



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

**COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS
TOTAIS EM CABEÇA DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) E
SEPARAÇÃO DAS CLASSES LIPÍDICAS.**

JOSÉ AMILTON ALVES SIQUEIRA

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para a obtenção do título de Engenheira de Pesca.

FORTALEZA – CEARÁ – BRASIL
FEVEREIRO - 2006



COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. EVERARDO LIMA MAIA
ENGENHEIRO QUÍMICO (Orientador)

Prof^a. Dra. MARIA LÚCIA NUNES
ENGENHEIRA AGRÔNOMA

MSc. NORMA BARRETO PERDIGÃO OGAWA
QUÍMICA INDUSTRIAL

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira
Chefe do Departamento DEP/CCA/UFC

Prof. Artamízia Maria Nogueira Montezuma
Coordenadora do Curso de Engenharia de Pesca

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S63c Siqueira, José Amilton Alves.
Comparação de dois métodos para extração de lipídios totais em cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei*) e separação das classes lipídicas / José Amilton Alves Siqueira. – 2006.
32 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2006.
Orientação: Prof. Dr. Everardo Lima Maia.
1. Engenharia de Pesca. I. Título.

CDD 639.2

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que sempre esteve comigo nos momento mais difíceis da minha vida.

Aos meus pais, por terem me colocado no mundo e dado me todo suporte para a educação que eu tenho e aos meus irmãos.

Ao meu orientador Dr. Everardo Lima Maia, que me orientou durante três anos, esclarecendo minhas dúvidas e me auxiliando durante toda a execução do trabalho, e também pela paciência e compreensão que o mesmo teve por mim.

Ao professor Dr. Masayoshi Ogawa pela permissão do uso do Laboratório de Recursos Aquáticos (Laraq) do Departamento de Engenharia de Pesca, bem como a todos os funcionários do mesmo.

Aos funcionários da coordenação e do Departamento de Engenharia de Pesca.

Aos meus amigos de curso, que prefiro não citar nomes para não esquecer o nome de nenhum, pois todos tiveram sua parcela de amizade e companheirismo nas horas difíceis e pela boa convivência durante estes cinco anos.

Aos funcionários do Restaurante Universitário.

Ao ex-prefeito de Crateús Dr. Paulo Nazareno Soares Rosa, pela ajuda fornecida para a realização desse sonho.

Ao amigo Rafael Cavalcante pela ajuda cedida na Monografia.

Ao amigo Neilo pelo companheirismo durante esse período.

Ao CNPq pela ajuda financeira fornecida durante três anos.

Por fim, todos aqueles que eu considero, tenho uma boa relação de amizade, sintam-se agradecidos.

SUMÁRIO

	Páginas
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE FIGURAS	vi
RESUMO	vii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 – Definição de lipídios	3
2.2 – Funções dos lipídios	3
2.3 – Extração de lipídios por métodos a quente e frio	4
2.3.1 – Método de Soxhlet	4
2.3.2 – Método de Folch <i>et al.</i>	6
2.3.3 – Método de Bligh & Dyer	7
2.4 – Divisão dos componentes lipídicos em classes	7
2.5 – Composição química e classes lipídicas em pescado	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1 – Obtenção das amostras	13
3.2 – Preparação das amostras para análise	13
3.3 – Determinações químicas	13
3.4 – Separação das classes de lipídios	16
3.5 – Análise estatística	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5. CONCLUSÕES	22
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23

LISTA DE TABELAS

	PAGINAS
TABELA 1 – Conteúdos das classes de lipídios em alimentos	9
TABELA 2 – Classificação do pescado em categorias de acordo com as quantidades de gordura e proteínas.	11
TABELA 3 – Resultados sobre a composição química centesimal (%) da cabeça de camarão.	18
TABELA 4 – Separação das classes de lipídios na cabeça de camarão.	20

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Aparelhagem para extração de lipídios totais pelo método de Soxhlet.	14
FIGURA 2 – Aparelhagem para extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer.	16
FIGURA 3 – Cromatografia em coluna aberta para separação das classes de lipídios totais.	17

