-3, 20:5n-3, 22:6n-3) / (\Sigma 14:0 \text{ e } 16:0)]$  (Filho et al., 2010).

A qualidade nutricional da fração lipídica das amostras de filé analisadas (Tabela 7) indicou menores índices de aterogenicidade (IA) e de trombogenicidade (IT) para os filés resultantes do Tratamento I, quando comparados com os filés dos demais tratamentos e com os filés do tempo zero. Além disso, a razão entre os ácidos graxos hipocolesterolêmicos e hipercolesterolêmicos foi mais alta para os filés deste mesmo tratamento. Entretanto, de forma geral os filés resultantes da alimentação com as rações formuladas (Tratamentos I, II e III)

apresentaram melhor qualidade lipídica quando comparados com os filés provenientes da alimentação com a ração Controle (Tempo Zero).

#### **5.2.4. Capacidade Antioxidante**

Para a determinação da capacidade antioxidante dos filés de tilápia foram aplicados também os ensaios DPPH, FRAP e ABTS, seguindo procedimento QUENCHER, e analisadas as frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) e lipofílicas (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub>. Os resultados obtidos encontram-se nas Tabelas 8, 9, 10, 11 e 12, respectivamente.

Analisando-se primeiramente os resultados obtidos no ensaio DPPH (Tabela 8), ao longo do período de confinamento foi possível observar um comportamento semelhante entre os tratamentos. Como os filés referentes ao tempo zero tiveram a mesma origem os resultados são os mesmos para todos os tratamentos. A partir desse ponto os filés dos Tratamentos I, II e III apresentaram um aumento na capacidade antioxidante após 15 dias de suplementação, sendo esse aumento mais significativo nos filés dos Tratamentos I e III (Tabela 8). Logo após, no período de 30 dias de confinamento, foi observado um decréscimo na capacidade antioxidante nos filés resultantes de todos os tratamentos, sendo que a capacidade antioxidante foi reduzida de 18,58  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  para 13,69  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  nos filés do Tratamento I, de 15,13  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  para 13,29  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  nos filés do Tratamento II e a redução apresentada pelos filés do Tratamento III foi de 17,79  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  para 13,62  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ . Esses valores de capacidade antioxidante foram mantidos durante o período de 45 dias, com um ligeiro aumento no período final de confinamento (60 dias).

Comparando-se a capacidade antioxidante entre os filés de todos os tratamentos, foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) apenas nos períodos de 15 e 60 dias de suplementação (Tabela 8). Onde, no período de 15 dias, os filés dos Tratamentos I e III

apresentaram os maiores valores de capacidade antioxidante ( $18,58 \mu\text{mol ET g}^{-1}$  e  $17,79 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ , respectivamente) e os filés do Tratamento II o menor valor de  $15,13 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ . Enquanto que no período de 60 dias, os filés do Tratamento III, com adição de extrato etanólico de resíduo de acerola, continuaram apresentando maior valor de capacidade antioxidante e os filés dos Tratamentos I e II valores ligeiramente inferiores.

**Tabela 8.** Capacidade antioxidante dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio DPPH ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ )

	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	$14,94 \pm 0,46^{b;A}$	$14,94 \pm 0,46^{a,b;A}$	$14,94 \pm 0,46^{b;A}$
15 Dias	$18,58 \pm 0,26^{a;A}$	$15,13 \pm 0,30^{a,b;B}$	$17,79 \pm 0,81^{a;A}$
30 Dias	$13,69 \pm 0,66^{c;A}$	$13,29 \pm 0,64^{c;A}$	$13,62 \pm 0,54^{c;A}$
45 Dias	$14,12 \pm 0,48^{b,c;A}$	$14,44 \pm 0,29^{b;A}$	$13,86 \pm 0,59^{c;A}$
60 Dias	$14,67 \pm 1,00^{b,c;B}$	$15,44 \pm 0,48^{a;A,B}$	$15,83 \pm 0,11^{b;A}$

Média dos valores  $\pm$  desvio padrão;  $n = 4$ . Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

Com relação ao ensaio FRAP (Tabela 9), os resultados obtidos mostraram maior variabilidade entre os tempos de confinamento, assim como entre os tratamentos analisados. Nos filés dos Tratamentos II e III, foi observado o mesmo comportamento apresentado durante os 60 dias de experimento nos resultados do ensaio DPPH, com um aumento da capacidade antioxidante nos primeiros 15 dias de suplementação, seguido por um decréscimo após 30 dias, manutenção dessa capacidade antioxidante no período de 45 dias e, por fim, um aumento nos valores observados após 60 dias de experimento. O mesmo não foi verificado nos filés provenientes da suplementação com o Tratamento I, mostrando um comportamento diferente nos períodos de 45 e 60 dias. Foi verificado um aumento da capacidade antioxidante após 45 dias de suplementação, seguido de um grande decréscimo nos 15 dias seguintes.

Com exceção dos filés referentes ao tempo zero, que tiveram a mesma origem, apresentando portanto os mesmos valores de capacidade antioxidante entre os tratamentos, foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em todos os períodos de confinamento, quando comparados os resultados obtidos em cada suplementação. Sendo que, assim como no ensaio DPPH, as maiores capacidades antioxidantes foram observadas nos filés dos Tratamentos I e III no período de 15 dias de suplementação, os quais apresentaram valores iguais a  $39,25 \mu\text{mol ET g}^{-1}$  e  $48,93 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ , respectivamente.

**Tabela 9.** Capacidade antioxidante dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio FRAP ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ )

	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	$11,57 \pm 0,46^{\text{d};\text{A}}$	$11,57 \pm 0,46^{\text{c};\text{A}}$	$11,57 \pm 0,46^{\text{c};\text{A}}$
15 Dias	$39,25 \pm 3,44^{\text{a};\text{B}}$	$13,49 \pm 0,75^{\text{b};\text{C}}$	$48,93 \pm 1,04^{\text{a};\text{A}}$
30 Dias	$9,50 \pm 0,75^{\text{d};\text{A},\text{B}}$	$8,56 \pm 0,65^{\text{d};\text{B}}$	$9,87 \pm 0,78^{\text{d};\text{A}}$
45 Dias	$33,05 \pm 2,44^{\text{b};\text{A}}$	$9,92 \pm 0,39^{\text{c},\text{d};\text{B}}$	$10,04 \pm 0,93^{\text{c},\text{d};\text{B}}$
60 Dias	$16,79 \pm 1,53^{\text{c};\text{B}}$	$20,37 \pm 1,78^{\text{a};\text{A}}$	$19,08 \pm 1,03^{\text{b};\text{A},\text{B}}$

Média dos valores  $\pm$  desvio padrão;  $n = 4$ . Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

Os resultados de capacidade antioxidante dos filés de tilápia obtidos no ensaio ABTS encontram-se na Tabela 10. Assim como no ensaio FRAP (Tabela 9), os resultados obtidos no ensaio ABTS mostraram maior variabilidade entre os tempos de confinamento, bem como entre os tratamentos analisados. No entanto, o maior valor de capacidade antioxidante ( $23,44 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) também foi verificado nos filés do Tratamento I após os primeiros 15 dias de suplementação, assim como encontrado no ensaio DPPH (Tabela 8).



**Tabela 10.** Capacidade antioxidante dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ABTS ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ )

	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	20,70 $\pm$ 0,59 <sup>b:A</sup>	20,70 $\pm$ 0,59 <sup>a:A</sup>	20,70 $\pm$ 0,59 <sup>a:A</sup>
15 Dias	23,44 $\pm$ 0,26 <sup>a:A</sup>	18,87 $\pm$ 0,76 <sup>b:B</sup>	18,75 $\pm$ 0,87 <sup>b:B</sup>
30 Dias	15,86 $\pm$ 0,14 <sup>c:B</sup>	19,94 $\pm$ 1,02 <sup>a,b:A</sup>	16,25 $\pm$ 0,41 <sup>c:B</sup>
45 Dias	20,29 $\pm$ 0,94 <sup>b:A</sup>	19,51 $\pm$ 0,51 <sup>a,b:A</sup>	15,79 $\pm$ 0,75 <sup>c:B</sup>
60 Dias	19,85 $\pm$ 0,88 <sup>b:A</sup>	18,55 $\pm$ 0,84 <sup>b:A</sup>	19,15 $\pm$ 0,60 <sup>b:A</sup>

Média dos valores  $\pm$  desvio padrão; n = 4. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

Com relação aos resultados obtidos nas análises das frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) e lipofílicas (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub> (Tabelas 11 e 12, respectivamente), pode-se ressaltar, que assim como nas rações, os antioxidantes de natureza hidrofílica são os maiores contribuintes na capacidade antioxidante total dos filés de todos os tratamentos, respondendo também por mais de 90% do valor total. A mesma superioridade de contribuição hidrofílica foi observada por Wu et al. (2008) ao analisar carne bovina.

