



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

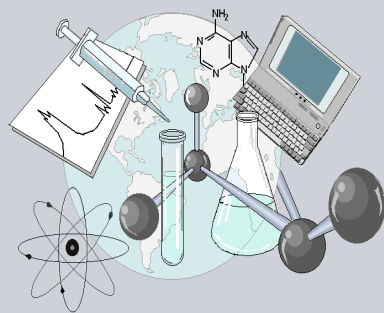
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS**

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“Capacidade antioxidante e composição em ácidos graxos em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada com óleo e farinha de semente de romã”**

Dissertação apresentada por **ANA PAULA LOPES** 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



**Centro de  
Ciências Exatas**

**MARINGÁ, JANEIRO/2015**



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

**“Capacidade antioxidante e composição em ácidos graxos em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada com farinha de semente de romã”**

Dissertação apresentada por **Ana Paula Lopes** 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, Janeiro de 2015

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

L864c      Lopes, Ana Paula  
            Capacidade antioxidante e composição em ácidos graxos em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com dieta suplementada com óleo e farinha de semente de romã / Ana Paula Lopes. -- Maringá, 2015.  
            69 f. : il. 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, 2015.

            1. Tilápia - Tratamento - Farinha de romã. 2. Ácido púrico. 3. Ácido linolênico conjugado. 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 21.ed. 547.77

MN-002064



**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 **Ana Paula Lopes**, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 12 de fevereiro de 2015.

**COMISSÃO JULGADORA:**

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

Profa. Dra. Liane Maldaner  
Membro - DQI/UEM

Prof. Dr. Oscar de Oliveira Santos Junior  
Membro - IFPR

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar saúde, força de vontade e perseverança em todos os anos dedicados aos estudos.

Aos meus pais, Ademir e Maura, pela dedicação e por me apoiarem e me incentivarem em todas as minhas decisões.

As minhas avós, Catharina e Aparecida, e a todos os familiares por me terem acompanhado com muito carinho por todo esse tempo.

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.

Aos amigos do CromAlimentos e APLE-A, em especial, Vanessa Vivian e Fabiana por sempre me ajudarem, pela paciência, por todo conhecimento dividido comigo e pela amizade.

Às colegas de laboratório Ingrid, Maria Eugênia, Paula, Polyana, Eliza, Vanessa, Érica e Joana por toda atenção, companheirismo, aprendizado e principalmente pela amizade.

Ao Professor Edmilson Canesin, ao Professor Elton Bonafé e à Técnica de laboratório Flavianny, da UTFPR, pela parceria.

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.

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

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
2.1. Antioxidantes .....	16
2.2. Ensaio para Determinação da Capacidade Antioxidante .....	18
2.1.1. Ensaio DPPH .....	18
2.1.2. Ensaio FRAP .....	19
2.1.3. Ensaio ABTS .....	20
2.1.4. Ensaio ORAC <sub>FL</sub> .....	21
2.2. Semente de romã .....	22
2.3. Procedimento QUENCHER .....	23
2.4. Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ) .....	24
2.5. Óleos e Gorduras .....	25
2.6. Ácido Linolênico Conjugado (CLnA) .....	28
2.7. Óleo de romã .....	29
2.8. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos .....	30
3. OBJETIVOS .....	33
3.1. Objetivo geral .....	33
3.2. Objetivos específicos .....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS .....	33
4.1. Farinha da semente de romã .....	33
4.2. Extração do óleo .....	33
4.3. Preparo das rações .....	34
4.4. Sistema de confinamento e preparo das amostras de peixe .....	35
4.5. Composição proximal das rações e da farinha de semente de romã .....	37
4.6. Extração e Derivatização dos Lipídios Totais .....	38

4.7. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos .....	38
4.8. Capacidade antioxidante.....	39
4.8.2. Solução de DPPH.....	39
4.8.3. Solução de FRAP .....	39
4.8.4. Solução de ABTS.....	40
4.8.5. Ensaios de capacidade antioxidante seguindo procedimento QUENCHER .....	40
4.9. Capacidade antioxidante determinada pelo Ensaio ORAC <sub>FL</sub> (Oxygen Radical Absorbance Capacity) .....	41
4.9.2. Extratos Lipofílicos (L-ORAC <sub>FL</sub> ) do ensaio ORAC <sub>FL</sub> .....	41
4.9.3. Extratos Hidrofílicos (H-ORAC <sub>FL</sub> ) do ensaio ORAC <sub>FL</sub> .....	42
4.9.4. Ensaio ORAC <sub>FL</sub> .....	42
4.10. Análise estatística.....	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
5.1. Composição proximal da farinha de semente de romã e das rações formuladas.....	44
5.2. Capacidade antioxidante das rações formuladas .....	46
5.3. Capacidade antioxidante dos filés de tilápia.....	47
5.4. Composição em ácidos graxos das rações formuladas .....	53
5.5. Composição em ácidos graxos dos filés de tilápia.....	55
6. CONCLUSÕES .....	59
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AA - ácido araquidônico
- AAPH - 2,2'-azobis-(2-amidino-propano) dihidroclorato
- ABTS - 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico)
- AGI - ácidos graxos insaturados
- AGMI - ácidos graxos monoinsaturados
- AGPI - ácidos graxos poli-insaturados
- AGS - ácidos graxos saturados
- alfa-ESA - ácido alfa-eleosteárico
- AUC - área abaixo da curva (*Area Under the Curve*)
- CAT - capacidade antioxidante total
- CLA - ácido linoleico conjugado (*Conjugated Linoleic Acid*)
- CLnA - ácido linolênico conjugado (*Conjugated Linolenic Acid*)
- 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*)
- GIFT - Genetically Improved Formed Tilapia
- H-ORAC<sub>FL</sub> - fração hidrofílica do ensaio ORAC<sub>FL</sub>
- LA - ácido linoleico (*Linoleic Acid*)
- L-ORAC<sub>FL</sub> - fração lipofílica do ensaio ORAC<sub>FL</sub>
- LT - lipídios totais
- n-3 - ácidos graxos da série ômega-3
- n-6 - ácidos graxos da série ômega-6



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

PA – ácido púnico

QUENCHER - QUick, Easy, New, CHEap, Reproducible

RMCD -  $\beta$ -ciclodextrina aleatoriamente metilada (*Randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin*)

TAG - triacilgliceróis

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

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Redução do radical livre DPPH pela quercetina.....	19
Figura 2. Redução do complexo férrico $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$ a ferroso $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$ pela ação de um antioxidante.....	20
Figura 3. Reação do radical ABTS na presença de um composto antioxidante. Adaptado de Huang et al, 2005.....	20
Figura 4. Reação de decomposição térmica do azo-composto 2,2'-azobis-(2-midinopropano) dihidroclorato (AAPH). Fonte: Zulueta et al., 2009.....	21
Figura 5. Representação da atuação dos antioxidantes na proteção do ataque dos radicais. ....	22
Figura 6. Ilustração da Tilápia do Nilo ( <i>Oreochromis niloticus</i> ). ....	25
Figura 7. Representação da molécula de um triacilglicerol. ....	26
Figura 8. Estruturas de ácidos graxos. (a) Ácidos graxos saturados (ácido esteárico, 18:0); (b) Ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico, 18:1n-9); (c) Ácidos graxos insaturados (ácido linoleico, 18:2n-6).....	27
Figura 9. Isômeros geométricos (trans e cis) do ácido oleico (18:1n-9).....	27
Figura 10. Estruturas ácido linoléico, ácidos linoléico conjugados, ácido $\alpha$ -linolênico, ácidos eleosteáricos e ácido púnico. ....	29
Figura 11. Sistema de confinamento das tilápias em tanques de vidro. ....	36
Figura 12. Fluxograma simplificado do delineamento experimental. ....	37
Figura 13. Cromatograma da farinha de semente de romã. ....	58
Figura 14. Cromatograma filés de tilápias do Tratamento II, no período de 30 dias. ....	58

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Formulações das rações utilizadas nos diferentes tratamentos (% em massa). .....	35
Tabela 2. Composição proximal e capacidade antioxidante da farinha de semente de romã. .44	
Tabela 3. Composição proximal das rações do Tratamento I, II e III. ....	45
Tabela 4. Capacidade antioxidante das rações do Tratamento I, II e III ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). .....	46
Tabela 5. Capacidade antioxidante dos filés de tilápia do Tratamento I, II e III ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). .....	48
Tabela 6. Capacidade antioxidante dos filés de tilápia do Tratamento I, II e III determinada pelo ensaio $\text{ORAC}_{\text{FL}}$ ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). .....	51
Tabela 7. Composição em ácidos graxos das rações suplementadas para o Tratamento I e Tratamento II (mg de ácido graxo $\text{g}^{-1}$ de lipídios totais).....	53
Tabela 8. Composição em ácidos graxos dos filés de tilápia para os Tratamentos I e II, em diferentes tempos de tratamento (mg de ácido graxo $\text{g}^{-1}$ de lipídios totais).....	55

## 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 púnicico e seus isômeros do grupo de ácidos linolênicos conjugados (CLnA) por meio da suplementação da dieta fornecida aos peixes com óleo e farinha de semente de romã. Também foi avaliada a capacidade antioxidante dos filés de tilápia resultantes da alimentação com ração suplementada com farinha de semente de romã (Tratamento II) e óleo de romã (Tratamento III). O experimento foi realizado no laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Química, da Universidade Estadual de Maringá, no período de janeiro a fevereiro de 2014. Um total de 90 tilápias foram distribuídas em três tanques de vidro, para cada tratamento, onde passaram 07 dias em adaptação recebendo a ração Controle (Tratamento I), contendo óleo de soja como fonte lipídica, para a obtenção do tempo zero (0 dias de suplementação). Após esse período foram incluídos separadamente os diferentes tratamentos: Tratamento II (farinha de semente de romã) e Tratamento III (óleo de romã) ao longo de 30 dias de experimento. Novas amostragens foram realizadas nos períodos de 15 e 30 dias de suplementação, coletando-se 10 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 e 30 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, CLnA e isômeros, nas rações do Tratamento II, provenientes da farinha de semente de romã. Os ensaios de capacidade antioxidante indicaram maiores resultados nas rações do Tratamento II e mostraram a superioridade de contribuição dos antioxidantes hidrofílicos na capacidade antioxidante total (CAT) das rações. A inclusão da farinha de semente de romã à ração do Tratamento II resultou na incorporação do ácido púnicico e de seus isômeros nos filés das tilápias e a aplicação dos ensaios de determinação da capacidade antioxidante nas amostras de filé confirmou a superioridade da ração do Tratamento II na contribuição do melhoramento da capacidade antioxidante da carne do pescado. Dessa forma, a suplementação se mostrou 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:** ácido púnico, ácido linolênico conjugado, capacidade antioxidante,

## **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the incorporation of polyunsaturated fatty acids and conjugated in the fillets of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), specifically the Punic acid and isomers of conjugated linoleic acid group (CLnA) by means of diet supplementation to fish with flour of pomegranate seed. We also evaluated the antioxidant capacity of tilapia fillets result of feeding diets supplemented with pomegranate seed meal (Treatment II) and pomegranate oil (Treatment III). The experiment was conducted in the Universidade Estadual de Maringá, Chemistry Department, Food Chemistry Laboratory, from January to February 2014. A total of 90 tilapia were divided into three glass tanks where they spent 07 days in the adaptation control diet (Treatment I) containing soybean oil as the lipid source, to obtain the time zero (0 days of supplementation). After this period were included separately different treatments: Treatment II (flour pomegranate seed) and Treatment III (pomegranate oil) over 30 days of the experiment. New samples were taken at 15 and 30 days of supplementation, by collecting 10 fish / tank. We evaluated the proximal and fatty acid composition of all feed developed, and the antioxidant capacity of same. Fatty acid supplementation was identified and quantified in fillets of tilapia from different treatments in all periods (0, 15 and 30 days) and also evaluated the antioxidant capacity through the DPPH test, FRAP, ABTS and ORAC<sub>FL</sub>. There was no significant difference ( $p > 0.05$ ) among diets for the results of proximal composition. The fatty acid composition of the diets confirmed the transfer of fatty acids of interest, CLnA and isomers, in feed Treatment II, from pomegranate seed meal. Antioxidant capacity tests indicated higher results in feed Treatment II and showed the contribution of superiority of hydrophilic antioxidants in the total antioxidant capacity (TAC) of the feed. The inclusion pomegranate seed meal to feed Treatment II resulted in the incorporation of the Punic acid and those fillets of tilapia application of tests to determine the antioxidant capacity in the fillet samples confirmed the superiority of the feed Treatment II in the improvement of contribution antioxidant capacity of the fish meat. Thus, supplementation showed a good option to improve the nutritional value of fish fillet, contributing to the enrichment of lipid composition and antioxidant capacity of the same, promoting a better product for human consumption.

**Keywords:** punic acid, conjugated linolenic acid, antioxidant capacity.

## 1. INTRODUÇÃO

O Brasil se destaca como um dos países com maior potencial para a expansão da aquicultura. A área tem vários fatores favoráveis, como grande potencial hídrico (representando 12% de toda a água doce disponível no planeta), diversidade de espécies nativas, temperaturas e áreas adequadas para o desenvolvimento da atividade, além de condições favoráveis condições no mercado de consumo. No Brasil, durante as últimas décadas, a piscicultura sofreu constantes transformações, tendo se consolidado como importante atividade no agronegócio brasileiro, substituindo em parte o peixe proveniente da pesca extrativa (Ayroza, 2009). O setor primário de pescados (pesca + aquicultura) representa quase 0,4 % do Produto Interno Bruto (PIB). Contudo, se considerada toda a cadeia produtiva de pescados, englobando desde a produção de ração, transporte, processamento, treinamento, entre outros, a contribuição do setor salta para cerca de 2 % do PIB nacional (Ostrensky et al, 2008).

As principais espécies de peixes de água doce criadas representam 87 % da produção nacional, em ordem decrescente são: tilápias (71.253,50 t), carpas (45.831,50 t), tambaqui (26.672,00 t), tambacu (10.989,50 t) e pacu (10.625,50 t). No grupo das tilápias (*Oreochromis* spp) tem destaque a tilápia do Nilo (*O. niloticus*), que é a segunda espécie de peixe mais criada, sendo precedido somente pela produção de carpas (*Cyprinus carpio*) (Ayroza, 2009).

A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é uma espécie originária da África, Israel e Jordânia, que foi introduzida no Brasil em 1971, procedente da Costa do Marfim, África (Castagnolli, 1992). É uma espécie bastante rústica, de hábito alimentar fitoplânctófago que aceita, também, outros tipos de alimento, inclusive alimentos artificiais, em todos os estágios de vida. Apresenta carne de excelente sabor e com boa aceitação no mercado consumidor, o que a torna uma espécie de grande interesse para a piscicultura (Hayashi et al, 1999), no entanto, quando comparadas com peixes de origem marinha, estes peixes, possuem baixo conteúdo de ácidos graxos da série ômega-3 (n-3) (Visentainer et al, 2005).

Devido às características benéficas atribuídas a este pescado, um programa de melhoramento genético foi desenvolvido, sendo criada a linhagem GIFT (Genetically Improved Formed Tilapia). A GIFT foi inserida no Brasil em 2005 (Fulber et al., 2009) e vem sendo disseminada em outros países da América Latina como Cuba e Uruguai.