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo a realização de um estudo comparativo entre os métodos de Soxhlet (Nagakura, 1972) e Bligh & Dyer (1959) para extração quantitativa de lipídios em pescado, e ainda a separação de classes lipídicas. No primeiro, chamado de método a quente, usa-se aquecimento e um solvente orgânico de baixa ou média polaridade, tal como, hexano, éter de petróleo, éter etílico ou acetona. Já o método de Bligh & Dyer, chamado de método a frio, utiliza a mistura (2:2: 1,8) respectivamente de clorofórmio, metanol e água (solventes de média e alta polaridade). Os lipídios totais (LT) foram fracionados em classes de lipídios neutros (LN), e fosfolipídios (PL) através de cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (70-230 mesh). Então, levando em conta os poucos resultados divulgados na literatura sobre este assunto, foi realizado a presente pesquisa. Na presente pesquisa, no método de Soxhlet, utilizou-se acetona (média polaridade) como solvente. Amostras de cabeça de camarão (*Litopenaeus vannamei*), coletadas nos meses de Junho à outubro de 2005 foram analisadas. Com respeito á composição química centesimal as mínimas e máximas encontradas, respectivamente, foram as seguintes: umidade-73,3 e 75,6% proteína total – 16,9 e 19% , cinzas- 1,4 e 2,5% , carboidratos – 0,0 e 2,2%. Os resultados comparativos entre os métodos mostraram que a média final para o método de Bligh & Dyer (4,1%), foi inferior a média do método de Soxhlet (6,0%). Em ambos os métodos as classes de LN foram majoritárias apresentando mais que o dobro em relação aos PL, obtendo a seguinte média de 66,5% de LN e de 31,6% de PL para o método de Bligh & Dyer e de 78,3% de LN e de 21,3% de PL para o método de Soxhlet. Todavia, pela análise estatística dos resultados pode-se concluir que não houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre os métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer em todas as determinações realizadas.

COMPARAÇÃO DE DOIS MÉTODOS PARA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS EM CABEÇA DE CAMARÃO (*Litopenaeus vannamei*) E SEPARAÇÃO DAS CLASSES LIPÍDICAS.



JOSÉ AMILTON ALVES SIQUEIRA

1- INTRODUÇÃO

Os lipídios (óleos e gorduras) de pescado são entre todos os macronutrientes, aqueles que apresentam as maiores variações, devido às diferenças entre as diversas espécies de pescado. Mesmo dentro da mesma espécie, o teor de lipídios pode variar intensamente, entre outros fatores, em função do tipo (vermelha ou branca) e localização da carne (dorsal, ventral ou caudal), idade e época de migração (reprodutiva ou alimentação). Teores de lipídios totais (LT) variando de 0,2 a 64% foram relatados para a parte comestível de peixes (STANSBY, 1962).

É importante conhecer as concentrações das classes de lipídios porque cada uma delas exercem funções diferenciadas nos corpos animais. Os lipídios neutros (LN), especialmente, os triacilgliceróis (TAG) são usados principalmente para estocagem de energia nos tecidos adiposos e participa com teor mais elevado na lipoproteína de baixa densidade (LDL - prejudicial à saúde humana por transportar o colesterol ruim) do que na lipoproteína de alta densidade (HDL – bom para redução do colesterol). Os glicolipídios (GL), fosfolipídios (PL) e esteróis são considerados lipídios formadores das membranas celulares, portanto, não sendo usados como fontes de energia. Maior conteúdo de PL é encontrado na HDL do que na LDL. Assim, do ponto de vista da associação das frações lipídicas com as lipoproteínas boa e ruim, é recomendável consumir alimentos com maiores concentrações de fosfolipídios. O pescado desponta como uma fonte bem balanceada de LN e PL, aliado com o baixo teor de lipídios e alto conteúdo de proteínas de excelente valor nutritivo.