**Tabela 11.** Capacidade antioxidante das frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ )

	H-ORAC <sub>FL</sub>		
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	13,67 $\pm$ 0,75 <sup>c:A</sup>	13,67 $\pm$ 0,75 <sup>b:A</sup>	13,67 $\pm$ 0,75 <sup>c,d:A</sup>
15 Dias	9,79 $\pm$ 1,00 <sup>d:B</sup>	13,44 $\pm$ 1,54 <sup>b:A</sup>	13,96 $\pm$ 1,62 <sup>c:A</sup>
30 Dias	21,43 $\pm$ 2,95 <sup>a:A</sup>	12,96 $\pm$ 0,87 <sup>b:B</sup>	12,56 $\pm$ 0,51 <sup>d:B</sup>
45 Dias	18,50 $\pm$ 0,35 <sup>b:B</sup>	32,08 $\pm$ 2,41 <sup>a:A</sup>	15,85 $\pm$ 0,35 <sup>b:C</sup>
60 Dias	10,80 $\pm$ 0,36 <sup>d:C</sup>	12,75 $\pm$ 1,02 <sup>b:B</sup>	20,80 $\pm$ 0,73 <sup>a:A</sup>

Média dos valores  $\pm$  desvio padrão; n = 4. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença

significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

**Tabela 12.** Capacidade antioxidante das frações lipofílicas (L-ORAC<sub>FL</sub>) dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ )

	L-ORAC <sub>FL</sub>		
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	0,30 ± 0,02 <sup>c:A</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>d:A</sup>	0,30 ± 0,02 <sup>d:A</sup>
15 Dias	0,35 ± 0,01 <sup>c:C</sup>	1,66 ± 0,25 <sup>b:B</sup>	1,93 ± 0,04 <sup>b:A</sup>
30 Dias	2,78 ± 0,46 <sup>a:A</sup>	2,06 ± 0,38 <sup>a:B</sup>	2,60 ± 0,13 <sup>a:A</sup>
45 Dias	1,61 ± 0,03 <sup>b:B</sup>	1,92 ± 0,18 <sup>a,b:A</sup>	0,31 ± 0,02 <sup>d:C</sup>
60 Dias	0,18 ± 0,01 <sup>c:C</sup>	0,78 ± 0,10 <sup>c:B</sup>	0,91 ± 0,06 <sup>c:A</sup>

Média dos valores ± desvio padrão; n = 4. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

Analisando-se separadamente os resultados encontrados nas análises das frações H-ORAC<sub>FL</sub> (Tabela 11) e L-ORAC<sub>FL</sub> (Tabela 12) dos filés de cada tratamento, é possível perceber que para os filés de todos os tratamentos, os maiores valores de L-ORAC<sub>FL</sub> foram apresentados no período de 30 dias de suplementação, sendo que o maior valor entre os tratamentos desenvolvidos foi encontrado nos filés do Tratamento I ( $2,78 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). No entanto, ao analisar os resultados da fração H-ORAC<sub>FL</sub> foi encontrada maior variação entre os tratamentos, sendo que para os filés resultantes da suplementação com a ração TI o maior valor de H-ORAC<sub>FL</sub> foi observado no período de 30 dias ( $21,43 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). Para os filés do Tratamento II, o maior valor de capacidade antioxidante da fração hidrofílica do ensaio ORAC<sub>FL</sub> foi verificado em 45 dias ( $32,08 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), enquanto que para os filés que receberam a ração TIII, o maior resultado ( $20,80 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) foi encontrado no período final de suplementação (60 dias).

Os valores elevados de H-ORAC<sub>FL</sub> encontrados nos filés dos Tratamentos I e II, indicam que além da contribuição que a vitamina E e que os tocoferóis presentes no óleo de chia, ambos adicionados às rações desses tratamentos, tiveram na capacidade antioxidante dos filés, possivelmente os compostos bioativos de natureza hidrofílica presentes no óleo de chia tenham também sido transferidos para os filés.

Para avaliar de modo geral a capacidade antioxidante encontrada nos filés de tilápia no ensaio ORAC<sub>FL</sub>, os resultados de capacidade antioxidante total (CAT), que equivalem ao somatório dos resultados encontrados em ambas frações hidrofílicas e lipofílicas dos filés, são apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Capacidade antioxidante total dos filés de tilápia dos Tratamentos I, II e III determinada pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ )

	CAT*		
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	13,97 $\pm$ 0,75 <sup>c:A</sup>	13,97 $\pm$ 0,75 <sup>b:A</sup>	13,97 $\pm$ 0,75 <sup>c:A</sup>
15 Dias	10,14 $\pm$ 1,00 <sup>d:B</sup>	15,10 $\pm$ 1,56 <sup>b:A</sup>	15,89 $\pm$ 1,62 <sup>b:A</sup>
30 Dias	24,21 $\pm$ 2,99 <sup>a:A</sup>	15,02 $\pm$ 0,95 <sup>b:B</sup>	15,16 $\pm$ 0,53 <sup>b,c:B</sup>
45 Dias	20,11 $\pm$ 0,35 <sup>b:B</sup>	34,00 $\pm$ 2,41 <sup>a:A</sup>	16,16 $\pm$ 0,35 <sup>b:C</sup>
60 Dias	10,98 $\pm$ 0,36 <sup>d:C</sup>	13,53 $\pm$ 1,02 <sup>b:B</sup>	21,71 $\pm$ 0,73 <sup>a:A</sup>

Média dos valores  $\pm$  desvio padrão; n = 4. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. \*Capacidade Antioxidante Total = H-ORAC<sub>FL</sub> + L-ORAC<sub>FL</sub>. TI: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E; TII: óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E + selênio; TIII: óleo de girassol + extrato etanólico de resíduo de acerola.

O maior valor de CAT foi observado nos filés do Tratamento II no período de 45 dias de suplementação (34,00  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), seguido pelos filés do Tratamento I após 30 dias de suplementação (24,21  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e pelos filés que receberam a ração TIII após os 60 dias de experimento (21,71  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

As diferenças entre os resultados obtidos nos ensaios de capacidade antioxidante, seguindo procedimento QUENCHER (DPPH, FRAP e ABTS) e analisando as frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) e lipofílicas (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub>, podem ser explicadas levando em consideração os diferentes mecanismos e condições de reação, além da diferença nos procedimentos aplicados.

Os ensaios DPPH, FRAP e ABTS são baseados no mecanismo de transferência de elétron (TE) (Müller, Fröhlich & Böhm, 2011) e foram aplicados seguindo procedimento QUENCHER que não utiliza etapas de extração, ou seja, o radical atua diretamente na matriz alimentar, determinando a capacidade antioxidante tanto dos compostos solúveis quanto insolúveis presentes na amostra (Gökmen et al., 2009). Por outro lado, o ensaio ORAC<sub>FL</sub> apresenta duas diferenças significativas em relação aos demais ensaios: a primeira delas é a necessidade de etapa prévia de extração, determinando separadamente a capacidade antioxidante das frações hidrofílicas e lipofílicas solúveis e extraíveis presentes na amostra; a segunda, é o mecanismo de ação que envolve o ensaio ORAC<sub>FL</sub>, baseado na transferência de átomo de hidrogênio (TAH) (Müller et al., 2011).

## 6. Conclusões

As tilápias do Nilo apresentaram boa adaptação e aceitabilidade frente às rações formuladas, favorecendo o crescimento e ganho de massa das mesmas.

Foi verificada a transferência dos ácidos graxos de interesse, especificamente o LNA, CLA e CLnA, às rações dos Tratamentos I e II.

A adição de substâncias com propriedade antioxidante às rações dos Tratamentos I, II e III resultou na potencialização da capacidade antioxidante das rações suplementadas em comparação com a ração Controle, com destaque para as rações dos Tratamentos I e III.

Foi verificada a incorporação do LNA nos filés dos Tratamentos I e II, devido à inclusão de óleo de chia, que é rico nesse ácido graxo, às rações desses tratamentos.

A inclusão de CLA às rações dos Tratamentos I e II resultou na incorporação dos isômeros do ácido linoleico conjugado, 18:2*c*9, *t*11 e 18:2*t*10, *c*12, nos filés das tilápias que receberam esses tratamentos.

Foi observada a incorporação dos isômeros do ácido linolênico conjugado nos filés dos Tratamentos I e II devido à inclusão de óleo de tungue às rações desses tratamentos.

Os valores de razão n-6/n-3 diminuíram nos filés dos Tratamentos I e II, enquanto que foi observado um aumento nos valores de razão AGPI/AGS ao longo dos 60 dias de suplementação.

Os filés do Tratamento III apresentaram alto teor de LA, devido à utilização de óleo de girassol como fonte lipídica, assim como a síntese do AA.

Os índices de qualidade nutricional indicaram melhor qualidade lipídica para os filés do Tratamento I em comparação com os demais tratamentos.

A aplicação dos ensaios de determinação de capacidade antioxidante nas amostras de filé, confirmaram a superioridade das rações dos Tratamentos I e III na contribuição do melhoramento da capacidade antioxidante da carne do pescado.

De modo geral a suplementação mostrou-se uma boa opção para melhorar o valor nutricional do filé do pescado, contribuindo para o enriquecimento da composição lipídica e da capacidade antioxidante do mesmo.

## Referências

- Abeywardena, M. Y., & Head, R. J. (2001). Long chain n-3 polyunsaturated fatty acids and blood vessel function. *Cardiovascular Research*, 52, 361-371.
- Aguiar, A. C., Cottica, S. M., Boroski, M., Oliveira, C. C., Bonafé, E. G., França, P. B., Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2011). Quantification of Essential Fatty Acids in the Heads of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed with Linseed Oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22, 643-647.
- Ayerza, R. (1995). Oil content and fatty acid composition of Chia (*Salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in Argentina. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 72, 1079-1081.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2000). Dietary levels of chia: Influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poultry Science*, 79, 724-739.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005a). Effect of ground chia seed and chia oil plasma total cholesterol, LDL, HDL, triglyceride content, and fatty acid composition when fed to rats. *Nutrition Research*, 11, 995-1003.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2005b). Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research*, 25, 995-1003.
- Ayerza, R., & Coates, W. (2007). Effect of dietary alpha-linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed oil on lipid content and fatty acid composition of fat plasma. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 51, 27-34.
- Babbar, N., Oberoi, H. S., Uppal, D. S., & Patil, R. T. (2011). Total phenolic content and antioxidant capacity of extracts obtained from six important fruit residues. *Food Research International*, 44, 391-396.