No Brasil, a tilápia do Nilo é a espécie de peixe de água doce mais cultivada em sistemas de aquicultura, sendo responsável por aproximadamente 40 % da produção total nacional nessa modalidade. A tilápia ocupa o quarto lugar em produção, sendo que no ano de 2010 foram produzidos mais de 3 milhões de toneladas dessa espécie (Carbonera et al, 2014b).

A população vem se preocupando cada vez mais com o tipo de alimento que é consumido para manter uma vida mais saudável. Dentre os alimentos mais citados encontra-se a carne de pescado, que além de apresentar boa digestibilidade, possui alto teor protéico e gordura rica em ácidos graxos poli-insaturados (Bonafé, 2010). A dieta humana contém ácidos graxos saturados (AGS, somente ligações simples carbono-carbono), monoinsaturados (AGMI, uma ligação dupla carbono-carbono), poli-insaturados (AGPI, duas ou mais dupla ligações carbono-carbono). Entre os AGPI, existem dois tipos de ácidos chamados essenciais, os ácidos linoléico (LA, 18:2n-6) e alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), porque não podem ser sintetizados pelo organismo humano e devem ser fornecidos através da dieta (Dubois et al., 2007). Além destes, existem dois tipos de estruturas relacionadas com os ácidos octadecadienóico e octadecatrienóico conjugados, como o ácido linoléico (CLA, 18:2 c9, t11 e t10, 12c) e linolênico conjugado (CLnA, alfa-eleosteárico, 18:3 c9, t11, t13; beta-eleosteárico 18:3 t9, t11, t13; ácido púnico 18:3 c9, t11, c13 ), que também estão presentes na dieta, embora em pequenas quantidades (Cao et al., 2006 e Iwabuchi et al, 2003).

Outra característica nutricional que tem despertado muito interesse atualmente é o emprego de substâncias com capacidade antioxidante nos alimentos. Com isso, substâncias naturais, como extratos de plantas, têm sido utilizadas pela indústria alimentícia como antioxidantes naturais, pois além dessa função é ainda um componente essencial ao organismo animal (Carbonera et al, 2014b). Os antioxidantes desempenham um importante papel no sistema de defesa do organismo, de tal forma que dietas ricas em antioxidantes estão associadas a uma menor incidência de doenças cardiovasculares, cânceres e processos degenerativos relacionados à idade (Serpen at al, 2012b).

Estudos recentes mostraram que a semente de romã apresenta quantidade elevada de compostos antioxidantes como os ácidos fenólicos, polifenóis, flavonóides, taninos, tocoferóis, entre outros (Elfalleh et al, 2011a). O perfil lipídico da semente de romã também ganhou destaque devido ao seu alto teor de ácido graxos poli-insaturados (AGPI). O óleo de semente de romã é composto por 65 – 80% de ácido linolênico conjugado (CLnA), sendo o ácido



púnico (ácido 9c, 11t, 13c – octadecatrienóico) o mais importante, além de apresentar grande quantidade de fitosteróis (Lansky e Newman, 2007).

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Antioxidantes**

A palavra “antioxidante” é cada vez mais popular na sociedade moderna devido à divulgação, pela mídia, de seus benefícios à saúde (Huang et al, 2005). Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias sintéticas ou naturais que previnem ou diminuem a oxidação em alimentos ou sistemas biológicos causados por espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) (Karadag et al, 2009). Entre as principais formas reativas de oxigênio encontram-se os radicais superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $ROO^{\bullet}$ ), hidroxila ( $HO^{\bullet}$ ) e espécies não radicalares como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). As ERN incluem principalmente o radical de óxido nítrico ( $^{\bullet}NO$ ) e espécies não radicalares como peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Rodrigues et al., 2012; Bianchi e Antunes, 1999).

Os antioxidantes podem inibir a formação de 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). Os compostos antioxidantes podem desativar ERO e ERN gerados pelo metabolismo celular ou por fontes externas, impedindo o ataque sobre os lipídios, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases nitrogenadas do DNA (ácido desoxirribonucleico), evitando assim a formação de lesões de perda de integridade celular (Bianchi & Antunes, 1999; Huang et al, 2005). Os danos causados a esses componentes celulares se acumula, com o passar dos anos, e contribui para a degeneração de células somáticas e indução de doenças crônico-degenerativas, especialmente associadas ao avanço da idade, destacando-se câncer, arteriosclerose, doenças inflamatórias, mal de Parkinson, mal de Alzheimer e catarata (Scalbert et al., 2005).

Mudanças no estilo de vida e hábitos alimentares dos seres humanos, tem sido estudada por pesquisadores e pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Hoje em dia as pessoas estão mostrando maior interesse em alimentos que contêm componentes bioativos ou funcionais que lhes darão benefícios adicionais para seu estado de saúde. Entre esses

alimentos, carnes e derivados ocupam uma posição de destaque na dieta humana (Hygreeva et al, 2014), devido a alta qualidade de proteínas, aminoácidos essenciais, assim como ácidos graxos insaturados, vitaminas e minerais que fornecem (Serpen et al, 2012 e Hygreeva et al 2014).

A carne possui uma estrutura física complexa e uma composição química muito susceptível à oxidação. A estabilidade à oxidação das carnes depende do equilíbrio e da interação entre as substâncias anti e pró-oxidantes e da composição do substrato propenso à oxidação, incluindo ácidos graxos poli-insaturados, colesterol, proteínas e pigmentos (Serpen et al, 2012).

A deterioração oxidativa da carne se manifesta na forma de descoloração, desenvolvimento de mau cheiro, formação de compostos tóxicos, perda de nutrientes e diminuição da vida de prateleira. Sob condições fisiológicas normais, o oxigênio muscular é submetido a uma série de reações que conduz à geração de radicais livres. Uma pequena porção (cerca de 2 a 5 %) do oxigênio consumido durante uma reação metabólica é convertido para radicais livres sob a forma de espécies reativas de oxigênio. Estes radicais livres, particularmente, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), desempenham um papel-chave na regulação de vários processos metabólicos, interagindo com proteínas, ácidos graxos e ácidos nucléicos. Eles agem como agentes intermediários em reações de oxidação-redução essenciais para o organismo (Falowo et al, 2014).

Fundamentalmente, quando a produção de ERO não ultrapassa a capacidade de antioxidantes endógenos no corpo, ele executa funções benéficas, que incluem: o controle da expressão do gene, regulação de vias de sinalização celular, modulação do músculo esquelético e defesa contra patógenos invasores. Em contraste, quando em excesso e a atividade de defesa antioxidante é baixa, ele potencialmente provoca danos aos componentes celulares, induz respostas auto-imunes prejudiciais e provoca estresse oxidativo (Falowo et al, 2014).

A presença de compostos antioxidantes e pró-oxidantes endógenos podem variar entre diferentes espécies e também entre animais de uma única espécie. Além disso, a dieta do animal desempenha um papel importante na modificação da concentração dos antioxidantes, pro-oxidantes e ácidos graxos na carne (Serpen et al, 2012). A oxidação lipídica e protéica têm sido apontadas como a principal causa da deterioração não microbiana de carnes. Isto

porque lipídios e proteínas na carne são facilmente suscetíveis a danos oxidativos devido ao rápido esgotamento dos antioxidantes endógenos após o abate (Falowo et al, 2014).

Nos últimos anos, tem sido dada maior atenção a uma série de alimentos que podem ser usados como potenciais fontes de antioxidantes para conservação e melhoria da qualidade nutricional de carnes e outros alimentos. A maior parte desses materiais vegetais possuem grandes quantidades de nutrientes, tais como proteínas, gorduras, carboidratos, teores de minerais (cálcio, potássio, ferro, fósforo) e menos propriedades anti-nutricionais, que ocorrem na presença de substâncias que interferem na digestão e absorção de nutrientes pelo organismo. Os fatores antinutricionais podem causar efeitos negativos no crescimento ou na saúde de humanos e animais. Antioxidantes naturais podem ser introduzidos através da dieta ou estratégias tecnológicas para reduzir ou prevenir processo oxidativo em carnes e outros alimentos, como por exemplo, em embalagens. Os antioxidantes são introduzidos na carne através da ração animal (dieta). A inclusão de antioxidantes naturais na dieta animal, foi relatada por vários autores, não só para retardar a oxidação, mas também para melhorar significativamente a qualidade da carne, quando comparados com as dietas sem antioxidantes. A maioria dos antioxidantes naturais são obtidas de ervas, especiarias, legumes e frutas, sendo então consideradas boas fontes naturais de antioxidantes, a fim de inibir a oxidação em carnes utilizadas no consumo humano (Falowo et al, 2014).

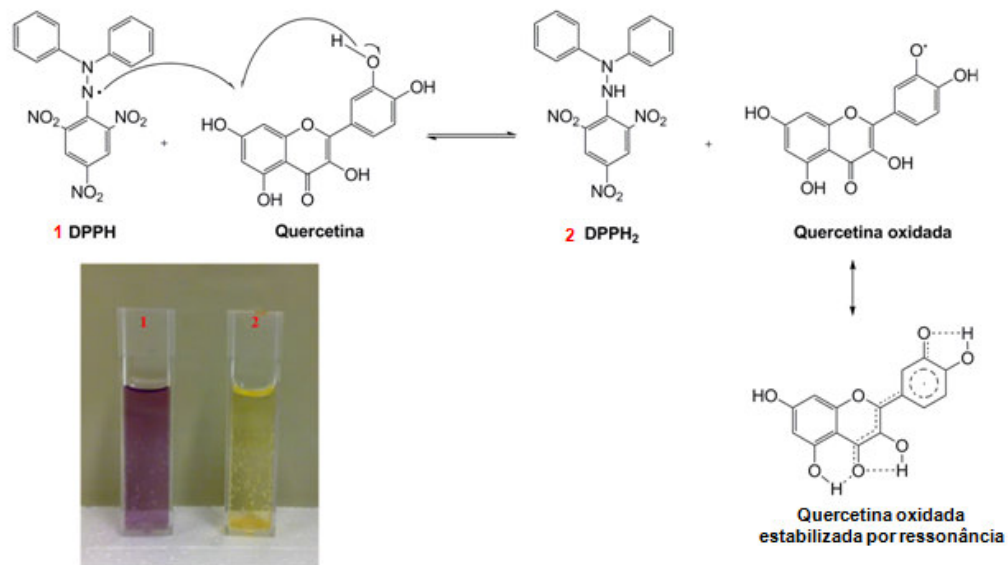
## **2.2. Ensaios para Determinação da Capacidade Antioxidante**

### **2.1.1. Ensaio DPPH**

O ensaio espectrofotométrico DPPH recebe o nome do seu reagente principal. O 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 ( $\text{NO}_2$ ) 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

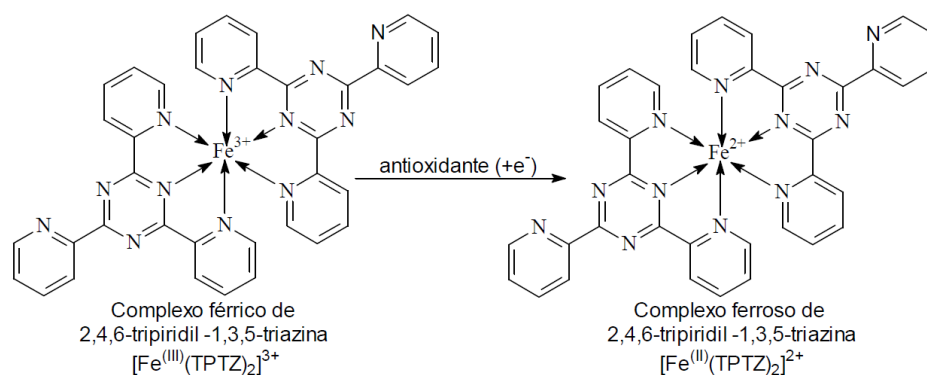
emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio de um antioxidante, tornando a solução amarela e ocorrendo a formação do DPPH-H, reduzido e estável (Figura 1). É essa característica de mudança de coloração que permite o monitoramento da absorbância com máximo de absorção em 525 nm (Karadag et al, 2009 e Oliveira et al, 2009).



**Figura 1.** Redução do radical livre DPPH pela quercetina.

### 2.1.2. Ensaio FRAP

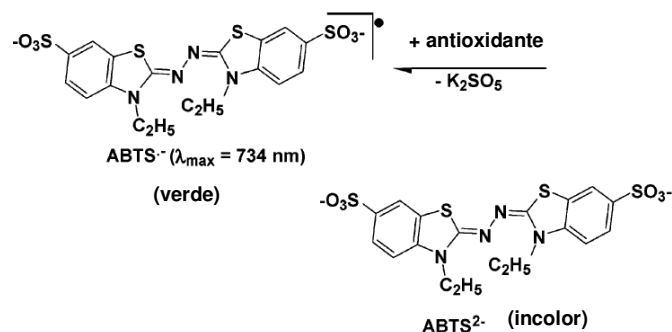
O ensaio FRAP (*Ferric Reducing Ability Power*) determina o poder de redução de antioxidantes utilizando o complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina (TPTZ) como reagente. O complexo Fe(III)-TPTZ é formado por duas moléculas de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina, que atuam como ligantes e um íon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



**Figura 2.** Redução do complexo férrico  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$  a ferroso  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_2$  pela ação de um antioxidante.

### 2.1.3. Ensaio ABTS

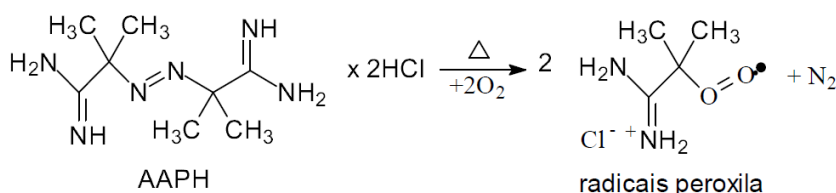
Outro ensaio para avaliar a capacidade antioxidante é realizado através da captura do radical 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). O radical ABTS é gerado pela reação química entre o ABTS e o persulfato de potássio e apresenta coloração verde escuro com máximo de absorvância em 734 nm (Re et al, 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 3 (Zulueta, et al, 2009).



**Figura 3.** Reação do radical ABTS na presença de um composto antioxidante. Adaptado de Huang et al, 2005.

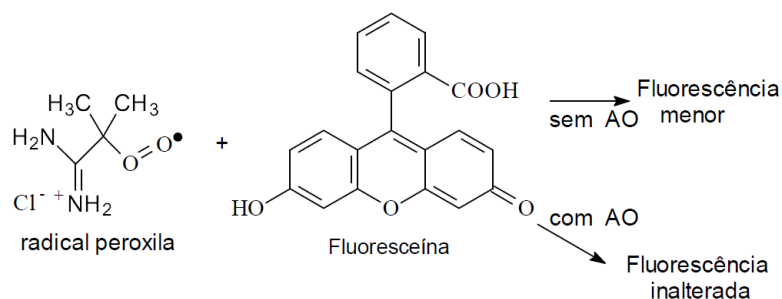
#### 2.1.4. Ensaio ORAC<sub>FL</sub>

O ensaio espectrofluorimétrico 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 et al, 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) dihidrocloro (AAPH) (Figura 4).



**Figura 4.** Reação de decomposição térmica do azo-composto 2,2'-azobis-(2-midinopropano) dihidrocloro (AAPH). Fonte: 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 et al 2008; Huang et al 2002a). Os radicais peroxila formados (Figura 4) 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 5).



**Figura 5.** Representação da atuação dos antioxidantes na proteção do ataque dos radicais.

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 ORAC<sub>FL</sub> introduzida por Huang et al (2002b) aplicando a β-ciclodextrina aleatoriamente metilada (Randomly methylated β-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).