Em nível de pesquisa, a extração de LT mais tradicional e antiga, usa o método de Soxhlet, este método é considerado como padrão pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC), sendo por isso quase sempre usado como referência para comparação de resultados obtidos com outros métodos (BROOKS et al., 1998; JAHAN et al., 2004; VOGT et al., 2002). Alternativamente aos métodos da AOAC, existe o procedimento de Soxhlet descrito por NAGAKURA (1972), que é um pouco menos trabalhoso. Outros dois métodos diferentes da extração de Soxhlet foram divulgados por FOLCH *et al.* (1957) e de BLIGH & DYER (1959). O primeiro foi recomendado para extração de lipídios totais em tecidos animais em geral, enquanto que o último tem sido muito usado para extração de lipídios em pescado.

Em nosso laboratório tem-se utilizado com bastante frequência, os métodos de Soxhlet, usando acetona e éter etílico como solvente e o de Bligh & Dyer. Será que existem diferenças estatísticas nos conteúdos de LT entre esses dois métodos? É relevante a diferença entre os solventes utilizados no método de Soxhlet. A questão acha-se praticamente sem resposta, pois até o momento, apenas foi encontrado um estudo comparativo (SOUTO *et al.*, 2000), sendo os resultados publicados em resumo de Congresso. Foi considerado que, o método de Bligh & Dyer foi quantitativamente mais eficiente do que o método de Soxhlet, com diferenças significativas ao nível de 1% e que o primeiro teve coeficiente de variação menor do que o segundo (8,12 x 10,70%).

A procura por óleo de pescado vem aumentando consideravelmente nos últimos anos, tanto a nível nacional, como internacional, pôr sê-lo uma excelente fonte natural de constituintes lipídicos com potencialidades nutricionais e terapêuticas benéficas à saúde humana. Só a extração adequada poderá preservar essas importantes potencialidades dos lipídios, bem como a padronização do uso de solvente adequado para extração de lipídeos, através do método de Soxhlet em pescados.

Devido a essa busca por óleo de pescado objetiva-se nessa monografia, avaliar se existe ou não diferenças entre os métodos de Soxhlet e de Bligh & Dyer para extração dos lipídios totais e quantificação das classes lipídicas em cabeça de camarão, (*Litopenaeus vannamei*).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Definição de lipídios

Lipídios são substâncias de origem animal, vegetal ou microbiana que são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, especialmente, naqueles de baixa e média polaridade. Representam a segunda fonte de energia para o consumo da célula, depois dos glicídios.

Os lipídios resultam da combinação de ácidos graxos com álcoois. São, portanto, ésteres. Os ácidos graxos são ácidos orgânicos monocarboxílicos, podendo ser saturados ou insaturados, a maioria, apresentando número par de átomos de carbono (CONN & STUMPF, 1980; ANDRIGUETTO et al., 1986; LEHNINGER, 1986; VASCONCELLOS, 1993 e NUNES, 1998).

2.2 – Funções dos lipídios

De acordo com os autores acima, destacam-se as seguintes funções dos lipídios:

- Nas células atuam como reserva energética (tecido adiposo) e estrutural (membrana celular lipoprotéica);
- Quando metabolizados pela célula fornecem 9,40 Kcal de energia (2,25 vezes mais energia do que os carboidratos);
- Fontes de ácidos graxos essenciais;
- Precursores de substâncias essenciais à vida (prostaglandinas, esteróides, hormônios);
- Auxiliam a absorção de vitaminas e outras substâncias lipossolúveis;
- Fornecem mais H₂O no catabolismo que o próprio peso devido ao elevado conteúdo de hidrogênio frente ao de oxigênio;
- Reservatório concentrado de H₂O para os animais que hibernam;
- Função isolante de proteção dos animais ao meio ambiente;
- Marmorização da carne interpondo-se entre fibras musculares tornando-a macia e saborosa; e,
- Melhora a aceitação de rações pelos animais.

2.3 – Extração de lipídios por métodos a quente e frio

A extração de LT de amostras tem como princípio básico o poder dissolvente que determinado solvente orgânico exerce sobre as diferentes classes de lipídios neutros ou apolares (TAG, esteróis, vitaminas lipossolúveis, carotenóides, etc.) e polares (GL e PL). A força ou polaridade do solvente está relacionada com o momento dipolar e com a constante dielétrica do solvente. Numa série eluotrópica, os solventes são descritos em ordem crescente de aumento de polaridade, que segundo SWEELEY (1969) é a seguinte: hexano < tetracloreto de carbono < benzeno < clorofórmio < éter etílico < acetato de etila < acetona < metanol < ácido acético < água.