- Barilli, D. J. (2009). Incorporação de Ácido Linoleico Conjugado (CLA) e Ácido  $\alpha$ -linolênico (LNA) em filés de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.
- Batista, E. S., Costa, A. G. V., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2007). Adição da vitamina E aos alimentos: implicações para os alimentos e para a saúde humana. *Revista de Nutrição*, 20, 525-535.
- Bauman, D. E., Baumgard, L. H., Corl, B. A., & Griinari, J. M. (2000). Biosynthesis of conjugated linoleic acid in ruminants. *Proceedings of the American Society of Animal Science*, 1-15.
- Benzie, I. F. F., & Strain, J. J. (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76.
- Berge, G. M., Ruyter, B., & Asgard, T. (2004). Conjugated linoleic acid in diets for juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*); effects on fish performance, proximate composition, fatty acid and mineral content. *Aquaculture*, 237, 365-380.
- Bianchi, M. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes na dieta. *Revista de Nutrição*, 12, 123-130.
- 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.
- Boscolo, W. R., Signor, A. A., Coldebella, A., Bueno, G. W., & Feiden, A. (2010). Rações orgânicas suplementadas com farinha de resíduos de peixe para juvenis da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). *Revista Ciência Agronômica*, 41, 686-692.
- Brasil (1998). Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n°41, de 14 de janeiro de 1998. Aprova regulamento técnico referente a rotulagem nutricional de alimentos embalados. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 21 de jan. 1998.



- Brody, T. (1999). *Vitamins In: Nutritional Biochemistry*. (2nd ed.). San Diego: Academic Press, 491-692.
- Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 465, 1-37.
- Castagnolli, N. (1992). *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Funep, 189.
- Chiu, S., Hsieh, S., Yeh, S., Jian, S., Cheng, W., & Liu, C. (2010). The increase of immunity and disease resistance of the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* by feeding with selenium enriched-diet. *Fish & Shellfish Immunology*, 29, 623-629.
- Christie, W. W. (1989). *Gas chromatography and Lipids: A practical guide*. Dundee: The oily Press Ltd.
- Collins, C. H., Braga, G. L., & Bonato, P. S. (2006). *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Unicamp, 18, 19, 201.
- Craske, J. D., & Bannon, C. D. (1987). Gas liquid chromatography analysis of the fatty acid composition of fats and oils: A total system for high accuracy. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 64, 1413-1417.
- Cunniff, P. A. (1998). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16<sup>th</sup> Ed., Arlington: AOAC, CD - Rom.
- Curi, R., Pompéia, C., Miyasaka, C. K., & Procopio, J. (2002). *Entendendo a gordura: Os ácidos graxos*. Barueri: Manole, 5-40.
- Degen, C., Ecker, J., Piegholdt, S., Liebisch, G., Schmitz, G., & Jahreis, G. (2011). Metabolic and growth inhibitory effects of conjugated fatty acids in the cell line HT-29 with special regard to the conversion of *t11*, *t13*-CLA. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1811, 1070-1080.

Downs, K. M., Hess, J. B., & Bilgili, S. F. (2000). Selenium source effect on broiler carcass characteristics, meat quality and drip loss. *Journal of Applied Animal Research*, *18*, 61-71.

Dubois, V., Breton, S., Linder, M., Fanni, J., & Parmentier, M. (2007). Fatty acid profiles of 80 vegetable oils with regard to their nutritional potential. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *109*, 710-732.

FAO (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2012*. Food and Agriculture Organization of United Nations. Rome, (pp. 26).

Fennema, O. R. (1996). *Food Chemistry*. (3rd ed.). New York: Marcel Dekker, 226.

Filho, M. M. R., Ramos, M. I. L., Hiane, P. A., & Souza, E. M. T. (2010). Nutritional Value of Seven Freshwater Fish Species from the Brazilian Pantanal. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87*, 1461-1467.

Fogaça, F. H. S. (2005). Efeito do tocoferol no desempenho e na estabilidade lipídica da tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). Dissertação de Mestrado - Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista.

Fogaça, F. H. S., & Sant'Ana, L. S. (2007). Tocopherol in the lipid stability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) hamburgers. *Food Chemistry*, *105*, 1214-1218.

Freedman, B., Kwolek, W. F., & Pryde, E. H. (1986). Quantitation in the analysis of transesterified soybean oil by capillary gas chromatography. *Journal of the American Oil Chemists Society*, *63*, 1370-1375.

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.

- Gökmen, V., Serpen, A., & Fogliano, V. (2009). Direct measurement of total antioxidant capacity of foods: the 'QUENCHER' approach. *Trends in Food Science & Technology*, *20*, 278-288.
- Hartman, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, *22*, 475-476.
- Henderson, R. J., & Tocher, D. R. (1987). The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. *Progress in Lipid Research*, *26*, 281-347.
- Horrocks, L. A., & Yeo, Y. K. (1999). Health benefits of docosahexaenoic acid DHA. *Pharmacological Research*, *40*, 211-225.
- Hosseini, S. V., Abedian-Kenari, A., Rezaei, M., Nazari, R. M., Feás, X., & Rabbani, M. (2010). Influence of the in vivo addition of alpha-tocopheryl acetate with three lipid sources on the lipid oxidation and fatty acid composition of Beluga sturgeon, *Huso huso*, during frozen storage. *Food Chemistry*, *118*, 341-348.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Deemer, E. K. (2002b). Development and Validation of Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay for Lipophilic Antioxidants Using Randomly Methylated  $\beta$ -Cyclodextrin as the Solubility Enhancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 1815-1821.
- Huang, D., Ou, B., Hampsch-Woodill, M., Flanagan, J. A., & Prior, R. L. (2002a). High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*, 4437-4444.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 1841-1856.
- Igarashi, M., & Miyazawa, T. (2000). Newly recognized cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on cultured human tumor cell. *Cancer Letters*, *148*, 173-179.

Ixtaina, V. Y., Martínez, 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.

Jensen, C., Lauridsen, C., & Bertelsen, G. (1998). Dietary vitamin E: quality and storage stability of pork and poultry. *Trends in Food Science & Technology*, 9, 62-72.

Joseph, J. D., & Ackman, R. G. (1992). Capillary column gas chromatographic method for analysis of encapsulated fish oils 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.

Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, 2, 41-60.

Lima, V. L. A. G., Mélo, E. A., Maciel, M. I. S., Prazeres, F. G., Musser, R. S., & Lima, D. E. S. (2005). Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. *Food Chemistry*, 90, 565-568.

Maia, E. L., & Rodriguez-Amaya, D. B. (1993). Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 53, 27-35.

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

Martínez, M. L., Marín, M. A., Faller, C. M. S., Revol, J., Penci, M. C., & Ribotta, P. D. (2012). Chia (*Salvia hispanica* L.) oil extraction: Study of processing parameters. *LWT - Food Science and Technology*, 47, 78-82.

- Meher, L. C., Dharmagadda, V. S. S., & Naik, S. N. (2006). Optimization of alkali-catalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. *Bioresource technology*, *97*, 1392-1397.
- Mezadri, T., Pérez-Gálvez, A., & Hornero-Méndez, D. (2005). Carotenoid pigments in acerola fruits (*Malpighia emarginata* DC.) and derived products. *European Food Research and Technology*, *220*, 63-69.
- Mezadri, T., Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., García-Parrilla, M. C., & Troncoso, A. M. (2008). Antioxidant compounds and antioxidant activity in acerola (*Malpighia emarginata* DC.) fruits and derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, *21*, 282-290.
- Milinski, M. C. (2007). Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá.
- Monroig, Ó., Webb, K., Ibarra-Castro, L., Holt, G. J., & Tocher, D. R. (2011). Biosynthesis of long-chain polyunsaturated fatty acids in marine fish: Characterization of an Elovl4-like elongase from cobia *Rachycentron canadum* and activation of the pathway during early life stages. *Aquaculture*, *312*, 145-153.
- Moraes, A. M., Seiffert, W. Q., Tavares, F., & Fracalossi, D. M. (2009). Desempenho zootécnico de tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*, em tanques-rede, com diferentes rações comerciais. *Revista Ciência Agronômica*, *40*, 388-395.
- Morrissey, P. A., Buckley, D. J., & Sheehy, P. J. A. (1994). Vitamin E and meat quality. *Proceedings of the Nutrition Society*, *53*, 289-295.
- MPA – Ministério da Pesca e Agricultura (2012). *Boletim estatístico da pesca e aquicultura – Brasil 2010*. Brasília, *60*, 64-67.