## 2.2. Semente de romã

A romã (*Punica granatum*, L.) é uma fruta originária da região do Oriente Médio (Jardini & Filho, 2007) e é amplamente cultivada em partes da Ásia, norte da África, do Mediterrâneo e do Oriente Médio (He et al, 2011). A árvore cresce em regiões áridas e a produção do fruto se dá no período de setembro a fevereiro. O suco da romã apresenta em sua composição elevado nível de compostos fenólicos como: antocianinas, quercetina, ácidos fenólicos e taninos (Jardini & Filho, 2007; He et al, 2011 e Tehranifar et al, 2010). Os frutos são consumidos frescos ou na forma de sucos e doces. A parte comestível representa cerca de 50 a 70 % do peso total do fruto, o suco representa de 70 a 78 % e as sementes representam de 20 a 22 % dos frutos (Tehranifar et al, 2010 e Goula, 2013).

A semente de romã apresenta boa fonte de nutrientes e potencial fonte de antioxidantes. A suplementação da alimentação com sementes de romã podem impedir danos

ao DNA, reduzir o risco de câncer e aliviar os sintomas da menopausa. Os efeitos benéficos de sementes de romã podem estar relacionados com a presença de compostos biologicamente ativos, em particular os polifenóis e sua capacidade antioxidante (Jing et al, 2012).

Na China, a romã tem sido reconhecida como um fruto com potencial valor econômico e farmacêutico, resultando em um crescente cultivo da fruta (He et al, 2011). No Brasil, as sementes residuais geradas no processamento de frutas é restrita a aplicações como adubo (Lucci et al, 2015), e as empresas do setor de sucos, por falta de logística e tecnologia apropriada, pagam para a remoção desse resíduo. Portanto, o uso da semente de romã, para obtenção de produtos de alto valor agregado pode favorecer o produtor de sucos a ampliar a oferta de óleos vegetais especiais e colaborar para a preservação do meio ambiente, pois reaproveita um material que pode ser descartado. Em 2004 cerca de 200 toneladas de romã foram comercializadas na Ceagesp, já em 2011 esse valor subiu para 500 toneladas da fruta (RuralBR, 2014).

### **2.3. Procedimento QUENCHER**

O procedimento QUENCHER traz uma nova abordagem para a determinação da capacidade antioxidante em alimentos. Essa técnica 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.

Muitas técnicas para a determinação da capacidade antioxidante foram desenvolvidas e alguns métodos ganharam popularidade entre a comunidade científica. Os ensaios baseados na medição espectrofotométrica utilizando soluções do radical, como o ABTS, DPPH, FRAP e Folin-Ciocalteu são as técnicas mais comuns juntamente com o ensaio ORAC, que é baseado na medição de fluorescência. No entanto, todos os métodos mencionados foram desenvolvidos como métodos dependente de extração, de modo que apenas os compostos antioxidantes que são solúveis em um determinado solvente podem contribuir para os valores de capacidade antioxidante total (CAT) (Serpen et al, 2012b).

Os alimentos apresentam estruturas complexas nas quais os compostos antioxidantes podem estar presentes em diferentes formas, podendo ser completamente solúvel em solvente



ou não. A maioria dos alimentos apresenta uma mistura de compostos hidrofílicos e lipofílicos, que podem estar na forma livre ou na forma ligada a outras macromoléculas. Portanto, não há um único solvente ou mistura de solventes que possa solubilizar todos os compostos antioxidantes incorporados à microestrutura alimentar. Dessa forma, devido à polaridade diversificada dos antioxidantes, e ao fato de a maior parte deles estar ligada covalentemente à matriz insolúvel dos alimentos, a verdadeira medição da CAT ainda não está totalmente definida (Gökmen et al, 2009).

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).

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

A tilápia-do-nilo, *O. niloticus*, (Figura 6) pertencente à família dos ciclídeos, é originária da bacia do rio Nilo, no Leste da África, encontrando-se amplamente disseminada nas regiões tropicais e subtropicais, como em Israel, no Sudeste Asiático (Indonésia, Filipinas e Formosa) e no Continente Americano (USA, México, Panamá e toda a América do Sul). No Brasil foi introduzida, em 1971, por intermédio do Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS) nos açudes do Nordeste, difundindo-se para todo o país (Ayroza, 2009).

No Brasil, a tilápia do Nilo é o peixe de água doce mais cultivado em sistemas de aquicultura sendo responsável por aproximadamente 40% da produção total nacional nessa modalidade. 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. 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. Além disso, a tilápia do Nilo apresenta boa aceitação e elevado valor comercial, excelente conversão alimentar e, conseqüentemente, custos de produção relativamente baixos, o que a torna uma espécie de grande interesse para a piscicultura. (Carbonera, 2014b).

A espécie foi escolhida pelo seu rápido desenvolvimento, sua precocidade reprodutiva, pelas suas características desejáveis, como alta resistência a doenças e por tolerância a diferentes sistemas de produção. Foi desenvolvida a linhagem GIFT (Genetically Improved Farmed Tilapia) nas Filipinas, a qual marcou a história do melhoramento genético em peixes tropicais. Porém, os resultados obtidos determinaram a avaliação de seu desempenho em condições distintas, estimulando programas de pesquisa regionais para avaliar os resultados em diferentes climas e condições de cultivo (Bonafé, 2010).

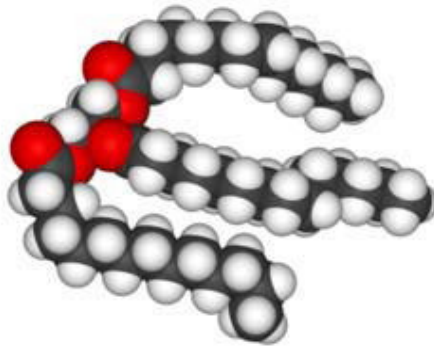
No entanto, quando comparados com os peixes de origem marinha, estes peixes de água doce, incluindo a tilápia, apresentam baixo conteúdo nos ácidos graxos alfa-linolênico (LNA, 18:3n-3), eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3), docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) e em outros ácidos graxos da série ômega-3 (n-3) (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).



**Figura 6.** Ilustração da Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

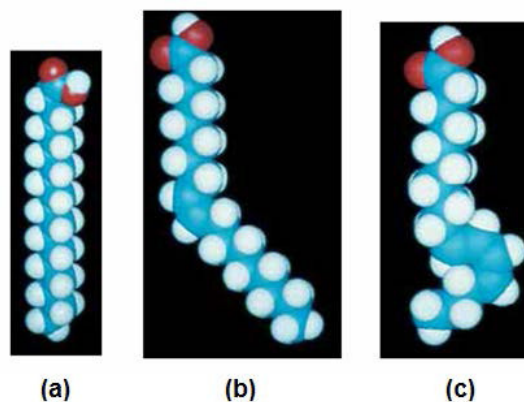
## **2.5. Óleos e Gorduras**

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, ligados na forma de ésteres a uma molécula de glicerol (Meher et al, 2006), como demonstrado na Figura 7.



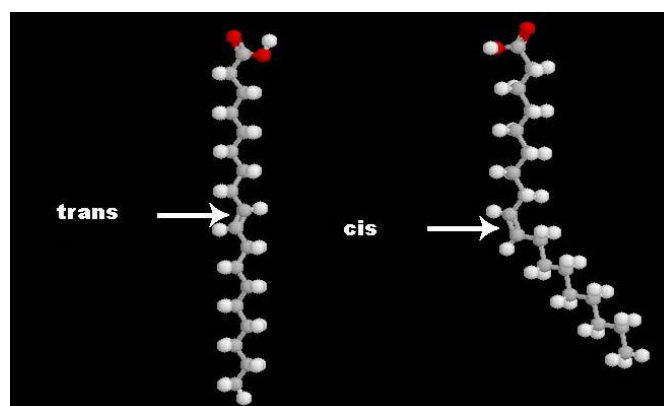
**Figura 7.** Representação da molécula de um triacilglicerol.

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos, classificados de acordo com o comprimento da cadeia carbônica em ácidos graxos de cadeia curta (menor 8 carbonos), média (8 a 16 carbonos) e longa (maior ou igual 18 carbonos), de acordo com as insaturações em saturado (sem insaturações), monoinsaturado (uma insaturação) e poli-insaturado (duas ou mais insaturações) (Figura 8) 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, et al, 2002).



**Figura 8.** Estruturas de ácidos graxos. (a) Ácidos graxos saturados (ácido esteárico, 18:0); (b) Ácidos graxos monoinsaturados (ácido oleico, 18:1n-9); (c) Ácidos graxos 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 9). 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 9.** Isômeros geométricos (*trans* e *cis*) do ácido oleico (18:1n-9).

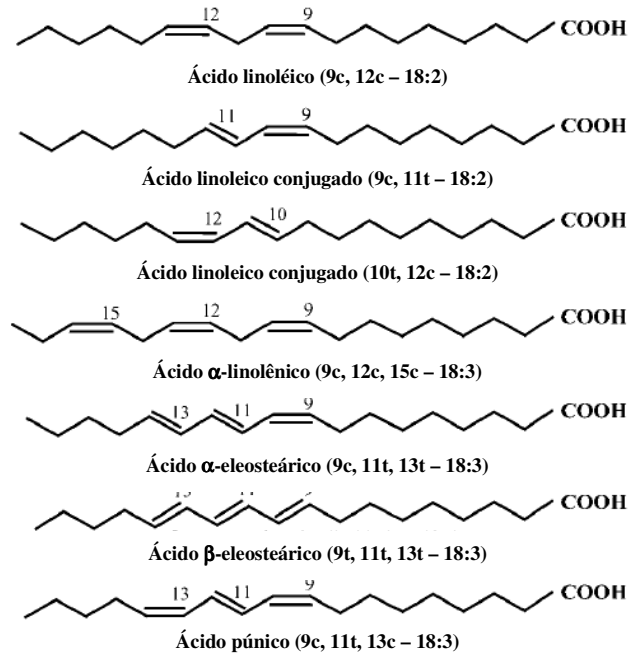
## 2.6. Ácido Linolênico Conjugado (CLnA)

Os ácidos graxos conjugados são o termo geral dado para um conjunto de isômeros posicionais e geométricos dos ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) conjugados com ligações duplas. Os ácidos graxos conjugados ocorrem naturalmente com duas, três e até mesmo quatro duplas conjugadas. O ácido linoleico conjugado (CLA) com duas duplas conjugadas são a classe ácidos graxos conjugados mais extensivamente estudados. Os isômeros de CLA têm apresentado favoráveis efeitos fisiológicos sobre a saúde, incluindo ação anticarcinogênica e antiaterogênica, regulação da gordura corporal e do metabolismo lipídico em animais e seres humanos. O número de isômeros de CLA foram identificados, sendo os dois principais isômeros o 18:2 - c9, t11 e o 18:2 - t10, c12, e estes dois isômeros foram relatados por exercerem papéis funcionais diferentes (Yuan et al, 2009a).

O CLnA, apresenta três insaturações conjugadas recentemente foram relacionado com os isômeros do CLA, devido aos seus efeitos citotóxicos em tumores de humanos, a inibição da carcinogênese e a alterações no metabolismo dos lipídios (Suzuki et al., 2001 e Yasui et al., 2005). Dessa forma há um crescente interesse em estudos envolvendo este ácido graxo conjugado (Lam et al., 2008 e Chardigny et al., 2003). Dentre os isômeros do CLnA, cinco têm sido encontrados em espécies vegetais, que são: ácido alfa-eleostearico, (alfa-ESA), ácido púnico (PA), ácido calêndico (18:3 - t8,t10,c12), ácido jacaarícico (18:3 - c8,t10,c12), e ácido catálpico (18:3 - t9,t11,c13) (Figura 10) (Iwabuchi et al, 2003). O alfa-ESA e PA foram encontrados em níveis de 60-80% em alguns óleos de sementes de algumas plantas (Tsuzuki et al., 2006 e Yuan et al., 2009a). A dieta em CLnA, é quantitativamente menor em óleos vegetais, ocorrendo até 0,2% em peso (Tsuzuki et al., 2003). No entanto, CLnA é encontrado em grandes quantidades em alguns tipos de óleos, tais como; tungue, romã, catalpa e momordica charantia (aproximadamente 60% de alfa-ESA), onde estes ácidos conjugados correspondem de 40 a 80% do total dos ácidos graxos. Estudos em ratos e camundongos mostraram que o alfa-ESA e PA podem ser convertidos em 9c, trans11-18:2 (Kim et al., 2002 e Yang et al., 2005). O alfa-ESA, é parcialmente saturado na posição C13 e convertido para 9c,11t-CLA, um dieno conjugado, após a administração em ratos (Tsuzuki et al., 2004). O CLnA possui diversas atividades biológicas. A mistura destes isômeros foi relatada como sendo um supressor potente sobre o crescimento de várias células tumorais (Kim et al., 2002).

Estudos anteriores mostraram que a suplementação de alfa-ESA ou PA ajudam a diminuir significativamente o colesterol hepático (Yang et al., 2005).

O PA também podem ser incorporados e metabolizado em 9c, 11t - 18: 2, em fígado, plasma, tecido adiposo, rim e cérebro de ratos. O PA pode suprir o surgimento de células cancerígenas na pele, mama e próstata e também diminuiu a acumulação de triacilglicerol no fígado de ratos (Tsuzuki et al, 2006).



**Figura 10.** Estruturas ácido linoléico, ácidos linoléico conjugados, ácido  $\alpha$ -linolênico, ácidos eleosteáricos e ácido púnico.

## 2.7. Óleo de romã

O perfil lipídico das sementes de romã também ganhou atenção devido ao seu alto teor de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI). Estudos recentes mostraram que o óleo de semente de romã é composto por 60 a 80 % de ácido linolênico conjugado (CLnA) (Jing, et al, 2012), dos quais o mais importante é o 9c, 11t, 13c - octadecatrienóico, conhecido como ácido púnico (PA). O teor de óleo nas sementes de romã pode variar de 12 a 20 %, em base seca. (Goula, 2013). O óleo de semente de romã pode reduzir o tecido adiposo, apresenta efeitos antiaterogênicos, ou seja, dificulta a formação de placas de gordura nas artérias além

de diminuir os níveis do colesterol LDL (Low Density Lipoproteins) e triglicérides no sangue (Jing, et al, 2012).

Óleo de sementes de romã, rico em ácido púrico, pode inibir a proliferação de vários tipos de células cancerígenas em seres humanos, como câncer de próstata e mama (Lucci et al, 2015). Apresenta também fitoestrogênios tais como estradiol, estriol e estrona, compostos que aliviam os efeitos da menopausa e protegem a pele dos radicais livres (Mori-Okamoto et al, 2004). Os polifenóis do óleo proporcionam uma potente atividade antioxidante que pode auxiliar na redução dos sinais de envelhecimento (Kim et al, 2002).

## **2.8. Análise Cromatográfica dos Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos**

Os primeiros estudos com cromatografia foram realizados pelo botânico russo Mikhael Semenovitch 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 et al, 2006). Com a expansão da cromatografia surgiu a cromatografia em fase gasosa, onde o solvente utilizado para transportar a amostra pela coluna foi substituído por um gás (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 et al, 2002).