Os métodos de Soxhlet (NAGAKURA, 1972) e de BLIGH & DYER (1959) são bastante usados para extração de lipídios em pescado. O primeiro é considerado um método de extração a quente, e o último, um método de extração a frio.

2.3.1 – Método de Soxhlet

O método consiste no refluxo contínuo com solventes de baixa polaridade, tais como, éter etílico, acetona, etc., da gordura contida em amostra desidratada ou seca com sulfato de sódio anidro, usando o aparelho chamado de BATERIA DE SOXHLET ou SABELLIN, que consiste basicamente dos seguintes componentes:

- (1) Chapa ou manta de aquecimento com reostato para controlar a taxa de aquecimento;
- (2) Balão de vidro de fundo chato para recuperação do LT extraído;
- (3) Extrator de vidro Soxhlet, onde a amostra contendo o LT é colocada; e
- (4) Condensador de bola (Allihn) com água corrente usada como refrigerante.

O método está baseado em três etapas:

A - Extração da gordura da amostra com solvente.

B - Eliminação do solvente por evaporação.

C - A gordura extraída é quantificada por pesagem.

A extração de lipídios dos alimentos se faz na maioria dos casos por lixiviação exaustiva por meio de solvente orgânico, seguida de remoção por evaporação do solvente. O resíduo seco obtido é constituído por todos os compostos que nas

condições de determinação são extraídos pelo solvente: acilgliceróis, glicolipídios, fosfolipídios, esteróides, vitaminas, carotenóides, etc.

As seguintes observações devem ser lembradas durante a extração de LT pelo método de Soxhlet:

* É considerado um método de extração com solvente a quente, cuja temperatura (geralmente na faixa de 40 a 80°C) é dependente da solução formada entre os componentes lipídicos e o solvente utilizado. Por exemplo, cerca de 70° C, para a mistura de álcool etílico com componentes do própolis de abelha.

* Envolve uma extração sólido/líquido (amostra/solvente)

* De preferência deve ser usada amostra totalmente seca (em estufa) ou semi-desidratada (misturada com sulfato de sódio anidro). Amostra úmida pode ser usada, mas o tempo de extração é mais prolongado.

* Solventes recomendados: de baixa e média polaridade ou apolares, tais como, hexano, éter de petróleo, éter etílico, acetona, tetracloreto de carbono, etc. Estes solventes apolares extraem preferencialmente a fração lipídica apolar que incluem ácidos graxos livres, mono-, di- e triacilgliceróis, esteróis, ceras, pigmentos carotenóides e vitaminas lipossolúveis. Contudo, em função do tempo prolongado de extração, considera-se que todos os componentes lipídicos polares (fosfolipídios, glicolipídios, esfingolipídios). sejam extraídos por este método.

* Em muitos alimentos processados, como em produtos derivados do leite, pão, produtos fermentados, açucarados e produtos animais, a maior parte dos lipídeos está ligada a proteína e carboidratos, e a extração direta com solventes não polares é ineficiente. Estes alimentos precisam ser preparados para a extração de gordura por hidrólise ácida ou básica, ou outros métodos.

* Eficiência da extração a quente depende de uma série de fatores:

- 1- Natureza do material a ser extraído.
- 2- Tamanho das partículas: quanto menor mais fácil a penetração do solvente.
- 3- Umidade da amostra: a água presente na amostra dificulta a penetração do solvente orgânico por imiscibilidade.
- 4- Natureza do solvente.
- 5- Semelhança entre as polaridades do solvente e da amostra.
- 6- Ligação dos peptídeos com outros componentes da amostra.
- 7- Circulação do solvente através da amostra.

8- A velocidade do refluxo não deve ser nem muito alta nem muito baixa, porque pode haver pouca penetração do solvente na velocidade muito alta.

9- Quantidade relativa entre solvente e material a ser extraído: quanto mais solvente maior é a extração, porém não se deve usar em excesso por causa do alto custo do solvente.