- Müller, L., Fröhlich, K., & Böhm, V. (2011). Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay ( $\alpha$ TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. *Food Chemistry*, *129*, 139-148.
- Navarro, R. D., Navarro, F. K. S. P, Filho, O. P. R., Ferreira, W. M., Pereira, M. M., & Filho, J. T. S. (2012). Quality of polyunsaturated fatty acids in Nile tilapias (*Oreochromis niloticus*) fed with vitamin E supplementation. *Food Chemistry*, *134*, 215-218.
- Ng, W., 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.
- Nova, C. M. V. M. V., Godoy, H. T., & Aldrigue, M. L. (2005). Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídeos totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanos purpúreas*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, *25*, 430-436.
- NRC – National Research Council (1993). *Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes*. Washington: National Academy Press, 114.
- Nunes, M. L., Batista, I., & Cardoso C. (2007). Aplicação do Índice de qualidade (QIM) na avaliação da frescura do pescado. *Publicações Avulsas do IPIMAR - Lisboa*, *15*.
- Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009b). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, *32*, 689-702.
- Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Silva, C. A., Bechara, E. J. H, Barros, M. P., Mano, C. M., & Goulart, M. O. F. (2009a). Total phenolic content and free radical scavenging activities of methanolic extract powders of tropical fruit residues. *Food Chemistry*, *115*, 469-475.
- Pariza, M. W., Park, Y. & Cook, M. E. (2001). The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Progress in Lipid Research*, *40*, 283-298.

Peiretti, P. G., & Meineri G. (2008). Effects on growth performance, carcass characteristics, and the fat and meat fatty acid profile of rabbits fed diets with chia (*Salvia hispanica* L.) seed supplements. *Meat Science*, *80*, 1116-1121.

Prior, R. L., Hoang, H., Gu, L., Wu, X., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., & Jacob, R. (2003). Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of Plasma and Other Biological and Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*, 3273-3279.

Queiroz, J. F., Lourenço, J. N. P., & Kitamura, P. C. (2002). *A Embrapa e a aquíicultura-Demandas e Prioridades de Pesquisa*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica.

Re, R., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, *26*, 1231-1237.

Roche, M. (2009). The Tung Oil Boom in Australasia: a Network Perspective. *Geographical Research*, *47*, 256-268.

Saha, S. S., Patra, M. & Ghosh, M. (2012). *In vitro* antioxidant study of vegetable oils containing conjugated linolenic acid isomers. *LWT - Food Science and Technology*, *46*, 10-15.

Santos, L. D., Furuya, W. M., Matsushita, M., Silva, L. C. R., Silva, T. S. C., & Botaro, D. (2007). Ácido linoléico conjugado (CLA) em dietas para tilápia-do-nylo: desempenho produtivo, composição química e perfil de ácidos graxos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, *36*, 1481-1488.

Santos, L. D., Furuya, W. M., Silva, L. C. R., Matsushita, M., & Castro Silva, T. S. (2011). Dietary conjugated linoleic acid (CLA) for finishing Nile tilapia. *Aquaculture Nutrition*, *17*, 70-81.

Santos, L. D., Furuya, W. M., Silva, T. S. C., Michelato, M. & Matsushita, M. (2009). Ácido linoléico conjugado em dietas para pacu: tempo de deposição, desempenho e perfil de ácidos graxos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 38, 980-988.

Seppanen-Laakso, T., Laakso, I., & Hiltunen, R. (2002). Analysis of fatty acids by gas chromatography, and its relevance to research on health and nutrition. *Analytica Chimica Acta*, 465, 39-62.

Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90, 60-65.

Shinohara, N., Tsuduki, T., Ito, J., Honma, T., Kijima, R., Sugawara, S., Arai, T., Yamasaki, M., Ikezaki, A., Yokoyama, M., Nishiyama, K., Nakagawa, K., Miyazawa, T., & Ikeda, I. (2012). Jacaric acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, has a strong antitumor effect *in vitro* and *in vivo*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821, 980-988.

Sies, H., & Stahl, W. (1995). Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. *American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1315-1321.

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

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

Sommerfeld, M. (1983). Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. *Progress of Lipid Research*, 22, 221-233.

Souza, M. L. R., Baccarin, A. E., Viegas, E. M. M., & Kronka, S. N. (2004). Defumação da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) Inteira Eviscerada e Filé: Aspectos Referentes às Características Organolépticas, Composição Proximal e Perdas Ocorridas no Processamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 33, 27-36.



- Souza, N. E., & Visentainer, J. V. (2006). *Colesterol da mesa ao corpo*. São Paulo: Varela, 7-8.
- Suzuki, R., Noguchi, R., Ota, T., Abe, M., Miyashita, K. & Kawada, T. (2001). Cytotoxic effect of conjugated trienoic fatty acids on mouse tumor and human monocytic leukemia cells. *Lipids*, *36*, 477-482.
- Tarley, C. R. T., Visentainer, J. V., Matsushita, M., & Souza, N. E. (2004). Proximate composition, cholesterol and fatty acids profile of canned sardines (*Sardinella brasiliensis*) in soybean oil and tomato sauce. *Food Chemistry*, *88*, 1-6.
- Tocher, D. R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, *11*, 107-184.
- 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.
- Tsuzuki, T., Tokuyama, Y., Igarashi, M., & Miyazawa, T. (2004). Tumor growth suppression by  $\alpha$ -eleostearic acid, a linolenic acid isomer with a conjugated triene system, via lipid peroxidation. *Carcinogenesis*, *25*, 1417-1425.
- Tvrzická, E., Vecka, M., Stanková, B., & Zák, A. (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analysis Chimica Acta*, *465*, 337-350.
- Valenzuela, A., & Uauy, R. (1999). Consumption pattern of dietary fats in Chile: n-6 and n-3 fatty acids. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *50*, 127-133.
- Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, *71*, 195-198.

Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2004). Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia*, L.). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 15, 664-668.

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., & Franco, M. R. B. (2012). *Ácidos graxos em óleos e gorduras: Identificação e Quantificação*. (2a ed.). São Paulo: Varela, 63-112.

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

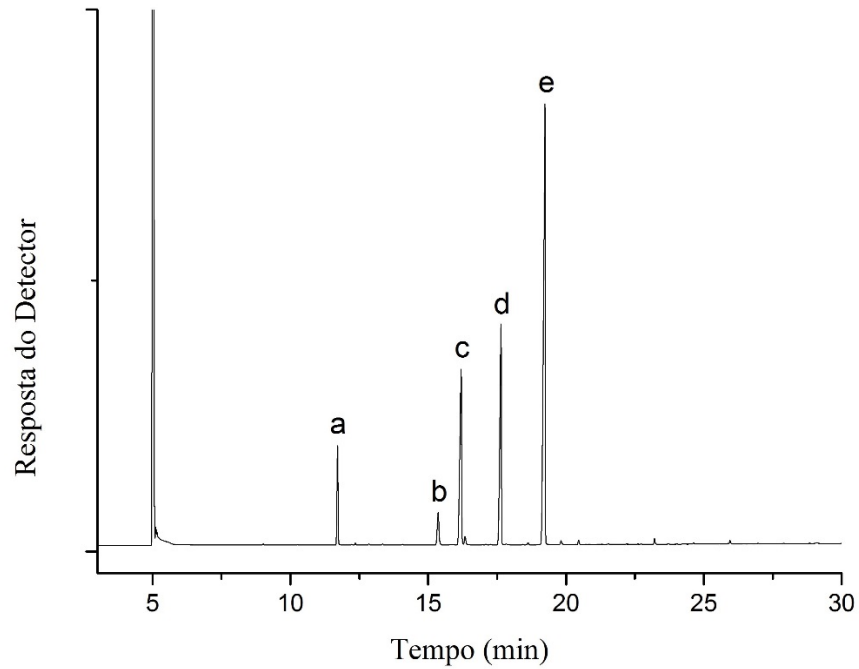
Watanabe, T., Kiron, V., & Satoh, S. (1997). Trace minerals in fish nutrition. *Aquaculture*, 151, 185-207.

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.

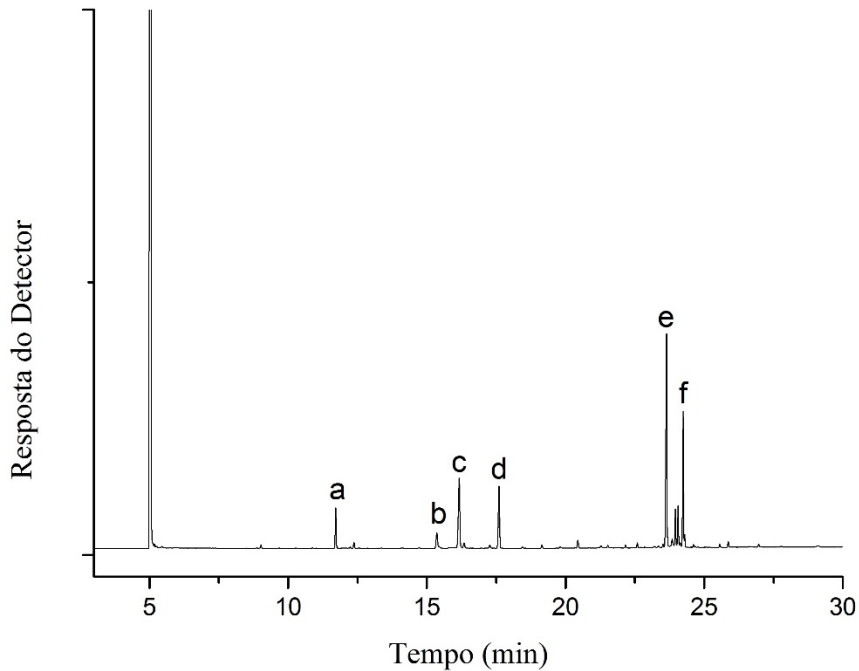
Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., Haytowitz, D. B., Gebhardt, S. E., & Prior, R. L. (2004). Lipophilic and Hydrophilic Antioxidant Capacities of Common Foods in the United States. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4026-4037.