A eficiência da separação foi alterada 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). 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 et al, 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 mecânica 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 análise pela facilidade e eficiência em 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 uma técnica que exige os analitos sejam estáveis à temperatura durante a análise cromatográfica, apresentarem 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 (Craske & Bannon, 1987). No entanto, a identificação dos compostos utilizando o DIC não pode ser conclusiva. Para aumentar a confiabilidade 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 e Franco, 2012; Tarley et al, 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 (Aguiar 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, 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 e 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 (FCE), cujo valor é determinado experimentalmente e o fator de correção teórico (FCT), 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, 2012).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar os efeitos das dietas em filés de tilápias do Nilo sobre a capacidade antioxidante e a composição em ácidos graxos.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Preparar as dietas controle e suplementada com farinha de semente de romã;
- Avaliar a composição proximal (umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais, carboidratos e valor energético) da farinha de semente de romã e das dietas desenvolvidas;
- Avaliar a capacidade antioxidante (DPPH, ABTS, FRAP e ORAC<sub>FL</sub>) da farinha de semente de romã, das dietas (rações) e dos filés de tilápia.
- Identificar e quantificar os ácidos graxos presentes nas rações e nos filés das tilápias.

### **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **4.1. Farinha da semente de romã**

Foi adicionado à ração do Tratamento II 11,64% de farinha de semente de romã. As romãs utilizadas no experimento foram coletadas na cidade de Apucarana/Paraná no período de novembro de 2013 a Janeiro de 2014. Para o preparo da farinha as sementes foram separadas da casca, em seguida foram espremidas para remoção da polpa, depois foram secas em estufa a 55°C por 10 horas e em seguida foram trituradas em um multiprocessador de alimentos para produção da farinha. A farinha resultante do processo foi peneirada (16 *mesh*) e acondicionadas à vácuo em embalagens de polietileno a -18°C até o preparo das rações.

#### **4.2. Extração do óleo**

A extração do óleo foi realizada utilizando um solvente orgânico (hexano). O hexano e a farinha semente de romã foram misturadas na proporção 4:1 (v/w) e permaneceram sob

agitação durante 3 h. A mistura foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min e, em seguida, o solvente foi evaporado à vácuo a 38 °C para se obter o óleo de sementes de romã.

### **4.3. Preparo das rações**

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

- *Tratamento I - Ração controle* – ração acrescida de 2,1% de óleo de soja;
- *Tratamento II* – ração acrescida de 11,64% de farinha de semente de romã;
- *Tratamento III* – ração acrescida de 2,1% de óleo de romã.

Para o preparo das rações, os ingredientes moídos e peneirados foram misturados com água para obtenção dos pellets, sendo que estes foram posteriormente secos em estufa com circulação de ar a 55°C por 10 horas, em seguida foram resfriados a temperatura ambiente e separados em pequenas porções, que foram acondicionadas à 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 três rações desenvolvidas.

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

<b>Ingredientes alimentares</b>	<b>Tratamento I</b>	<b>Tratamento II</b>	<b>Tratamento III</b>
Farelo se soja	53,65	53,65	53,65
Farelo de milho	23,28	11,64	23,28
Farinha de semente de romã	-	11,64	-
Gérmen de trigo	8,62	8,62	8,62
Farinha de arroz	7,66	7,66	7,66
Fosfato bicálcico	2,87	2,87	2,87
Óleo de soja	2,1	2,1	-
Óleo de Romã	-	-	2,1
Sal comum (NaCl)	0,48	0,48	0,48
Premix*	0,48	0,48	0,48
L – Lisina (HCl)	0,19	0,19	0,19
DL- Metionina	0,14	0,14	0,14
L - Treonina	0,14	0,14	0,14
Propionato de cálcio	0,1	0,1	0,1
Vitamina C fosfatada 35%	0,1	0,1	0,1
Cloreto de colina	0,1	0,1	0,1
L – triptofano	0,05	0,05	0,05
BHT**	0,04	0,04	0,04

\*Suplemento mineral e vitamínico; \*\* BHT – butil-hidroxitolueno. Tratamento I: ração controle; Tratamento II: ração suplementada com farinha de semente de romã; Tratamento III: ração suplementada com óleo de romã.

#### **4.4. Sistema de confinamento e preparo das amostras de peixe**

O estudo foi realizado no Laboratório de Química de Alimentos, Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá, no período de Janeiro a Fevereiro de 2014.

Foram utilizadas um total de 90 tilápias adquiridas na Codapar, localizado no distrito de Floriano, município de Maringá, Paraná. As tilápias apresentaram peso médio inicial de  $15,00 \pm 0,10$  g, sendo 30 peixes para cada tratamento. As tilápias foram distribuídas em três tanques de vidro com dimensões 34,0 cm x 24,5 cm x 49,0 cm (altura x largura x comprimento), como na Figura 11. Os peixes foram alimentados em duas porções diárias,

sendo 60 % da ração distribuída na parte da manhã e o restante (40 %) na parte da tarde. Cada aquário recebeu aeração constante, por meio da utilização de bombas próprias, mangueiras e ponteiros para o borbulhamento de ar. Foi empregado um filtro externo em cada aquário para a filtração e circulação da água. Para zelar pela qualidade da água, diariamente, fezes e resíduos de ração foram removidos do meio através de sifonação. Além disso, parte do volume de água de cada aquário (50 a 60 %) foi substituída por água limpa, previamente desclorada. Além disso, diariamente, foi medido o nível de amônia do meio, e quando necessário, foi empregado removedor de amônia, a fim de evitar a eutrofização nos aquários.

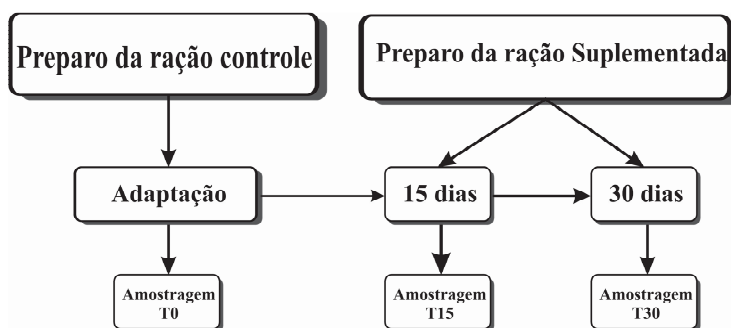


**Figura 11.** Sistema de confinamento das tilápias em tanques de vidro.

Primeiramente as tilápias passaram 7 dias em adaptação recebendo ração controle. Após esse período, foi retirada uma amostra de cada tanque (cerca de 10 peixes) e foram realizadas análises do tempo zero (zero dias de suplementação). Logo após iniciou-se o experimento fornecendo a ração suplementada aos peixes. Novas amostragens foram realizadas nos períodos de 15 e 30 dias de suplementação, coletando-se 10 peixes por tanque.

A cada coleta a quantidade de ração administrada foi recalculada devido à variação na quantidade de peixes em cada tanque. A Figura 12 mostra um fluxograma simplificado do delineamento experimental utilizado.

Após cada amostragem, as tilápias foram sacrificadas, evisceradas e filetadas. Os filés foram embalados a vácuo em sacos de polietileno e foram mantidos a  $-18^{\circ}\text{C}$  para análises posteriores. Antes de cada análise os filés foram descongelados, triturados em multiprocessador de alimentos e devidamente homogeneizados.



**Figura 12.** Fluxograma simplificado do delineamento experimental.

#### 4.5. Composição proximal das rações e da farinha de semente de romã

Os teores de umidade e cinzas foram determinados gravimetricamente, conforme técnicas da AOAC (Cunnif, 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, conforme a técnica AOAC (Cunnif, 1998). Os lipídios foram extraídos com uma mistura clorofórmio-metanol-água (2:2:1,8, v/v/v), segundo Bligh & Dyer (1959), sendo ser 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).

#### 4.6. Extração e Derivatização dos Lipídios Totais

Assim como nas rações, os lipídios totais dos filés de tilápia foram extraídos segundo Bligh et al. (1959). A metilação dos ácidos graxos dos lipídios totais foi realizada segundo o método de Hartman & Lago (1973).

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

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram separados em um 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 µm de cianopropil). As vazões dos gases foram de 1,2 mL min<sup>-1</sup> para o gás de arraste (H<sub>2</sub>); 30 mL min<sup>-1</sup> para o gás auxiliar (N<sub>2</sub>) e 35 e 350 mL min<sup>-1</sup> para o H<sub>2</sub> e para 36 o ar sintético, respectivamente, para a chama do detector. O volume injetado foi de 2,0 µL, 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 min<sup>-1</sup> até atingir 185°C, permanecendo assim por 4,67 min, seguido por nova rampa de aquecimento de 6°C min<sup>-1</sup> 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) 189-19, da marca SIGMA (USA), e os cálculos das concentrações foram realizados utilizando os fatores de correção teóricos descritos por Visentainer (2012). A quantidade de ácidos graxos nas amostras foi calculada em mg g<sup>-1</sup> de lipídios totais (mg g<sup>-1</sup> de LT) utilizando a Equação 1.

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

Onde:  $M_x$  é a massa 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.

#### **4.8. Capacidade antioxidante**

A capacidade antioxidante das rações e dos filés foi determinada por meio dos ensaios DPPH, FRAP e ABTS, utilizando-se volumes de 10 mL e de 50 mL de cada reagente. Também foram analisadas as frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) e lipofílica (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub>. Para todas as análises foi utilizado como padrão de referência o Trolox (ácido-6 hidroxil-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico), para converter a capacidade de inibição de cada amostra para capacidade antioxidante em equivalente Trolox (ET).

##### **4.8.2. Solução de DPPH**

A solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) foi preparada pela dissolução de 80 mg do radical DPPH em 200 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v), seguido de adição de 800 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v). Os valores de absorvância foram determinados em 525 nm (Serpen et al., 2012a). Soluções metanólicas de Trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção da curva de calibração ( $y = 1,945x + 3,197$ ,  $R^2 = 0,998$ , para volume de 10 mL e  $y = 1,902x + 3,308$ ,  $R^2 = 0,997$  para volume de 50 mL), sendo a capacidade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

##### **4.8.3. Solução de FRAP**

A solução de FRAP foi preparada pela diluição de uma solução aquosa de 10  $\text{mmol L}^{-1}$  do reagente TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-1,3,5-triazina) e 20  $\text{mmol L}^{-1}$  de cloreto férrico anidro ( $\text{FeCl}_3$ ) em uma solução tampão 300  $\text{mmol L}^{-1}$  de acetato de sódio e ácido acético (pH



3,6) na proporção 1:1:10 (v/v/v), como descrito por Benzie et al (1996), as leituras de absorvância foram realizadas em 593 nm. Soluções metanólicas de Trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção das curvas de calibração ( $y = 0,043x + 0,006$ ,  $R^2 = 0,998$ , para volume de 10 mL e  $y = 0,042x - 0,009$ ,  $R^2 = 0,998$  para volume de 50 mL), sendo a capacidade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

#### **4.8.4. 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 ( $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$ ). A solução final ficou em repouso, ao abrigo da luz e temperatura ambiente por 16 horas, sendo os 10 mL da solução final diluídos com aproximadamente 400 mL de uma mistura etanol/água (50:50, v/v) antes da utilização. As leituras de absorvância foram realizadas em 734 nm (Serpen et al., 2012a). Soluções metanólicas de Trolox em diferentes concentrações foram utilizadas para a obtenção das curvas de calibração ( $y = 2,443x + 5,876$ ,  $R^2 = 0,998$ , para volume de 10 mL e  $y = 2,596x + 5,746$ ,  $R^2 = 0,999$ , para volume de 50 mL), sendo a capacidade antioxidante expressa em  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

#### **4.8.5. Ensaio de capacidade antioxidante seguindo procedimento QUENCHER**

Os ensaios DPPH, FRAP e ABTS foram realizados seguindo o procedimento QUENCHER (Serpen et al, 2012a). Antes da realização do procedimento as amostras foram secas em liofilizador e depois peneiradas (80 *mesh*) para evitar qualquer interferência granulométrica, pois a capacidade antioxidante é medida através do contato direto do radical (reagente) com a amostra. Em seguida 10,0 mg da amostra de ração controle e dos filés de tilápia foram pesados em tubos de ensaio protegidos da luz e 10 mL das respectivas soluções de trabalho foram adicionados aos tubos para iniciar as reações. Os tubos permaneceram sob agitação por 60 minutos seguidos de centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos. A absorvância dos sobrenadantes foi medida em 252 nm (ensaio DPPH), 593 nm (ensaio FRAP) e 734 nm (ensaio ABTS).

Nas amostras da ração de farinha de semente de romã e da farinha da semente de romã foram necessárias diluições com celulose nas proporções de 1:2 a 1:5 (m/m), para os ensaios DPPH, FRAP e ABTS. Em seguida 10,0 mg da amostra de ração e da farinha de semente de romã foram pesados em béqueres protegidos da luz e 50 mL das respectivas soluções de trabalho foram adicionados à amostra para iniciar as reações. As amostras permaneceram sob agitação por 60 minutos, o conteúdo dos béqueres foram transferidos para tubos de centrífuga para centrifugação que ocorreu a 5000 rpm por 10 minutos. A absorbância dos sobrenadantes foi medida em 252 nm (ensaio DPPH), 593 nm (ensaio FRAP) e 734 nm (ensaio ABTS).

#### **4.9. Capacidade antioxidante determinada pelo Ensaio ORAC<sub>FL</sub> (Oxygen Radical Absorbance Capacity)**

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

##### **4.9.2. Extratos Lipofílicos (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub>**

No preparo dos extratos lipofílicos do ensaio ORAC<sub>FL</sub>, 0,5g 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 segundos, seguidos de sonicação a 37°C por 5 minutos. Os tubos foram agitados duas vezes durante a etapa para suspender as amostras. Na sequência, os tubos permaneceram à temperatura ambiente por 10 minutos com agitação ocasional. Posteriormente, todas as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 10 minutos 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 rotativo a 30°C e o extrato hexânico seco foi dissolvido em 1,5 mL de acetona e 4,5 mL de solução 7% de RMDC ( $\beta$ -ciclodextrina aleatoriamente destilada) (50% acetona: 50% água, v/v).

No ensaio L-ORAC<sub>FL</sub>, os extratos foram diluídos com solução 7% de RMDC em acetona/água (50:50, v/v) até uma concentração apropriada para estar dentro do intervalo de concentração da curva padrão. A solução 7% de RMDC foi utilizada como branco e para dissolver os padrões de Trolox no ensaio lipofílico.

#### **4.9.3. Extratos Hidrofílicos (H-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub>**

As extrações hidrofílicas foram realizadas com os resíduos resultantes 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 minutos 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 curva padrão. 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>.

#### **4.9.4. 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 espectrofluorímetro da marca PerkinElmer, modelo Victor<sup>TM</sup> X4, utilizando microplacas pretas de 96 poços, em que a medida de excitação/emissão é feita a partir do topo da placa.

Uma porção de 20 µL das amostras diluídas foi adicionada à cada uma das células da microplaca seguida pela adição de 200 µL de solução 0,004 µmol L<sup>-1</sup> de fluoresceína sódica preparada como descrito por Prior et al (2003). A microplaca foi inserida no espectrofluorímetro por 5 minutos para estabilização da temperatura. Em seguida 75 µL da solução de AAPH (2,2'- azobis-(2-amino-propano dihidrocloreto), diluída em tampão fosfato 0,075 molL<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 adicionadas a cada célula. As leituras foram iniciadas imediatamente em intervalos de 1 minuto durante 30 minutos de análise. Os comprimentos de onda de excitação e 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 ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) 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 2.

$$AUC = (1 + f_1 / f_0 + f_2 / f_0 + \dots + f_n / f_0) \quad (2)$$

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 é 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).