Os inconvenientes deste método são: (1) secagem da amostra em altas temperaturas (método de extração quente) que pode provocar alteração rancificativa e polimerização dos lipídios; (2) tempo elevado de extração, geralmente de 16 a 18 horas contínuas ou por tempo superior, se descontínuo, podendo atingir de 2 a 3 dias para conclusão total da extração e quantificação; (3) por usar solventes de baixa polaridade, a tendência é semelhante dissolver semelhante. Sendo assim, se o tempo de refluxo for pequeno, poderá teoricamente, não ocorrer a extração total de lipídios polares, e o teor de LT ser inferior ao esperado; e (4) quando o método de Soxhlet usa acetona, ela poderá dissolver também substâncias não lipídicas, tais como, aminoácidos e açúcares livres (KATES, 1972), que elevam os teores de lipídios.

2.3.2 – Método de Folch et al. (1957)

* Trata-se de um método simples para preparação de extrato total de lipídios puros de diferentes tecidos. O método consiste na homogeneização a frio do tecido com uma mistura 2:1 clorofórmio/metanol e lavagem do extrato pela adição de 0,2 volumes de água ou solução salina apropriada. A mistura resultante é separada em duas fases. A fase inferior contém o extrato clorofórmico com os lipídios totais purificados.

* O procedimento de lavagem remove essencialmente todas as impurezas não lipídicas do extrato com concomitante perda de 0,3% dos LT na matéria branca e 0,6% na matéria cinzenta de cérebro. Estas perdas podem ser reduzidas se no líquido de lavagem for adicionado sais minerais.

* A eficiência do processo de lavagem depende da presença de sais no extrato bruto. Estes sais alteram a distribuição dos lipídios e praticamente são eliminados na fase superior. Na ausência de sais, quantidades substanciais de lipídios ácidos estarão presentes na fase superior, que deveriam ser perdidos durante a lavagem.

* Originalmente, as vantagens e limitações deste procedimento foram avaliadas em amostras de cérebro (matérias branca e cinzenta), fígado e músculo.

2.3.3 – Método de Bligh & Dyer

Este método, descrito por BLIGH & DYER (1959), para extração de lipídios em pescado, trata-se de uma modificação do método de FOLCH *et al.* (1957). De acordo com CHRISTIE (1982), ambos os métodos têm a capacidade de extrair, sem necessidade de aquecimento das amostras e solventes. Para isto, deve ser usada uma mistura de solventes orgânicos de diferentes polaridades, como clorofórmio (CHCl_3 , média polaridade) e metanol (MeOH, alta polaridade), aliado ao alto poder de solvente universal da água tissular (BLIGH & DYER, 1959). Como os componentes não lipídicos ficam na fase MeOH/ H_2O , a camada clorofórmica contém os lipídios totais purificados.

2.4 – Divisão dos componentes lipídicos em classes

Num extrato de lipídios totais (Soxhlet ou Bligh & Dyer) de músculo de peixes, pode existir uma grande variedade de substâncias orgânicas lipossolúveis, que são distribuídas em três classes principais: lipídios neutros (LN), glicolipídios (GL) e fosfolipídios (PL) (CHRISTIE, 1982; JOHNSTON *et al.*, 1983; KATES, 1972).

Os lipídios neutros (KATES, 1972) ou lipídios simples (CHRISTIE, 1982) incluem as substâncias ou subclasses chamadas de acilgliceróis (triacilglicerídios, diacilgliceróis e monoacilgliceróis), aquil-diacilgliceróis, plasmalogenos neutros, esteróis (principalmente colesterol livre e esterificado), ceras, vitaminas lipossolúveis, pigmentos carotenóides, hidrocarbonetos graxos e ácidos graxos livres.

O termo glicolipídios, segundo CHRISTIE (1982) é usado para descrever qualquer composto contendo uma ou mais moléculas de monossacarídios, unidas através de uma ligação glicosídica a uma parte lipídica, e assim engloba os glicoglicerolipídios e alguns esfingolipídios (cerebrosídios, sulfatídios e glangliosídios).