Zara, R. F. (2008). Avaliação do aquecimento em forno de micro-ondas na reação de derivatização de óleos utilizando BF<sub>3</sub> em metanol. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá.

Zulueta, A., Esteve, M. J., & Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114, 310-316.

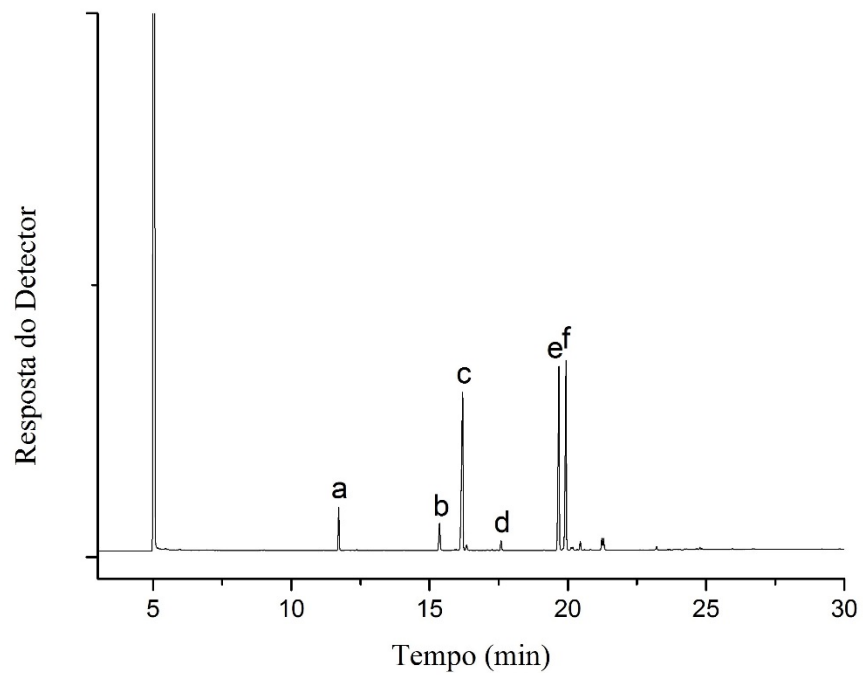
**APÊNDICE A** - Cromatograma representativo do óleo de chia (*Salvia hispanica* L.)

(a) 16:0, (b) 18:0, (c) 18:1n-9, (d) 18:2n-6, (e) 18:3n-3.

**APÊNDICE B** - Cromatograma representativo do óleo de tungue (*Aleurites fordii*)

(a) 16:0, (b) 18:0, (c) 18:1n-9, (d) 18:2n-6, (e) 18:3c9t11t13, (f) 18:3t9t11t13.

**APÊNDICE C** - Cromatograma representativo do concentrado de ácido linoleico conjugado (CLA)



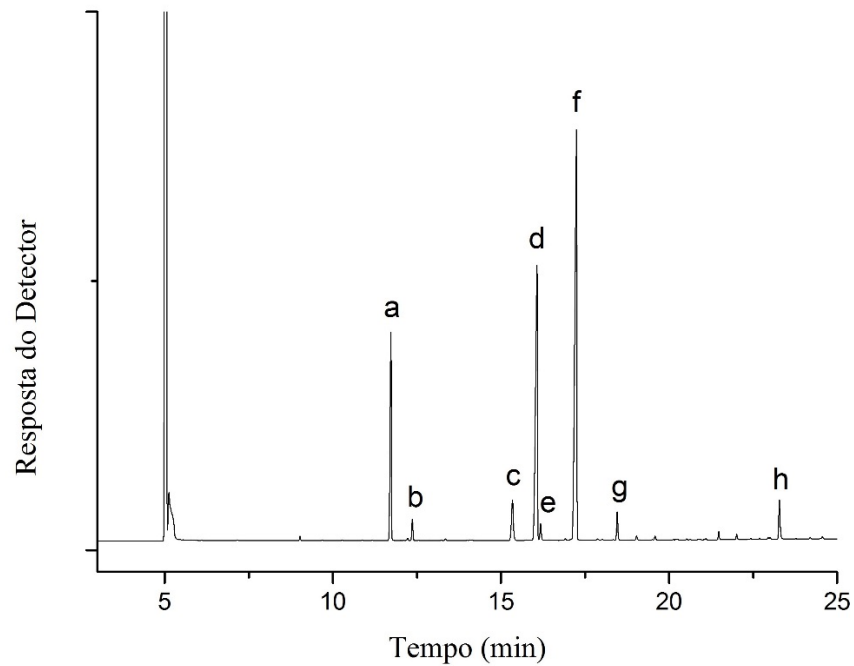
(a) 16:0, (b) 18:0, (c) 18:1n-9, (d) 18:2n-6, (e) 18:2c9t11, (f) 18:2t10c12.

**APÊNDICE D** - Fatores de correção utilizados no cálculo de concentrações de ácidos graxos em mg de ácido graxo g<sup>-1</sup> de lipídios totais em relação ao padrão interno tricosanoato de metila

Ácidos Graxos	Fatores de Correção	
	F <sub>CT</sub>	F <sub>CEA</sub>
14:0	1,080261841	1,061295757
16:0	1,054622642	1,054590602
16:1n-9	1,046762136	1,055023098
16:1n-7	1,046762136	1,055023098
16:1n-5	1,046762136	1,055023098
18:0	1,034681043	1,049207755
18:1n-11	1,027693926	1,04955889
18:1n-9	1,027693926	1,04955889
18:1n-7	1,027693926	1,04955889
18:2n-6	1,02070681	1,049915073
18:3n-6	1,013719694	1,050276413
18:3n-3	1,013719694	1,050276413
18:2c9t11	1,02070681	1,049915073
19:2n-7	1,013045833	1,047537684
18:2t10c12	1,02070681	1,049915073
20:1n-9	1,012439359	1,045081917
20:2n-6	1,006150954	1,045376463
20:3n-6	0,99986255	1,045674882
21:0	1,011890643	1,042867414
20:4n-6	0,993574145	1,045977253
20:4n-3	0,993574145	1,045977253
18:3c9t11t13	1,013719694	1,050276413
20:5n-3	0,987285741	1,046283654
18:3t9t11t13	1,013719694	1,050276413
22:4n-6	0,982808154	1,042098679
22:5n-6	0,977091423	1,042355421
24:0	0,994797844	1,037974464
22:6n-3	0,971374692	1,042615314

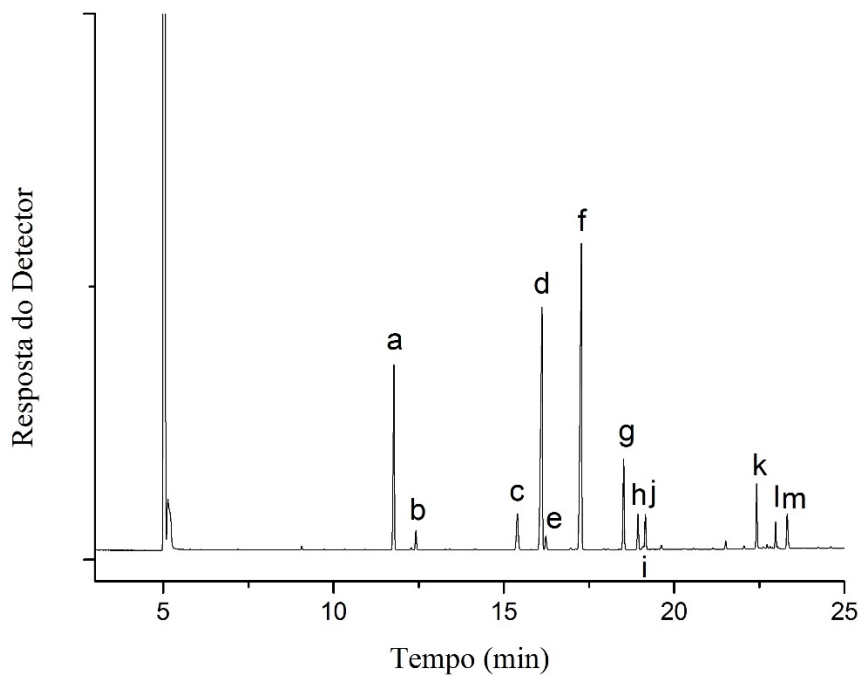
F<sub>CT</sub> = fator de correção teórico; F<sub>CEA</sub> = fator de correção experimental ou empírico.