#### **4.10. Análise estatística**

Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas por meio do Teste-t, utilizando o software Microsoft Office Excel, versão 2007 e do teste de Tukey, através do programa Statistica, versão 8.0. O nível de significância utilizado para rejeição da hipótese nula foi 5% ( $p < 0,05$ ).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Composição proximal da farinha de semente de romã e das rações formuladas

Os resultados obtidos nas análises de umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais, carboidratos, valor energético e capacidade antioxidante da farinha de semente de romã, estão apresentados na Tabela 2.

De acordo com os resultados obtidos para análise da composição proximal da farinha de semente de romã pode-se observar que este ingrediente apresenta grande quantidade de carboidratos ( $50,95 \pm 2,845$  %) se comparado com o farelo de soja (14 %) e de milho (39%) (Massi e Rezende, 2013). A farinha de semente de romã apresentou teor de proteína bruta ( $16,07 \pm 0,253$  %) menor que os encontrados em farelo de soja (49,74 %) e maiores aos encontrados em farelo de milho (8,84%) (Zeoula et al, 2003). O valor encontrado para análise de lipídios totais ( $17,89 \pm 0,408$  %) se apresentou dentro do esperado, segundo descrito por Goula (2013), que é de 12 a 20 % de óleo. Este valor se apresentou superior aos encontrados em farelo de soja (5%) e de milho (12%) (Massi e Rezende, 2013).

**Tabela 2.** Composição proximal e capacidade antioxidante da farinha de semente de romã.

Composição Proximal (%)		Capacidade Antioxidante ( $\mu\text{mol ETg}^{-1}$ )	
Umidade*	$11,42 \pm 0,0231$	FRAP	$231,20 \pm 7,242$
Cinzas	$3,67 \pm 0,0026$	ABTS	$165,71 \pm 6,530$
Proteína Bruta	$16,07 \pm 0,253$	DPPH	$365,54 \pm 10,62$
Lipídios Totais	$17,89 \pm 0,408$	H-ORAC <sub>FL</sub>	$217,56 \pm 14,58$
Carboidratos	$50,95 \pm 2,845$	L-ORAC <sub>FL</sub>	$392,92 \pm 19,07$
Valor energético ( $\text{kcal g}^{-1}$ )	$429,12 \pm 9,530$	CAT*	$610,48 \pm 24,00$

\*Os resultados da análise de umidade foram expressos em base seca. \*CAT: capacidade antioxidante total = (H-ORAC<sub>FL</sub> + L-ORAC<sub>FL</sub>).

Em relação aos ensaios de capacidade antioxidante pode-se observar que a farinha de semente de romã apresentou elevada capacidade antioxidante para todas as técnicas, onde pode-se destacar o ensaio DPPH ( $365,54 \pm 10,62 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e ao ensaio L-ORAC<sub>FL</sub> ( $392,92 \pm 19,07 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) que apresentaram os maiores valores de capacidade antioxidante. O resultado obtido no ensaio L-ORAC<sub>FL</sub> representa cerca de 64,36 % da

capacidade antioxidante total do ensaio ORAC<sub>FL</sub> (CAT = 610,48 ± 24,00 μmol ET g<sup>-1</sup>), isso pode explicar como os antioxidantes de origem lipofílica tem maior potencial de bioatividade do que os antioxidantes de origem hidrofílica, pois podem atravessar as membranas de células lipoproteicas de forma mais eficaz (Huang et al, 2002).

Os resultados obtidos nas análises de umidade, cinzas, proteína bruta, lipídios totais, carboidratos e valor energético da ração do Tratamento I (controle), do Tratamento II (suplementada com farinha de semente de romã) e do Tratamento III (suplementada com óleo de romã) estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3. Composição proximal das rações do Tratamento I, II e III.**

	<b>Tratamento I (%)</b>	<b>Tratamento II (%)</b>	<b>Tratamento III (%)</b>
Umidade	7,110 ± 0,00144 <sup>B</sup>	8,090 ± 0,00154 <sup>A</sup>	5,166 ± 0,0035 <sup>C</sup>
Cinzas	7,620 ± 0,0102 <sup>A</sup>	7,070 ± 0,0097 <sup>B</sup>	9,552 ± 0,0300 <sup>C</sup>
Proteína bruta	33,68 ± 0,180 <sup>A</sup>	31,62 ± 1,431 <sup>A</sup>	33,56 ± 0,2573 <sup>A</sup>
Lipídios totais	4,060 ± 0,712 <sup>A</sup>	4,587 ± 1,297 <sup>A</sup>	5,902 ± 0,750 <sup>A</sup>
Carboidratos	47,82 ± 0,685 <sup>A</sup>	48,63 ± 1,569 <sup>A</sup>	45,82 ± 0,793 <sup>A</sup>
Valor energético (kcal g <sup>-1</sup> )	359,80 ± 3,564 <sup>A</sup>	362,28 ± 0,945 <sup>A</sup>	370,64 ± 1,121 <sup>A</sup>

Médias dos valores ± desvio padrão; n = 3. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey. Tratamento I: tratamento controle; Tratamento II: tratamento com ração enriquecida com farinha de romã, Tratamento III: tratamento com ração enriquecida com óleo de romã.

Comparando-se os resultados obtidos pode-se observar diferença significativa (p<0,05) somente para as análises de umidade e cinzas das rações formuladas. A umidade da ração do Tratamento II se apresentou mais elevada, isso pode ser devido ao fato de que essa ração foi enriquecida com farinha de semente de romã, que também apresentou umidade relativamente elevada. Quanto às demais análises não foram observadas diferenças significativas (p>0,05), garantindo assim a característica desejada de serem isoproteicas e isocalóricas. Esse fator é de extrema importância, pois a ocorrência de variáveis desordenadas durante o experimento é uma característica indesejada.

## 5.2. Capacidade antioxidante das rações formuladas

Para a determinação da capacidade antioxidante das rações formuladas foram aplicados os ensaios FRAP, ABTS e DPPH, seguindo-se o 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 estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Capacidade antioxidante das rações do Tratamento I, II e III ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

Ensaio	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
FRAP	18,33 $\pm$ 0,3108 <sup>B</sup>	50,74 $\pm$ 2,550 <sup>A</sup>	11,26 $\pm$ 0,4982 <sup>C</sup>
ABTS	9,989 $\pm$ 0,2837 <sup>C</sup>	186,40 $\pm$ 6,894 <sup>A</sup>	22,03 $\pm$ 1,939 <sup>B</sup>
DPPH	19,32 $\pm$ 0,6236 <sup>B</sup>	94,53 $\pm$ 2,531 <sup>A</sup>	12,79 $\pm$ 0,7207 <sup>C</sup>
H-ORAC <sub>FL</sub>	21,16 $\pm$ 1,448 <sup>C</sup>	115,08 $\pm$ 8,613 <sup>A</sup>	95,89 $\pm$ 2,216 <sup>B</sup>
L-ORAC <sub>FL</sub>	7,939 $\pm$ 0,6556 <sup>C</sup>	9,374 $\pm$ 0,460 <sup>B</sup>	19,47 $\pm$ 0,4801 <sup>A</sup>
CAT*	29,10 $\pm$ 1,589 <sup>C</sup>	124,45 $\pm$ 8,074 <sup>A</sup>	115,36 $\pm$ 2,267 <sup>B</sup>

Médias dos valores de desvio padrão; n = 4. Diferentes letras minúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo Teste Tukey. Tratamento I: tratamento controle; Tratamento II: tratamento com ração enriquecida com farinha de romã, Tratamento III: tratamento com ração enriquecida com óleo de romã \*CAT: capacidade antioxidante total = (H-ORAC<sub>FL</sub> + L-ORAC<sub>FL</sub>).

Para os ensaios FRAP, ABTS e DPPH foi utilizado o procedimento QUENCHER, para determinação da capacidade antioxidante da ração do Tratamento I, II e III. Pode-se observar que a ração do Tratamento II (suplementada com farinha de semente de romã) apresentou capacidade antioxidante superior à ração do Tratamento I (controle) e à do Tratamento III (suplementada com óleo de romã), com aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da capacidade antioxidante dessa ração. Os altos valores de capacidade antioxidante dessa ração podem estar relacionados ao fato de que a farinha de semente de romã, adicionada a esse tratamento, apresentou elevada capacidade antioxidante, para todos os ensaios.

Os resultados obtidos para as frações H-ORAC<sub>FL</sub> e L-ORAC<sub>FL</sub> do ensaio ORAC<sub>FL</sub> apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ), tendo como destaque as frações H-ORAC<sub>FL</sub> do Tratamento II (115,08  $\pm$  8,613  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) que apresentou capacidade antioxidante superior a do Tratamento I (21,16  $\pm$  1,448  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e do Tratamento III (95,89  $\pm$  2,216  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), assim como foi superior ao encontrado por Carbonera et al. (2014a) para ração

suplementada com 0,28 % de extrato etanólico de resíduo de acerola ( $60,16 \pm 1,82 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). A capacidade antioxidante da fração L-ORAC<sub>FL</sub> do Tratamento III ( $19,47 \pm 0,4801 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) se apresentou superior a do Tratamento I ( $7,939 \pm 0,6556 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e a do Tratamento II ( $9,374 \pm 0,460 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) assim como foi superior ao obtido por Carbonera et al. (2014a) para sua ração suplementada com extrato etanólico de resíduo de acerola ( $1,76 \pm 0,13 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

### **5.3. Capacidade antioxidante dos filés de tilápia**

Em alimentos com matriz heterogênea e complexa, tais como carnes e produtos cárneos, sua atividade antioxidante não pode ser avaliada por um único método. Dois ou mais ensaios são necessários para investigar a capacidade antioxidante das amostras, pois cada método apresenta um mecanismo químico diferente que refletem as propriedades antioxidantes das amostras (Serpen et al, 2012a). Neste trabalho para a determinação da capacidade antioxidante dos filés de tilápia foram aplicados os ensaios FRAP, ABTS e DPPH, seguindo o procedimento QUENCHER, e foram analisadas as frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) e lipofílicas (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub>. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 6.

Comparando-se a capacidade antioxidante dos filés de tilápia para o ensaio FRAP (Tabela 5), entre os Tratamentos I, II e III, foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os períodos de 15 e 30 dias de confinamento, para os três tratamentos, sendo que os maiores valores de capacidade antioxidante foram encontrados nos filés das tilápias que receberam a ração suplementada contendo a farinha de semente de romã. Analisando os resultados obtidos ao longo do período de confinamento, observa-se que os filés de tilápia não apresentam o mesmo comportamento. Como os filés referentes ao tempo zero apresentam a mesma origem, os resultados são os mesmos para cada tratamento ( $9,20 \pm 0,26 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), não apresentando diferença estatística ( $p > 0,05$ ). Os filés do Tratamento I apresentaram uma redução na capacidade antioxidante entre os tempos zero e 30 dias ( $6,59 \pm 0,30 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) confinamento. No entanto, os filés do Tratamento II apresentaram um aumento no tempo de 15 dias ( $9,84 \pm 0,33 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e em seguida uma redução, na capacidade antioxidante, para



o tempo de 30 dias ( $8,07 \pm 0,11 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). Para os filés do Tratamento III não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) na capacidade antioxidante entre os tempos de 15 e 30 dias.

Os valores de capacidade antioxidante encontrados no ensaio FRAP para os filés de tilápia, dos três tratamentos, foram superiores aos encontrados por Serpen et al (2012a) para carne bovina ( $4,9 \pm 0,2 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e para carne de peixe ( $3,0 \pm 0,1 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). Em geral, o poder antioxidante das amostras se apresentou menor, em comparação com os ensaios ABTS e DPPH. O método FRAP se baseia na redução do complexo  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{+3}]$  à sua forma ferrosa,  $[\text{Fe}(\text{TPTZ})_2^{+2}]$ , em pH baixo. Os baixos valores encontrados para o ensaio FRAP podem ser devido à fraca capacidade antioxidante da carne para reduzir o íon férrico a sua forma ferrosa (Serpen et al, 2012a). O ensaio FRAP determina basicamente a capacidade antioxidante de compostos de origem hidrofílica, mas não responde bem aos compostos de origem lipofílica (Carbonera, et al, 2014a).

**Tabela 5.** Capacidade antioxidante dos filés de tilápia do Tratamento I, II e III ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

<b>FRAP</b>			
Tempo	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	$9,20 \pm 0,26^{aA}$	$9,20 \pm 0,26^{bA}$	$9,20 \pm 0,26^{aA}$
15 Dias	$7,03 \pm 0,27^{bC}$	$9,84 \pm 0,33^{aA}$	$7,72 \pm 0,18^{bB}$
30 Dias	$6,59 \pm 0,30^{bB}$	$8,07 \pm 0,11^{cA}$	$7,70 \pm 0,10^{bA}$
<b>ABTS</b>			
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	$48,22 \pm 1,20^{aA}$	$48,22 \pm 1,20^{aA}$	$48,22 \pm 1,20^{aA}$
15 Dias	$32,02 \pm 0,93^{bB}$	$36,83 \pm 1,25^{bA}$	$30,92 \pm 0,81^{bB}$
30 Dias	$29,24 \pm 0,70^{cA}$	$30,07 \pm 1,38^{cA}$	$27,58 \pm 1,43^{cB}$
<b>DPPH</b>			
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	$23,93 \pm 0,33^{cA}$	$23,93 \pm 0,33^{bA}$	$23,93 \pm 0,33^{aA}$
15 Dias	$25,71 \pm 0,16^{bB}$	$30,75 \pm 0,46^{aA}$	$22,67 \pm 0,53^{bC}$
30 Dias	$35,65 \pm 1,16^{aA}$	$31,72 \pm 0,89^{aB}$	$22,70 \pm 0,11^{bC}$

Médias dos valores  $\pm$  desvio padrão; n = 4. Diferentes letras minúsculas na mesma coluna indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey, para a mesma técnica de análise. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo Teste de Tukey para a mesma técnica de análise. Tratamento I: tratamento com ração

controle; Tratamento II: tratamento com ração enriquecida com farinha de romã; Tratamento III: tratamento com ração enriquecida com óleo de romã.

Analisando a capacidade antioxidante dos filés de tilápia para o ensaio ABTS (Tabela 5), observa-se que entre os tratamentos (T I, T II e T III) foi encontrada diferença significativa ( $p < 0,05$ ) para os períodos de 15 e 30 dias de confinamento, para cada tratamento, sendo que os maiores valores foram encontrados nos filés das tilápias que receberam a ração suplementada com farinha de semente de romã. Foi possível observar nos resultados obtidos ao longo do período de confinamento, que os filés de tilápia do Tratamento I e II apresentaram o mesmo comportamento, houve uma redução em suas capacidades antioxidantes entre o tempo zero e o tempo de 30 dias. Sendo que o valor obtido no tempo de 30 dias ( $30,07 \pm 1,38 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) do Tratamento II foi superior ao obtido no mesmo período para o Tratamento I ( $29,24 \pm 0,70 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). Os filés do tempo zero ( $48,22 \pm 1,20 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) apresentam a mesma origem para os dois tratamentos, portanto não existe diferença estatística ( $p > 0,05$ ) em sua capacidade antioxidante. No entanto, para os filés de tilápia do Tratamento III observa-se que houve uma redução na capacidade antioxidante entre o tempo zero e o tempo de 30 dias de tratamento.

Os valores encontrados para o ensaio ABTS, para os filés de tilápia, foram inferiores aos encontrados por Serpen et al (2012a) para carne de frango ( $51,7 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). Sacchetti et al (2008) investigaram a capacidade antioxidante do radical ABTS<sup>•+</sup> para extratos hidrofílicos e lipofílicos de amostras carne de frango, por processos clássicos de extração. Os autores relataram que as capacidades antioxidantes foram de 10,3 e 5,3  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  para os extratos hidrofílicos e lipofílicos, respectivamente. Isto revelou um total de 15,6  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ , que é cerca de 52 % menor que o valor obtido no presente estudo. Este resultado encontrado anteriormente, comparando-se com o procedimento QUENCHER, é, provavelmente, devido ao fato de que existe a contribuição dos compostos que não estão solubilizados, diferente do que ocorre em ensaios que utilizam extratos. No procedimento QUENCHER é possível avaliar a capacidade antioxidante sem uma extração preliminar, pois o radical atua diretamente na superfície da matriz do alimento, determinando assim a capacidade antioxidante de compostos ligados a matriz insolúvel (Tufan et al, 2013).

Observando a capacidade antioxidante dos filés de tilápia do ensaio DPPH (Tabela 5), foi encontrada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os Tratamentos I, II e III para os períodos de 15 e 30 dias de confinamento, sendo que os maiores valores foram obtidos para

os filés de tilápias alimentados com ração suplementada com farinha de semente de romã. Analisando os resultados obtidos ao longo do período de confinamento, também foi possível observar um comportamento semelhante entre o Tratamento I e o Tratamento II, houve um aumento na capacidade antioxidante do tempo zero para o tempo de 30 dias. O valor obtido para o tempo de 30 dias ( $31,72 \pm 0,89 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) do Tratamento II foi próximo ao obtido no mesmo período para o Tratamento I ( $35,65 \pm 1,16 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). Os filés referentes ao tempo zero apresentam a mesma origem, assim, os resultados são os mesmos para cada tratamento ( $23,93 \pm 0,33 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), não havendo diferença estatística entre eles. Já para o Tratamento III observou-se uma redução na capacidade antioxidante entre o tempo zero e o tempo de 30 dias, sendo que não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os tempos de 15 e 30 dias.

Os valores encontrados, neste trabalho, para os filés de tilápia do Tratamento II, para o ensaio DPPH, foram próximos aos encontrados por Serpen et al (2012a) para carne de porco ( $31,0 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), carne bovina ( $29,0 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), carne de frango ( $30,0 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e para carne de peixe ( $19,1 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). O radical DPPH<sup>•</sup> é mais indicado para sistemas hidrofóbicos, uma vez que melhor se solubiliza em solventes de baixa polaridade, enquanto o radical ABTS<sup>•+</sup> é aplicável em ambos sistemas, hidrofílico e lipofílico. Esta diferença de ação entre os radicais DPPH<sup>•</sup> e ABTS<sup>•+</sup> ajuda a explicar a tendência nos valores encontrados da capacidade antioxidante dos filés de tilápia em ambos os ensaios, onde se podem observar melhores resultados para o ensaio ABTS sobre o ensaio DPPH (Carbonera et al, 2014a). Além disso, é provável que o radical DPPH<sup>•</sup> seja mais seletivo do que o radical ABTS<sup>•+</sup>, em reações com espécies doadoras de H (hidrogênio) (Serpen et al, 2012a).

A tabela 6 apresenta os resultados obtidos para nos ensaios H-ORAC<sub>FL</sub>, L-ORAC<sub>FL</sub> e capacidade antioxidante total (CAT), para os filés de tilápia do Tratamento I, II e III.

**Tabela 6.** Capacidade antioxidante dos filés de tilápia do Tratamento I, II e III determinada pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub> (μmol ET g<sup>-1</sup>).

<b>H-ORAC<sub>FL</sub></b>			
Tempo	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	31,57 ± 3,01 <sup>bA</sup>	31,57 ± 3,01 <sup>bA</sup>	31,57 ± 3,01 <sup>bA</sup>
15 Dias	30,03 ± 1,65 <sup>bA</sup>	10,22 ± 0,86 <sup>cC</sup>	25,20 ± 0,25 <sup>aB</sup>
30 Dias	41,56 ± 2,90 <sup>aB</sup>	62,70 ± 4,60 <sup>aA</sup>	29,50 ± 0,94 <sup>aC</sup>
<b>L-ORAC<sub>FL</sub></b>			
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	49,01 ± 1,54 <sup>aA</sup>	49,01 ± 1,54 <sup>aA</sup>	49,01 ± 1,54 <sup>aA</sup>
15 Dias	40,65 ± 2,83 <sup>bA</sup>	7,30 ± 0,62 <sup>cC</sup>	22,53 ± 2,01 <sup>bB</sup>
30 Dias	23,78 ± 1,62 <sup>cA</sup>	16,16 ± 0,68 <sup>bC</sup>	17,80 ± 1,44 <sup>bB</sup>
<b>CAT*</b>			
	Tratamento I	Tratamento II	Tratamento III
0 Dias	80,58 ± 3,38 <sup>aA</sup>	80,58 ± 3,38 <sup>aA</sup>	80,58 ± 3,38 <sup>aA</sup>
15 Dias	70,68 ± 3,27 <sup>bA</sup>	17,52 ± 1,06 <sup>bC</sup>	47,73 ± 2,03 <sup>aB</sup>
30 Dias	65,34 ± 3,32 <sup>bB</sup>	78,86 ± 4,65 <sup>aA</sup>	47,30 ± 1,72 <sup>bC</sup>

Médias dos valores \_desvio padrão; n = 4. Diferentes letras minúsculas na coluna mesma indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste de Tukey, para a mesma técnica de análise. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo Teste de Tukey para a mesma técnica de análise. Tratamento I: tratamento controle; Tratamento II: tratamento com ração enriquecida com farinha de romã; Tratamento III: tratamento com ração enriquecida com óleo de romã. \*CAT: capacidade antioxidante total = (H-ORAC<sub>FL</sub> + L-ORAC<sub>FL</sub>).

Com relação aos resultados obtidos nas análises das frações hidrofílicas (H-ORAC<sub>FL</sub>) e das frações lipofílicas (L-ORAC<sub>FL</sub>) do ensaio ORAC<sub>FL</sub> (Tabela 6), pode-se observar que os antioxidantes de natureza hidrofílica são os maiores contribuintes na capacidade antioxidante total para o Tratamento II e III. O mesmo foi observado por Wu et al (2008) ao analisar carne bovina e por Carbonera et al (2014a) ao analisar filés de tilápia. O mesmo não ocorre para os filés do Tratamento I.

Analisando-se os resultados encontrados para as frações H-ORAC<sub>FL</sub> e L-ORAC<sub>FL</sub> do ensaio ORAC<sub>FL</sub> (Tabela 6), verifica-se que houve um aumento significativo (p<0,05) na capacidade antioxidante dos filés do Tratamento II e do Tratamento III no período de 15 a 30

dias de confinamento. Observa-se que o maior valor de capacidade antioxidante encontrado para a fração H-ORAC<sub>FL</sub> foi nos filés do Tratamento II com o tempo de 30 dias de suplementação ( $62,70 \pm 4,60 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) sendo este superior ao encontrado para o Tratamento I ( $41,56 \pm 2,90 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e para o Tratamento III ( $29,50 \pm 0,94 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), assim como foi superior ao encontrado por Carbonera et al (2014a) ( $11,96 \pm 0,51 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ), com o mesmo período de suplementação.

Ao analisar os resultados da fração L-ORAC<sub>FL</sub>, para os Tratamentos II e III, também foi observado um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na capacidade antioxidante dos filés no período de 15 a 30 dias de suplementação, sendo os maiores valores foram obtidos para o Tratamento III, no período de 30 dias de suplementação ( $17,80 \pm 1,44 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ). Este valor encontrado foi superior ao obtido por Carbonera et al (2014a) ( $2,60 \pm 0,13 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) para filés de tilápias com o mesmo tempo de suplementação.

Para avaliar de modo geral a capacidade antioxidante encontrada nos filés de tilápia no ensaio ORAC<sub>FL</sub>, foi determinada a capacidade antioxidante total (CAT), que equivale o somatório dos resultados encontrados em ambas as frações, hidrofílicas e lipofílicas, dos filés (Tabela 6). Observa-se que para os filés de tilápia do Tratamento I e III a capacidade antioxidante total (CAT) diminuiu de forma significativa ( $p < 0,05$ ) com o passar do tempo, no entanto, para os filés de tilápia do Tratamento II esse valor se mantém, sem apresentar diferença estatística ( $p > 0,05$ ), do tempo zero ( $80,58 \pm 3,38 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ) e para o tempo de 30 dias ( $78,86 \pm 4,65 \mu\text{mol ET g}^{-1}$ ).

As diferenças entre os resultados obtidos nos ensaios de capacidade antioxidante seguindo o procedimento QUENCHER (FRAP, ABTS e DPPH) 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 FRAP, ABTS e DPPH são baseados no mecanismo de transferência de elétron (Müller et al, 2011) e foram aplicados seguindo o 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 uma etapa prévia de extração, determinando separadamente a capacidade antioxidante das frações hidrofílicas e lipofílicas 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 (Müller et al, 2011 e Huang et al, 2002).

#### 5.4. Composição em ácidos graxos das rações formuladas

A análise de composição em ácidos graxos foi realizada somente para o Tratamento I (controle) e para o tratamento II (suplementada com farinha de semente de romã). A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos para a análise de composição em ácidos graxos para das rações formuladas, para os Tratamentos I e II.

**Tabela 7.** Composição em ácidos graxos das rações suplementadas para o Tratamento I e Tratamento II (mg de ácido graxo g<sup>-1</sup> de lipídios totais).

Ácido graxo	Tratamento I	Tratamento II
14:0	5,22 ± 0,22 <sup>A</sup>	1,09 ± 0,12 <sup>B</sup>
16:0	132,14 ± 3,19 <sup>A</sup>	100,99 ± 4,10 <sup>B</sup>
16:1n-7	4,69 ± 0,14 <sup>A</sup>	1,74 ± 0,10 <sup>B</sup>
18:0	28,99 ± 0,51 <sup>A</sup>	25,65 ± 0,89 <sup>b</sup>
18:1n-9	184,79 ± 4,24 <sup>A</sup>	146,89 ± 3,61 <sup>B</sup>
18:1n-7	14,39 ± 0,38 <sup>A</sup>	11,64 ± 0,29 <sup>B</sup>
18:2n-6	376,03 ± 9,15 <sup>A</sup>	265,41 ± 8,03 <sup>B</sup>
18:3n-3	39,28 ± 0,66 <sup>A</sup>	23,73 ± 0,48 <sup>B</sup>
20:0	2,05 ± 0,40 <sup>A</sup>	2,68 ± 0,21 <sup>A</sup>
20:1n-9	2,76 ± 0,17 <sup>A</sup>	2,73 ± 0,14 <sup>A</sup>
PA	nd	105,31 ± 3,04 <sup>A</sup>
Isômero A	nd	6,08 ± 0,27 <sup>A</sup>
Isômero B	nd	8,40 ± 0,36 <sup>A</sup>
Isômero C	nd	5,57 ± 0,34 <sup>A</sup>
AGS	168,40 ± 4,09 <sup>A</sup>	130,41 ± 7,04 <sup>B</sup>
AGMI	206,64 ± 4,90 <sup>A</sup>	163,00 ± 5,49 <sup>B</sup>
AGPI	415,31 ± 9,69 <sup>A</sup>	417,27 ± 17,52 <sup>A</sup>
n-6	376,03 ± 9,15 <sup>A</sup>	265,41 ± 11,36 <sup>B</sup>
n-3	39,28 ± 0,66 <sup>A</sup>	23,73 ± 0,68 <sup>B</sup>
CLnA	nd	125,36 ± 5,39 <sup>A</sup>
n-6/n-3	9,57 ± 0,14 <sup>B</sup>	11,18 ± 0,16 <sup>A</sup>
AGPI/AGS	2,47 ± 0,01 <sup>B</sup>	3,20 ± 0,08 <sup>B</sup>
Total	807,13 ± 19,00 <sup>A</sup>	707,91 ± 20,64 <sup>B</sup>

Média dos valores ± desvio padrão; n = 3. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) pelo teste T. AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poliinsaturados; 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. CLnA = somatório de ácido linolênico conjugado. PA = ácido púnico (18:3 – 9cis, 11trans, 13cis) nd = não detectado. Tratamento I: Tratamento controle; Tratamento II : Tratamento com ração enriquecida com farinha de romã; T III: Tratamento com ração enriquecida com óleo de romã .

Com relação à composição em ácidos graxos, 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 houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as quantidades encontradas desses ácidos graxos nos diferentes tratamentos. Para a classe de ácidos graxos poli-insaturados, foi encontrado valor mais elevado de ácido linoleico (18:2n-6) na ração do Tratamento I (controle) ( $376,03 \pm 9,15 \text{ mg g}^{-1}$ ) do que na ração do Tratamento II ( $265,41 \pm 8,03 \text{ mg g}^{-1}$ ), sendo esta superior ao encontrado por Bonafé et al (2013) ( $206,29 \pm 0,58 \text{ mg g}^{-1}$ ) para ração suplementada com 4,2% de CLA (ácido linoleico conjugado) + óleo de tungue.

Pode-se notar que nos Tratamentos I e II os resultados para o somatório dos AGPI foram superiores quando comparados aos AGMI e AGS para os mesmos tratamentos, não havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre eles. A presença de CLnA (ácido linolênico conjugado), o Ácido Púnico e seus isômeros A, B e C, provenientes da farinha de semente de romã, foram identificados somente para o Tratamento II.

Os resultados encontrados para a razão AGPI/AGS para os dois tratamentos estão apresentados na Tabela 6, na qual não se observa diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre os dois tratamentos, sendo estes valores superiores aos encontrados por Carboneta et al (2014a) para ração controle (suplementada com óleo de soja) ( $2,43 \pm 0,06 \text{ mg g}^{-1}$ ) e para ração suplementada com extrato etanólico de resíduo de acerola ( $2,44 \pm 0,05 \text{ mg g}^{-1}$ ). Os valores encontrados neste trabalho estão de acordo com a recomendação de Simopoulos (2002a), na qual estabelece valores maiores do que 0,4, sendo que quantidades inferiores são inadequadas para a saúde no que diz respeito a prevenção de doenças cardíacas.

A razão existente entre os ácidos graxos da família n-6 e n-3, também são mostrados na Tabela 6, onde se observa uma diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o Tratamento I ( $9,57 \pm 0,14 \text{ mg g}^{-1}$ ) e o Tratamento II ( $11,18 \pm 0,16 \text{ mg g}^{-1}$ ), sendo este superior ao valor encontrado por Bonafé et al (2013) ( $8,33 \pm 0,00 \text{ mg g}^{-1}$ ), para ração suplementada com 4,2% de CLA (ácido linoleico conjugado) + óleo de tungue e ao valor encontrado por Santos et al (2014) ( $1,44 \pm 0,97$ ) para ração suplementada com farelo de semente de perila. Simopoulos

(2002,b) recomenda que esta relação entre ambas as famílias sejam no máximo de 4,0, ou seja, quatro ácidos graxos da família n-6 para apenas um ácido graxo da família n-3.

### 5.5. Composição em ácidos graxos dos filés de tilápia

A tabela 8 apresenta os resultados obtidos para a análise de composição em ácidos graxos para os filés de tilápia alimentados com as rações formuladas dos Tratamentos I e II.