### APÊNDICE E - Cromatograma representativo da ração Controle

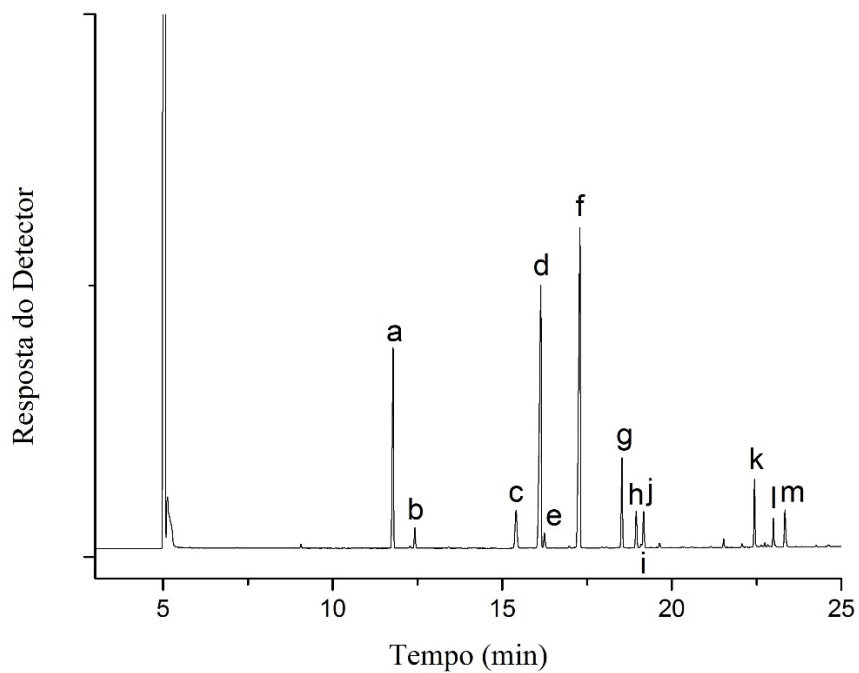


(a) 16:0, (b) 16:1n-7, (c) 18:0, (d) 18:1n-9, (e) 18:1n-7, (f) 18:2n-6, (g) 18:3n-3, (h) 23:0 (padrão interno).

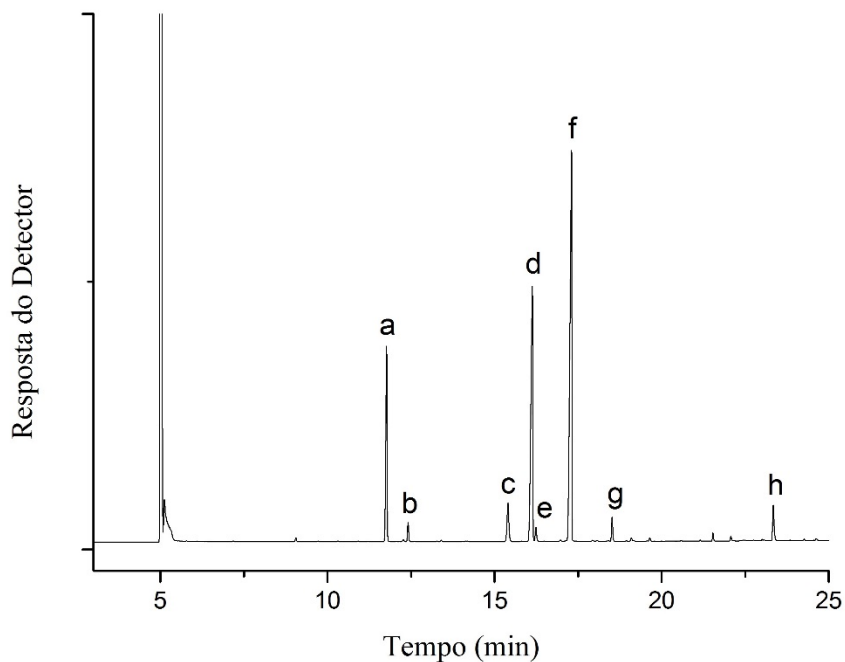
### APÊNDICE F - Cromatograma representativo da ração do Tratamento I (TI)



(a) 16:0, (b) 16:1n-7, (c) 18:0, (d) 18:1n-9, (e) 18:1n-7, (f) 18:2n-6, (g) 18:3n-3, (h) 18:2c9t11, (i) 19:2n-7, (j) 18:2t10c12, (k) 18:3c9t11t13, (l) 18:3t9t11t13, (m) 23:0 (padrão interno).

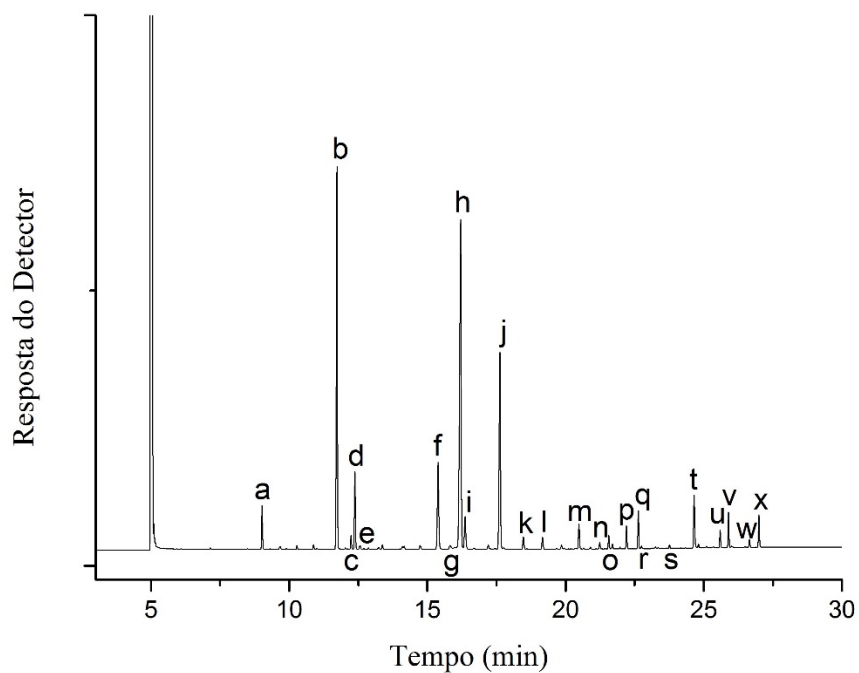
**APÊNDICE G** - Cromatograma representativo da ração do Tratamento II (TII)

(a) 16:0, (b) 16:1n-7, (c) 18:0, (d) 18:1n-9, (e) 18:1n-7, (f) 18:2n-6, (g) 18:3n-3, (h) 18:2c9t11, (i) 19:2n-7, (j) 18:2t10c12, (k) 18:3c9t11t13, (l) 18:3t9t11t13, (m) 23:0 (padrão interno).

**APÊNDICE H** - Cromatograma representativo da ração do Tratamento III (TIII)

(a) 16:0, (b) 16:1n-7, (c) 18:0, (d) 18:1n-9, (e) 18:1n-7, (f) 18:2n-6, (g) 18:3n-3, (h) 23:0 (padrão interno).

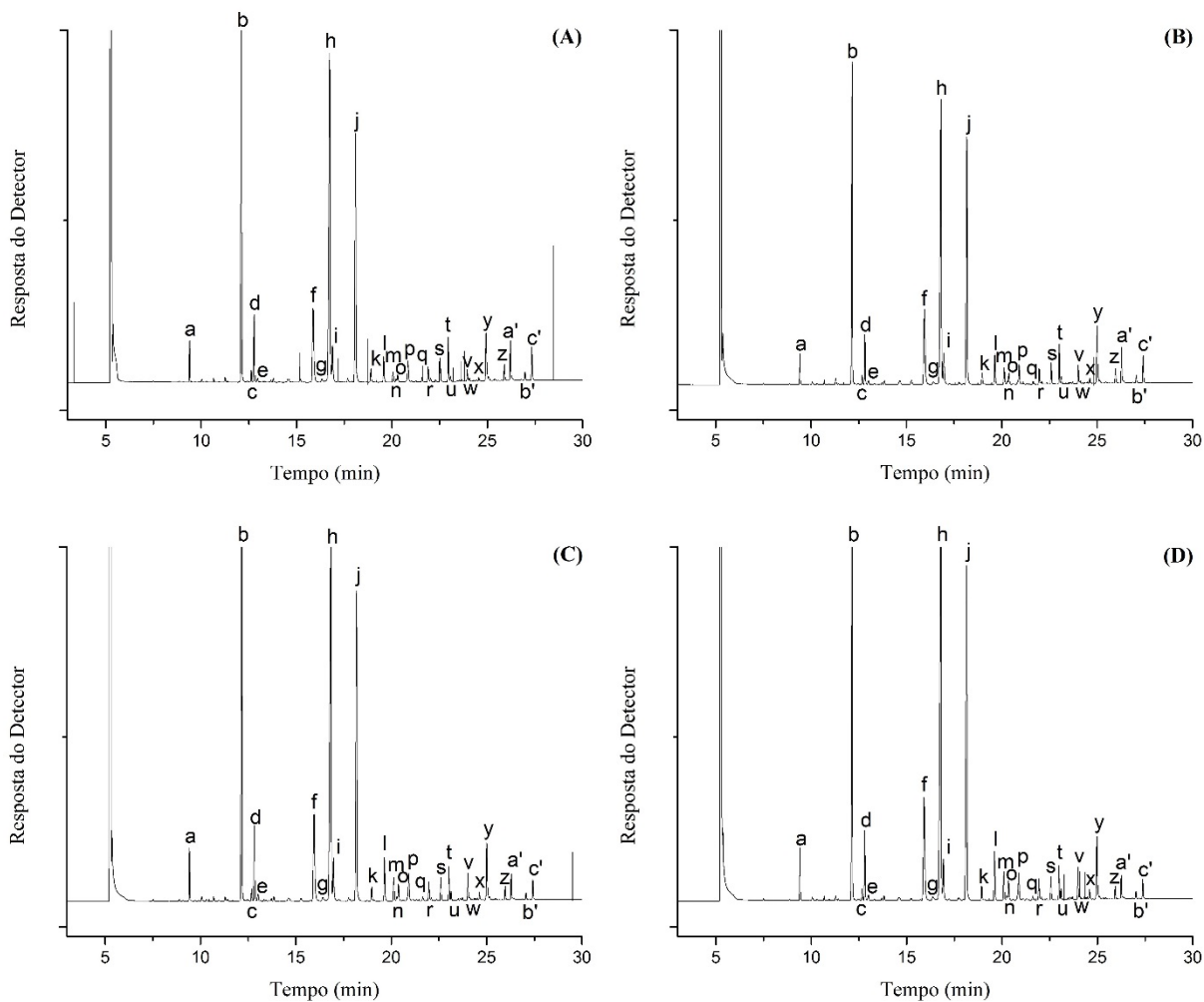
**APÊNDICE I** - Cromatograma representativo do filé de tilápia obtido no tempo zero (T0) de suplementação



(a) 14:0, (b) 16:0, (c) 16:1n-9, (d) 16:1n-7, (e) 16:1n-5, (f) 18:0, (g) 18:1n-11, (h) 18:1n-9, (i) 18:1n-7, (j) 18:2n-6, (k) 18:3n-6, (l) 18:3n-3, (m) 20:1n-9, (n) 20:2n-6, (o) 20:3n-6, (p) 21:0, (q) 20:4n-6, (r) 20:4n-3, (s) 20:5n-3, (t) 23:0 (padrão interno), (u) 22:4n-6, (v) 22:5n-6, (w) 24:0, (x) 22:6n-3.

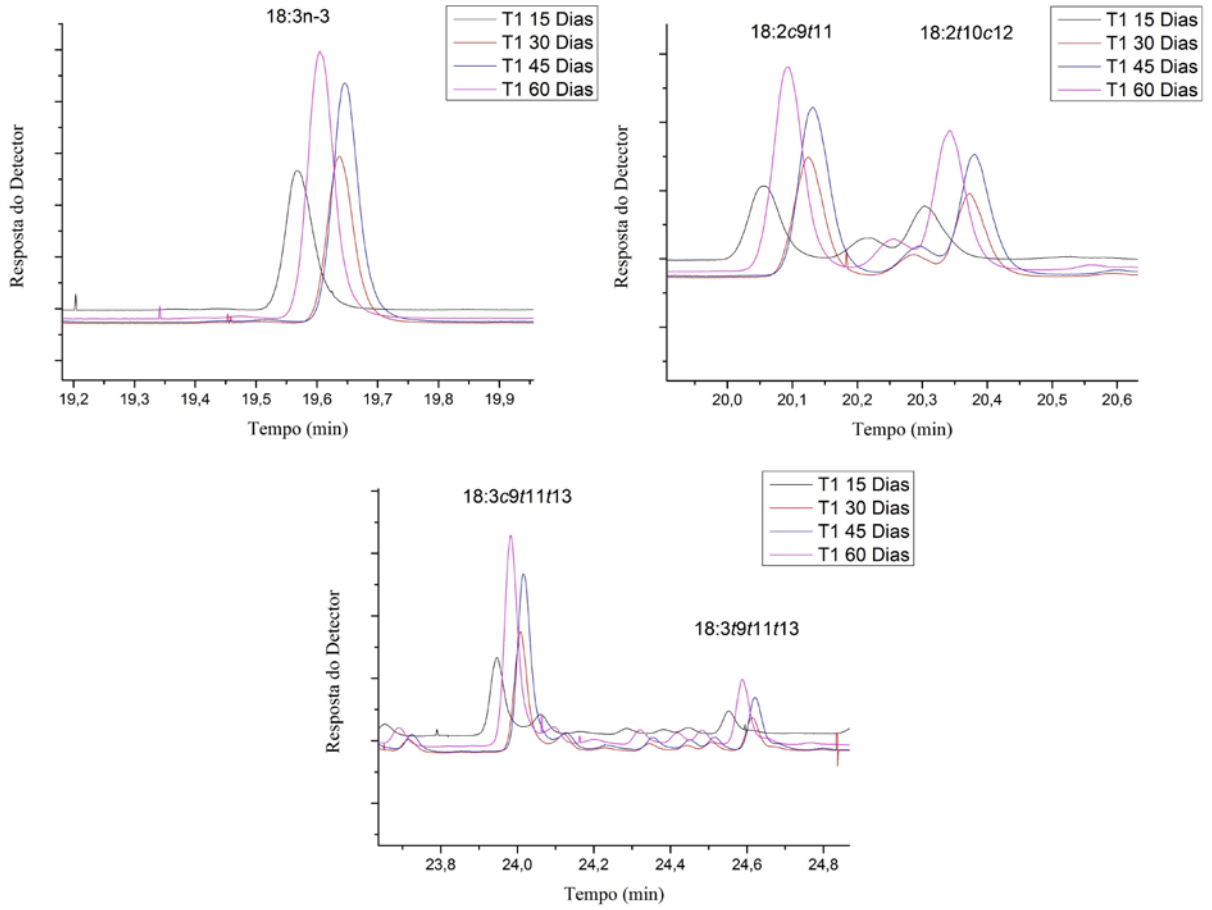


**APÊNDICE J** - Cromatogramas representativos dos filés de tilápia do Tratamento I nos períodos de (A) 15 dias, (B) 30 dias, (C) 45 dias e (D) 60 dias de suplementação

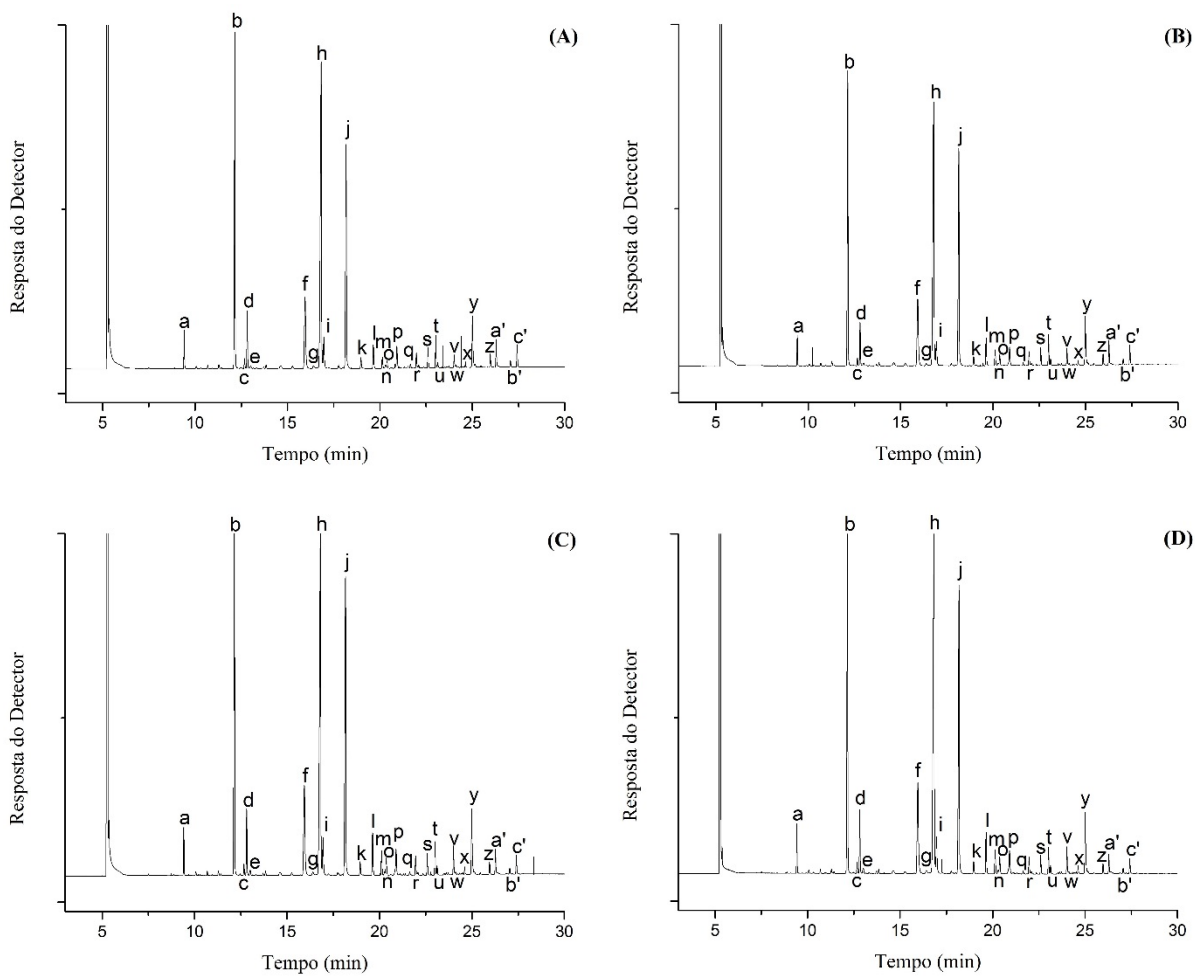


(a) 14:0, (b) 16:0, (c) 16:1n-9, (d) 16:1n-7, (e) 16:1n-5, (f) 18:0, (g) 18:1n-11, (h) 18:1n-9, (i) 18:1n-7, (j) 18:2n-6, (k) 18:3n-6, (l) 18:3n-3, (m) 18:2c9t11, (n) 19:2n-7, (o) 18:2t10c12, (p) 20:1n-9, (q) 20:2n-6, (r) 20:3n-6, (s) 21:0, (t) 20:4n-6, (u) 20:4n-3, (v) 18:3c9t11t13, (w) 20:5n-3, (x) 18:3t9t11t13, (y) 23:0 (padrão interno), (z) 22:4n-6, (a') 22:5n-6, (b') 24:0, (c') 22:6n-3.