**Tabela 8.** Composição em ácidos graxos dos filés de tilápia para os Tratamentos I e II, em diferentes tempos de tratamento (mg de ácido graxo g<sup>-1</sup> de lipídios totais).

Ácido Graxo	0 dias	15 dias	30 dias
14:0	12,48 ± 1,03 <sup>A</sup>	9,67 ± 0,35 <sup>B</sup>	13,49 ± 0,56 <sup>A</sup>
14:1	2,62 ± 0,24 <sup>A</sup>	1,93 ± 0,02 <sup>B</sup>	2,01 ± 0,14 <sup>B</sup>
15:0	1,99 ± 0,08 <sup>B</sup>	2,32 ± 0,03 <sup>A</sup>	1,74 ± 0,14 <sup>C</sup>
15:1	2,37 ± 0,21 <sup>B</sup>	4,28 ± 0,34 <sup>A</sup>	2,70 ± 0,29 <sup>B</sup>
16:0	132,66 ± 3,34 <sup>A</sup>	131,30 ± 1,85 <sup>A</sup>	130,57 ± 5,64 <sup>A</sup>
16:1n-9	5,09 ± 0,28 <sup>A</sup>	3,21 ± 0,05 <sup>B</sup>	3,12 ± 0,15 <sup>B</sup>
16:1n-7	20,91 ± 1,90 <sup>B</sup>	19,86 ± 0,57 <sup>B</sup>	24,04 ± 0,92 <sup>A</sup>
16:1n-5	3,73 ± 0,24 <sup>A</sup>	3,59 ± 0,09 <sup>A</sup>	3,75 ± 0,27 <sup>A</sup>
17:0	2,70 ± 0,02 <sup>B</sup>	3,00 ± 0,04 <sup>A</sup>	2,10 ± 0,17 <sup>C</sup>
17:1	4,26 ± 0,52 <sup>A</sup>	4,86 ± 0,12 <sup>A</sup>	3,45 ± 0,24 <sup>B</sup>
18:0	48,18 ± 1,03 <sup>A</sup>	50,22 ± 0,99 <sup>A</sup>	43,37 ± 1,89 <sup>B</sup>
18:1n-9	186,00 ± 1,97 <sup>A</sup>	160,24 ± 3,52 <sup>B</sup>	162,99 ± 7,08 <sup>B</sup>
18:1n-7	19,08 ± 0,25 <sup>A</sup>	18,99 ± 0,25 <sup>A</sup>	19,34 ± 0,89 <sup>A</sup>
18:2n-6	130,36 ± 8,51 <sup>B</sup>	159,94 ± 3,11 <sup>A</sup>	161,00 ± 6,96 <sup>A</sup>
18:3n-6	8,25 ± 0,65 <sup>A</sup>	8,48 ± 0,10 <sup>A</sup>	8,42 ± 0,35 <sup>A</sup>
18:3n-3	8,73 ± 0,74 <sup>B</sup>	11,02 ± 0,17 <sup>A</sup>	11,22 ± 0,58 <sup>A</sup>
20:0	1,83 ± 0,16 <sup>A</sup>	1,24 ± 0,06 <sup>B</sup>	1,98 ± 0,13 <sup>A</sup>
18:4n-3	0,39 ± 0,07 <sup>B</sup>	1,72 ± 0,12 <sup>A</sup>	1,80 ± 0,10 <sup>A</sup>
20:1n-9	11,27 ± 0,53 <sup>A</sup>	7,00 ± 0,27 <sup>C</sup>	8,13 ± 0,28 <sup>B</sup>
20:2n-6	6,95 ± 0,25 <sup>A</sup>	7,41 ± 0,28 <sup>A</sup>	7,18 ± 0,34 <sup>A</sup>
21:0	1,85 ± 0,17 <sup>C</sup>	9,49 ± 0,50 <sup>A</sup>	8,56 ± 0,28 <sup>B</sup>
20:3n-6	8,64 ± 0,17 <sup>C</sup>	25,78 ± 2,18 <sup>A</sup>	17,72 ± 0,76 <sup>B</sup>
20:4n-6 (AA)	22,60 ± 1,83 <sup>A</sup>	2,72 ± 0,10 <sup>B</sup>	2,57 ± 0,18 <sup>B</sup>
PA	nd	26,82 ± 1,69 <sup>B</sup>	42,06 ± 0,87 <sup>A</sup>
Isômero A	nd	2,01 ± 0,19 <sup>B</sup>	2,90 ± 0,37 <sup>A</sup>
Isômero B	nd	1,30 ± 0,21 <sup>A</sup>	2,23 ± 0,93 <sup>A</sup>
Isômero C	nd	0,70 ± 0,22 <sup>A</sup>	1,14 ± 0,35 <sup>A</sup>
22:4n-6	7,57 ± 0,27 <sup>A</sup>	7,63 ± 0,58 <sup>A</sup>	6,05 ± 0,16 <sup>B</sup>



22:5n-6	18,86 ± 1,71 <sup>A</sup>	13,56 ± 1,22 <sup>B</sup>	10,34 ± 0,29 <sup>C</sup>
22:5n-3 (EPA)	3,53 ± 0,10 <sup>B</sup>	5,23 ± 0,53 <sup>A</sup>	3,50 ± 0,16 <sup>B</sup>
22:6n-3 (DHA)	10,37 ± 0,63 <sup>B</sup>	13,85 ± 1,34 <sup>A</sup>	8,29 ± 0,38 <sup>B</sup>
AGS	201,69 ± 5,00 <sup>A</sup>	207,23 ± 2,96 <sup>A</sup>	201,82 ± 8,65 <sup>A</sup>
AGMI	255,33 ± 3,38 <sup>A</sup>	223,94 ± 3,95 <sup>B</sup>	229,54 ± 9,69 <sup>B</sup>
AGPI	226,24 ± 13,33 <sup>B</sup>	288,17 ± 9,42 <sup>A</sup>	286,41 ± 10,62 <sup>A</sup>
n-6	203,24 ± 12,13 <sup>A</sup>	225,52 ± 6,25 <sup>A</sup>	213,27 ± 8,69 <sup>A</sup>
n-3	23,00 ± 1,27 <sup>B</sup>	31,81 ± 2,00 <sup>A</sup>	24,81 ± 1,12 <sup>B</sup>
CLnA	nd	30,83 ± 1,62 <sup>B</sup>	48,32 ± 1,25 <sup>A</sup>
n-6/n-3	8,84 ± 0,19 <sup>A</sup>	7,10 ± 0,31 <sup>B</sup>	8,60 ± 0,16 <sup>A</sup>
AGPI/AGS	1,12 ± 0,09 <sup>B</sup>	1,39 ± 0,03 <sup>A</sup>	1,42 ± 0,01 <sup>A</sup>
Total	683,26 ± 6,94 <sup>A</sup>	719,34 ± 13,02 <sup>A</sup>	717,76 ± 28,73 <sup>A</sup>

Média dos valores ± desvio padrão; n = 3. Diferentes letras maiúsculas na mesma linha indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey. AA = ácido araquidônico; EPA = ácido eicosapentaenoico; DHA = ácido docosahexaenóico. AGS = somatório de ácidos graxos saturados; AGMI = somatório de ácidos graxos monoinsaturados; AGPI = somatório de ácidos graxos poliinsaturados; n-6 = somatório de ácidos graxos  $\omega$ -6; n-3 = somatório de ácidos graxos  $\omega$ -3; 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. CLnA = somatório de ácido linolênico conjugado. PA = ácido púnico (18:3 – 9cis, 11trans, 13cis) nd = não detectado. TI: Tratamento controle; TII: Tratamento com ração enriquecida com farinha de romã; T III: Tratamento com ração enriquecida com óleo de romã.

Foi avaliada a composição em ácidos graxos dos filés de tilápias submetidas ao tratamento II (suplementado com farinha de semente de romã). Nesta dieta foi possível identificar e quantificar um total de 31 ácidos graxos nos lipídios totais.

No somatório de AGS não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) entre os tempo zero e 30 dias ( $201,82 \pm 8,65 \text{ mg g}^{-1}$ ) como pode ser observado na Tabela 8. Entre os AGS, o ácido graxo palmítico se diferenciou do restante dos saturados, com quantidade superior ( $130,57 \pm 5,64 \text{ mg g}^{-1}$ ), não apresentando diferença estatística entre os tempos de tratamento.

Os somatórios de AGMI, apresentou variação no decorrer de todos os períodos, 255,33 a 229,54  $\text{mg g}^{-1}$  de lipídios totais, para este tratamento. Neste somatório, o 18:1n-9 apresentou valores expressivos quando comparados aos outros ácidos que continham uma dupla ligação, sendo a maior concentração observada para o tempo zero ( $255,33 \pm 3,38 \text{ mg g}^{-1}$ ). Os somatórios de AGPI, um dos seus componentes também se sobressaiu aos demais ácidos graxos. Neste caso, o precursor da família n-6, 18:2n-6, foi o majoritário, tendo um aumento significativo no tempo de 30 dias ( $161,00 \pm 6,96 \text{ mg g}^{-1}$ ) em relação ao tempo zero.

Como a farinha de semente não apresenta em sua composição ácidos graxos da família ômega-3, o aumento destes no tecido muscular da tilápia não foi considerado satisfatório, não sendo observada diferença significativa ( $p > 0,05$ ) durante os tempos de tratamento para o somatório de n-3.

Altas concentrações dos ácidos palmítico (16:0), oleico (18:1n-9) e linoleico (18:2 n-6) eram esperadas, uma vez que estes ácidos faziam parte da constituição dos lipídios totais deste tratamento, como mostrado na Tabela 6, e já que a composição em ácidos graxos no tecido muscular do pescado é diretamente influenciada com a dieta em que é submetido (Visentainer et al, 2005). As razões entre os grupos de AGPI/AGS, em todos os tempos de tratamento, foram satisfatórias com valores superiores a 0,4.

Pode-se observar a incorporação dos ácidos graxos linolênico conjugados (CLnA) no tecido muscular de tilápias do Nilo. Como o tratamento controle era composto pelo óleo de soja, isento dos CLnAs, não houve a presença destes ácidos no tempo zero de tratamento. No entanto, nos tempos subsequentes, a incorporação foi observada, assumindo valores máximos no tempo de 30 dias ( $48,32 \pm 1,25 \text{ mg g}^{-1}$ ). Esse valor é superior ao encontrado por Bonafé et al (2013) ( $24,53 \pm 0,32 \text{ mg g}^{-1}$ ) para filés de tilápias alimentadas com ração suplementada com 4,2% de CLA + óleo de tungue e superior ao obtido por Carbonera et al (2014b) ( $8,63 \pm 0,14 \text{ mg g}^{-1}$ ) para filés de tilápias alimentadas com ração suplementada com óleo de tungue + óleo de chia + CLA + vitamina E, para um tempo de 30 dias de suplementação.

Um fato importante relatado por Bonafé (2010), em tilápias da linhagem GIFT, é a biosíntese do ácido linoléico conjugado (CLA). Os trabalhos de Kim et al (2002) e Yang et al (2005), mostraram que a suplementação do ácido alfa-ESA e do Ácido Púnico em ratos e camundongos, promovia a conversão destes ácidos no isômero cis9, trans11-18:2 do ácido linoléico. Tsuzuki et al (2004) e Tsuzuki et al (2006) , também relatou que o alfa -ESA, é parcialmente saturado na posição C13 e convertido para 9c11t-CLA. Estudos mostram muitos efeitos fisiológicos benéficos do CLA, incluindo ações anticancerígenas e antiaterogênicas, regulação da gordura corporal e regulação do metabolismo lipídico (Yuan et al, 2009b).

A identificação do ácido púnico e de seus isômeros foi feita utilizando o óleo de romã como padrão secundário. Muitos pesquisadores investigaram o óleo de romã, a fim de identificar seus componentes. Tsuzuki et al (2006) analisou óleo de romã utilizando um cromatógrafo a gás equipado com um espectrômetro de massas com impacto de elétrons, e verificou que o óleo analisado continha 74,5% de ácido púnico em sua composição. Elfalleh et al (2011b) analisou óleo de romã utilizando um cromatógrafo a gás equipado com um espectrômetro de massas, ele obteve um resultado de 86,16% de ácidos linolênicos conjugados (CLnA), dos quais o ácido punicico (18: 3: 9-cis, 11-trans, 13-cis) é o isômero principal (cerca de 36%), seguido de  $\alpha$ -eleosteárico (cerca de 12%), ácido catalpico (cerca

de 11%) e  $\beta$ -eleosteárico (cerca de 8%). Pande e Akoh (2007) também analisaram óleo de seis cultivares diferentes romã utilizando um cromatógrafo a gás equipado com um espectrômetro de massas, e obtiveram de 78,3 a 83,4% de ácido púnico no óleo da semente de romã. Neste trabalho foi verificada a presença do ácido púnico como componente majoritário (pico de maior intensidade) nos lipídios extraídos da farinha da semente da romã, como mostra a Figura 13. Dessa forma pode-se identificar o ácido púnico nos lipídios extraídos dos filés de tilápia do Nilo, pela sobreposição do cromatograma dos lipídios dos filés (Figura 14) no cromatograma dos lipídios da farinha da semente da romã.

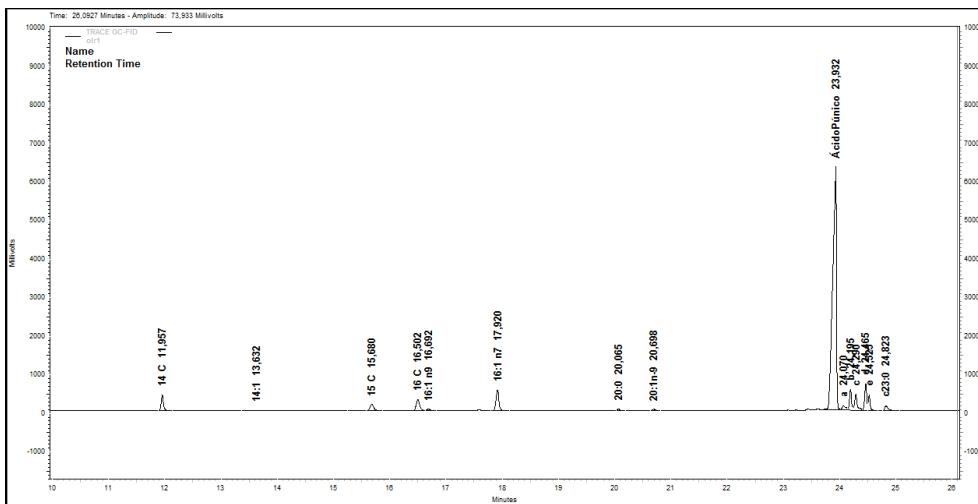


Figura 13. Cromatograma da farinha de semente de romã.