**APÊNDICE K** - Variações de resposta dos ácidos graxos de suplementação nos filés de tilápia ao longo do fornecimento da ração do Tratamento I (TI)

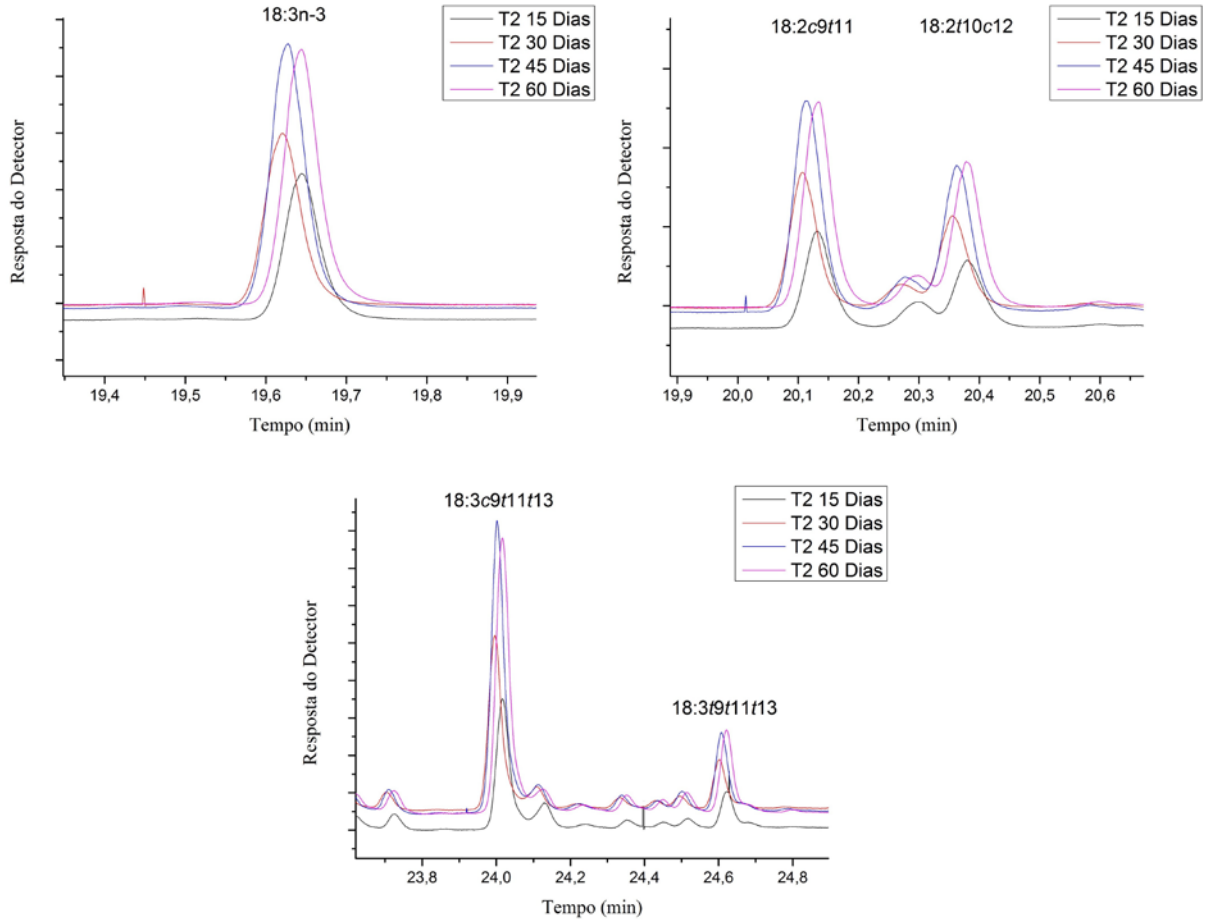


**APÊNDICE L** - Cromatogramas representativos dos filés de tilápia do Tratamento II nos períodos de (A) 15 dias, (B) 30 dias, (C) 45 dias e (D) 60 dias de suplementação

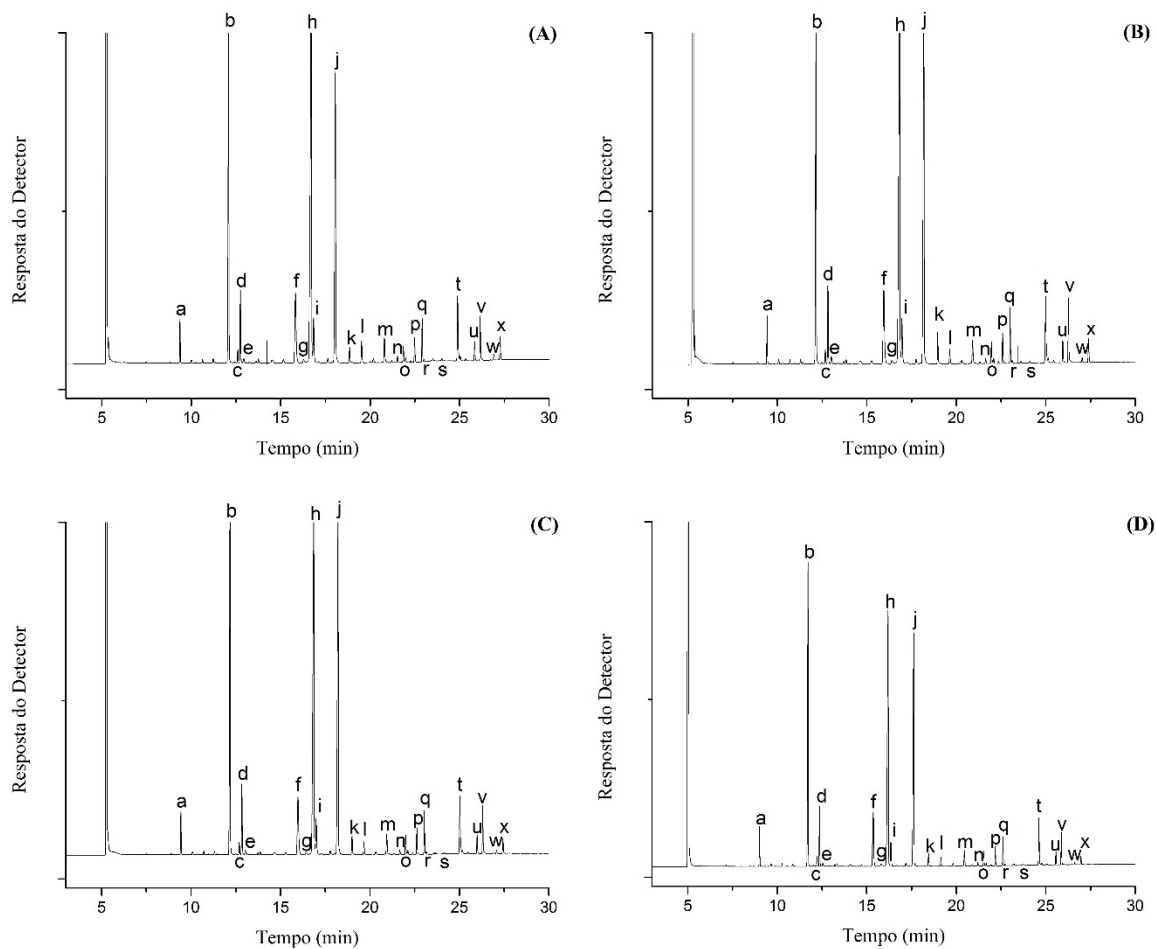


(a) 14:0, (b) 16:0, (c) 16:1n-9, (d) 16:1n-7, (e) 16:1n-5, (f) 18:0, (g) 18:1n-11, (h) 18:1n-9, (i) 18:1n-7, (j) 18:2n-6, (k) 18:3n-6, (l) 18:3n-3, (m) 18:2c9t11, (n) 19:2n-7, (o) 18:2t10c12, (p) 20:1n-9, (q) 20:2n-6, (r) 20:3n-6, (s) 21:0, (t) 20:4n-6, (u) 20:4n-3, (v) 18:3c9t11t13, (w) 20:5n-3, (x) 18:3t9t11t13, (y) 23:0 (padrão interno), (z) 22:4n-6, (a') 22:5n-6, (b') 24:0, (c') 22:6n-3.

**APÊNDICE M -** Variações de resposta dos ácidos graxos de suplementação nos filés de tilápia ao longo do fornecimento da ração do Tratamento II (TII)



**APÊNDICE N** - Cromatogramas representativos dos filés de tilápia do Tratamento III nos períodos de (A) 15 dias, (B) 30 dias, (C) 45 dias e (D) 60 dias de suplementação



(a) 14:0, (b) 16:0, (c) 16:1n-9, (d) 16:1n-7, (e) 16:1n-5, (f) 18:0, (g) 18:1n-11, (h) 18:1n-9, (i) 18:1n-7, (j) 18:2n-6, (k) 18:3n-6, (l) 18:3n-3, (m) 20:1n-9, (n) 20:2n-6, (o) 20:3n-6, (p) 21:0, (q) 20:4n-6, (r) 20:4n-3, (s) 20:5n-3, (t) 23:0 (padrão interno), (u) 22:4n-6, (v) 22:5n-6, (w) 24:0, (x) 22:6n-3.