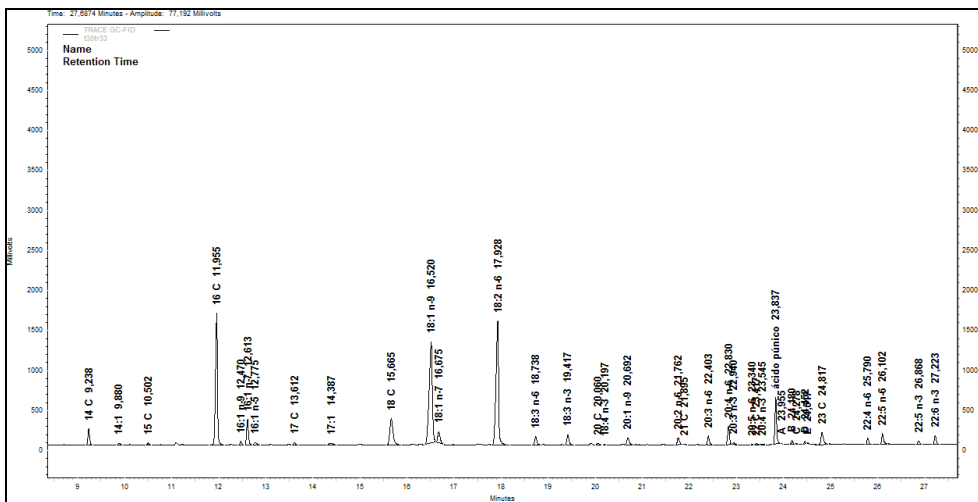


Figura 144. Cromatograma filés de tilápias do Tratamento II, no período de 30 dias.

## 6. CONCLUSÕES

As rações formuladas para os diferentes tratamentos, se apresentaram isocalóricas e isoproteicas, sendo essencial para avaliação dos resultados. As tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) da linhagem GIFT, apresentaram boa adaptação quando alimentadas com as diferentes rações, considerando que a mortalidade foi dentro dos parâmetros normais.

A suplementação da dieta das tilápias do Nilo, com farinha de semente de romã (Tratamento II) e com óleo de romã (Tratamento III) apresentou uma melhoria na capacidade antioxidante dos filés. Apesar de existir certa dificuldade em se determinar a capacidade antioxidante em produtos cárneos, o procedimento QUENCHER foi adequado para esse fim. O ensaio ORAC<sub>FL</sub>, confirmou que a contribuição de antioxidantes hidrofílicos é maior do que a contribuição de antioxidantes lipofílicos, tanto na ração quanto nos filés de tilápia. Assim a suplementação com farinha de semente de romã mostrou que é uma boa opção para melhorar o valor nutricional e a capacidade antioxidante do pescado.

Foi verificada a transferência e incorporação dos ácidos graxos de interesse, especificamente o CLnA, à ração do Tratamento II, devido a adição de farinha de semente de romã, rica em Ácido Púnico e seus isômeros. A suplementação com CLnA na dieta de tilápias do Nilo e a consequente incorporação desses de ácidos graxos de importante valor nutricional, certamente contribuirá para elevar a ingestão deste ácidos na dieta humana, uma vez que são encontrados em quantidades reduzidas nos alimentos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

Ayroza, L. M. S. (2009). Criação de tilápia-do-nilo, *oreochromis niloticus*, em tanques-rede, na Usina Hidrelétrica de Chavantes, Rio Paranapanema, SP/PR. *Tese de doutorado*, Unesp, Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

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.

Bianchi, M. L. P., & Antunes, L. M. G. (1999). Radicais livres e os principais antioxidantes na dieta, *Revista de Nutrição*, 12, 123-130.

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

Bonafé, E. G. (2010). Influência De Diferentes Fontes De Ácidos Graxos Sobre A Composição Lipídica De Tilápias Do Nilo (*Oreochromis Niloticus*) Da Linhagem Gift. *Dissertação De Mestrado*, Universidade Estadual De Maringá, Paraná, Brasil.

Bonafé, E. G., Boeing, J. S., Matsushita, M., Claus, T., Santos, O. O., Oliveira, C. C., Eberlin, M. N., Visentainer, J. V. (2013). Evaluation of conjugated fatty acids incorporation in tilápia through GC-FID and EASI-MS. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 115, 1-7.

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.

Brondz, I. (2002). Development of fatty acid analysis by high-performance liquid chromatography, gas chromatography, and related techniques. *Analytica Chimica Acta*, 465, 1- 37.

Cao, Y., Gao, H. L., Chen, J. N., Chen, Z. Y., Yang, L. (2006). Identification and characterization of conjugated linolenic acid isomers by Ag+-HPLC and NMR. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 54, 9004–9009.

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

Carbonera, F. (2014b). Avaliação da composição lipídica e da capacidade antioxidante em filés de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com diferentes fontes de ácidos graxos e antioxidante. *Dissertação de mestrado*, Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Brasil.

Carbonera, F., Santos, H. M. C., Montanher, P. F., Schneider, V. V. A., Lopes, A. P., Visentainer, J. V. (2014c). Distinguishing wild and farm-raised freshwater fish through fatty acid composition: Application of statistical tools. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 1363–1371.

Castagnolli, N. (1992). *Piscicultura de água doce*. Jaboticabal: Funep, 189.

Chardigny, J. M., Masson, E., Sergiel, J. P., Dairbois, M., Loreau, O. J., Noel, P. J., Sebedio, L. (2003). The position of rumenic acid on triacylglycerols alters its bioavailability in rats. *Journal Nutrition*, 133, 4212–4214.

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.

Curi, R., Pompéia, C., Miyasaka, C. K., Procopio, J. (2002). *Entendendo a gordura: Os ácidos graxos*. Barueri-SP: Editora Manole, 5-40.

Cunniff, P. A. (1998). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 16th Ed., Arlington: AOAC, CD - Rom.

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.

Elfalleh, W., Tlili, N., Nasri, N., Yahia, Y., Hannachi, H., Chaira, N., Ying, M., & Ferchichi, A. (2011a). Antioxidant Capacities of Phenolic Compounds and Tocopherols from Tunisian Pomegranate (*Punica granatum*) Fruits. *Journal of Food Science*, 76, 707 – 713.

Elfalleh, W. Ying, M., Nasri, N., Sheng-Hua, H., Guasmi, F., Ferchichi, A. (2011b). Fatty acids from Tunisian and Chinese pomegranate (*Punicagranatum*L.) seeds, *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 62, 200–206.

Falowo, A. B., Fayemi, P. O. & Muschenje, V. (2014). Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. *Food Research International*, 64, 171-181.

Fennema, O. R., (Ed3.). *Food Chemistry*. New York, Marcel Dekker. 1996, 226.

Fulber, V. M., Mendez, L. D. V., Braccini, G. L., Barrero, N. M. L., Digmeyer, M., Ribeiro, R. P. (2009). Desempenho comparativo de três linhagens de tilápia do Nilo Desempenho Nilo *Oreochromis niloticus* em diferentes densidades de estocagem. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 31, 177- 182.

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.

Goula, M. A. (2013). Ultrassond- assisted extraction of pomegranate seed oil – Linect modeling. *Journal of Food Engineering*, 117, 492-498.

Golay, M. J. E. (1957). Theory And Practice Of Gas-Liquid Partition With Coated Capillaries, *Gas Cromatogrography*.

Hartman, L., & Lago, R. C. (1973). Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, 22, 475-476.

Hayashi, C., Boscolo, W. R., Soares, C. M., Boscolo, V. R. & Galdioli, E. M. (1999). Uso de diferentes graus de moagem dos ingredientes em dietas para a tilápia-do-Nilo (*Oreochromis niloticus* L.) na fase de crescimento. *Acta Scientiarum* 21, 733-737.

He L., Xu, H., Liu, X., He, W., Yuan, F., Hou, Z. & Gao, Y (2011). Identification of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidants capacities by HPLC–ABTS<sup>+</sup> assay. *Food Research International*, 44, 1161-1167.

Huang, D., Ou, B., Prior, R. L. (2005). The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841 – 1856.



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. J., Ou, B. X., 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.

Hygreeva D., Pandey, M. C., Radhakrishna K. (2014). Potencial applications of plant based derivatives as fat replacers, antioxidants and antimicrobials in fresh and processed meat products. *Meat Science*, 98, 47-57.

Iwabuchi, M., Kohno, J., Imamura, M. J. (2003). Delta 12-oleic desaturase related enzymes associated with formation of conjugated trans-delta11, cis-delta13 double bonds. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 4603–4610.

Jardini, F. A. & Filho, J. M. (2007). Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 43, 137-147.

Jing, P., Ye, T., Shi, H., Sheng, Y., Slavin, M., Gao, B., Liu, L. & Yu, L. (L.) (2012). Antioxidant properties and phytochemical composition of Chia-grown pomegranate seeds. *Food chemistry*, 132, 1457-1464.

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.

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

Kim, N. D., Mehta R., Yu W., Neeman I., Livney T., Amichay A., Poirier D., Nicholls P., Kirby A., Jiang W., Mansel R., Ramachandran C., Rabi T., Kaplan B. & Lansky E. (2002). Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum L.*) for human breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 71, 203-217.

Lam, C., Chen, K. J., Cao, Y., Yang, L., Wong, Y. M., Yeung, S. Y., Yao, X., Huang, Y., Chen, Z. Y. (2008). Conjugated and nonconjugated octadecaenoic acids affect differently intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity. *Atherosclerosis*, 198, 85–93.

Lansky, E. P., Newman, R. A. (2007). *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 177–206.

Lucci, P., Pacetti, D., Loizzo, M. R., Frega, N. G. (2015). *Punica granatum* cv. Dente di Cavallo seed ethanolic extract: Antioxidant and antiproliferative activities. *Food Chemistry* 167, 475 – 483,

Massi, J. B. & Rezende, M. I. (2013). Crescimento de *Bacillus amyloliquefaciens* MO-04b por Fermentação em Estado Sólido (FES) para a Produção de Biossurfactantes. *Anais do III Simpósio de Bioquímica e Biotecnologia (III SIMBBTEC)*, 2, 38-41.

Meher, L. C., Dharmagadda, V. S. S., Naik, S. N.. (2006). Optimization of alkalicatalyzed transesterification of *Pongamia pinnata* oil for production of biodiesel. *Bioresource Technology*, 97, 1392-1397.

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, Maringá.

Mori-Okamoto, J., Otawara-Hamamoto, Y., Yamato, H. & Yoshimura, H. (2004). Pomegranate extract improves a depressive state and bone properties in menopausal syndrome model ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 92, 93-101.

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.

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.

NRC – National Research Council (1993). *Nutrient requirements of warmwater fishes and shellfishes*. Washington: National Academy Press, 114.

Oliveira, A. C., Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32, 689-702.

Ostrensky, A., Borghetti, J. R., Soto, D. (2008). *Aquicultura no Brasil: o desafio é crescer*. Brasília.

Pande, G. e Akoh C. C. (2009). Antioxidant Capacity and Lipid Characterization of Six Georgia-Grown Pomegranate Cultivars, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 57, 9427–9436.

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

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.

Rodrigues, E., Mariutti, L. R. B., Faria, A. F., Mercadante, A. Z. (2012). Microcapsules containing antioxidant molecules as scavengers of reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, 134, 704 – 711.

RURALBR AGRICULTURA (2014), disponível em: <http://agricultura.ruralbr.com.br/noticia/2011/12/com-festas-de-final-de-ano-roma-registra-aumento-nas-vendas-em-sao-paulo-3616897.html>. Acessado em 13 de jul. de 2014.

Sacchetti, G., Di Mattia, C., Pittia, P., & Martino, G. (2008). Application of a radical scavenging activity test to measure the total antioxidant activity of poultry meat. *Meat Science*, 80, 1081-1085.

Scalbert, A., Johnson, I. T., & Saltmarsh, M. (2005). Polyphenols: antioxidants and beyond. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 215-217.

Santos, H. M. C., Nishiyama, M. F., Bonafé, E. G., Oliveira, C. A. L., Matsushita, M., Visentainer, J. V., Ribeiro, R. P. (2014). Influence of a Diet Enriched with Perilla Seed Bran on the Composition of Omega-3 Fatty Acid in Nile Tilapia, *Journal American Oil Chemists Society*, 91, 1939–1948.

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. (2012a). Total antioxidant capacities of raw and cooked meats. *Meat Science*, 90, 60-64.

- Serpen, A., Gökmen, V., & Fogliano, V. (2012b). Solvent effects on total antioxidant capacity of foods measured by direct QUENCHER procedure. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 52-57.
- Simopoulos, A. P. (2002a). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother*, 56, 365-379.
- Simopoulos, A. P. (2002b). Omega-3 fatty acids in wild plants, nuts and seeds. *Asia Pacific Journal Clinical. Nutrition*, 11, 163-173.
- Sommerfeld, M. (1983). Trans unsaturated fatty acids in natural products and processed foods. *Progress of Lipid Research*, 22, 221-233.
- Souza, N. E., Visentainer, J. V. (2006). *Colesterol da mesa ao corpo*. São Paulo-SP: Editora 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 leukaemia 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.
- Tehranifar, A., Zarei, M., Nemati, Z., Esfandiyari, B. & Vazifeshenas, R. M., (2010). Investigation of physico-chemical properties and antioxidant activity of twenty Iranian pomegrate (*Punica granatum L.*) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 126, 180-185.
- 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., Igarashi, M., Komai, M., Miyazawa, T. (2003). A metabolic conversion of 9, 11, 13-eleostearic acid (18:3) to 9, 11-conjugated linoleic acid (18:2) in the rat. *Journal Nutrition Science*. 49, 195–200.

Tsuzuki, T., Kawakami, Y., Abe, R., Nakagawa, K., Koba, K., Imamura, J., Iwata, T., Ikeda, I., Miyazawa, T. (2006). Conjugated linolenic acid is slowly absorbed in rat intestine, but quickly converted to conjugated linoleic acid. *Journal. Nutrition*, 136, 2153–2159.

Tsuzuki, T., Tokuyama, Y., Igarashi, M., Nakagawa, K., Ohsaki, Y., Komai, M., Miyazawa, T. (2004).  $\alpha$ -Eleostearic acid (9Z11E13E–18:3) is quickly converted to conjugated linoleic acid (9Z11E–18:2) in rats. *Journal Nutrition*, 134, 2634–2639

Tufan, A. N., Celik, S. E., Özyürek, M., Güçlü, K., & Apak, R. (2013). Direct measurement of total antioxidant capacity of cereals: QUENCHER-CUPRAC method. *Talanta*, 108, 136-142.

Tvrzická, E., Vecka, M., Stanková, B., & Zák, A. (2002). Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography-flame ionization detection: Quantitative aspects. *Analisis Chimica Acta*, 465, 337-350.

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

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.

Yasui, Y. M., Hosokawa, T., Sahara, R., Suzuki, S., Ohgiya, H., Kohno, T., Tanaka, K. M. (2005). Bitter melon seed fatty acid rich in 9c,11t,13t-conjugated linolenic acid induces

apoptosis and up-regulates the GADD45, p53 and PPARgamma in human colon cancer Caco-2 cells. *Prostaglandins, Leukotrienes & Essential Fatty Acids (PLEFA)*, 73, 113–119.

Yuan, G. F., Yuan, J. Q., Li, D. (2009a). Punicic acid from *Trichosanthes kirilowii* seed oil is rapidly metabolized to CLA in rats. *Journal Medicinal Food.*, 16, 148-163.

Yuan, G., Yuan, J., Li, D. (2009b). Punicic Acid from *Trichosanthes kirilowii* Seed Oil Is Rapidly Metabolized to Conjugated Linoleic Acid in Rats, *Journal of Medicinal Food*, 12, 416–422.

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.

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, Paraná, Brazil.

Zeoula, L. M., Neto, S. F. C., Geron, L. J. V., Maeda, E. M., Prado, I. N., Dian, P. H. M., Jorge J. R. V. & Marques, J. A. (2003). Substituição do Milho pela Farinha de Varredura de Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em Rações de Ovinos: Consumo, Digestibilidade, Balanços de Nitrogênio e Energia e Parâmetros Ruminais. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32, 491-502.

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