Para Christie (1982), o termo fosfolipídios, que também pode ser classificado como lipídio complexo, compreende os componentes lipídicos contendo ácidos graxos e um grupo fosfato, ambos ligados ao glicerol (glicerofosfolipídios) ou à esfingosina (esfingofosfolipídios). As principais substâncias ou subclasses de glicerofosfolipídios incluem ácido fosfatídico, fosfatidilglicerol, fosfatidilcolina ou lecitina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, cardiolipina, alquilacilglicerofosfolipídios e plasmalogenos fosforilados.

Às vezes, durante a separação dos lipídios em classes, é freqüente a denominação de lipídios polares para expressar o conteúdo de GL mais PL.

É importante conhecer as concentrações das classes de lipídios porque cada uma delas exerce funções diferenciadas nos corpos animais. Os LN, especialmente, os triacilgliceróis são usados principalmente para estocagem de energia nos tecidos adiposos e participa com teor mais elevado na lipoproteína de baixa densidade (LDL - prejudicial à saúde humana por transportar o colesterol ruim) do que na lipoproteína de alta densidade (HDL – bom para redução do colesterol). Os GL, PL e esteróis são considerados lipídios formadores das membranas celulares, portanto, não sendo usados como fontes de energia. Maior conteúdo de PL é encontrado na HDL do que na LDL. Assim, do ponto de vista da associação das frações lipídicas com as lipoproteínas boa e ruim, é recomendável consumir alimentos com maiores concentrações de fosfolipídios. O pescado desponta como uma fonte bem balanceada de LN e PL, aliado com o baixo teor de lipídios e alto conteúdo de proteínas de excelente valor nutritivo (MAIA, 1992).

A separação e quantificação das classes de lipídios podem ser realizadas por meio de métodos cromatográficos, tais como, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ou HPLC), cromatografia de troca iônica ou cromatografia em coluna aberta.

Os teores das classes de lipídios em diferentes alimentos são mostrados na TABELA 1. Verifica-se que os lipídios neutros é a classe majoritária nos alimentos. Nota-se também a ausência de glicolipídios e a presença de fosfolipídios em algumas amostras. Com poucas exceções, os fosfolipídios apresentam-se como componentes principais em alimentos (ex. maçã e amido de trigo).

TABELA 1 – Conteúdos das classes de lipídios em alimentos.

Amostra	% LT	Classes Lipídicas (%)		
		LN	GL	PL
Soja	20	>96	-	1,1-3,2
Milho	3,8	>97	-	1-2
Algodão	22-24	>97	-	0,7-0,9
Arroz	2,4	>98	-	0,5
Amendoim	48	>98	-	0,3-0,4
Pacu (peixe de água doce)	11	90-96	-	4-8
Curimatá (peixe de água doce)	6	86-91	-	8-14
Tilápia (peixe de água doce)	1,4	66-69	-	30-34
Tambaqui (peixe de água doce)	6	89-92	-	7,5-10
Mexilhão	0,2 – 2,0	38-67	-	36-55
Leite	3,7	95-98	0,06	0,8-1,0
Gema de ovo	33	72	-	28
Amido de trigo	2,2	6	5	89
Farinha de trigo	1,1-1,8	59	26	15
Maçã	0,0-0,5	36	17	47

Fonte: Adaptada

2.5 – Composição química e classes lipídicas em pescado

Os objetivos de determinar a composição química são: padronização dos produtos alimentares na base de critérios nutricionais, fornecimento de subsídios para decisões de caráter dietário, acompanhamento de processos industriais e pesquisas através de mudanças nos componentes químicos, e seleção de equipamentos certos para otimização econômico-tecnológica (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994). Nesta pesquisa foi determinada a composição química com o objetivo de caracterizar a amostra e acompanhar os teores percentuais dos lipídios extraídos pelos dois métodos e suas respectivas contribuições para a soma total dos macronutrientes.

Segundo CONTRERAS-GUZMÁN (1994), os fatores que afetam a composição química são: idade dos peixes, estações do ano e fase de migração,

sexo e desenvolvimento das gônadas, zona do corpo, tipo de músculo e remoção eficiente dos resíduos (ossos). A carne de pescado é constituída basicamente por músculo estriado, o qual pode ser dividido em músculo escuro (carne escura ou vermelha) e músculo ordinário (carne branca ou clara).

Segundo OGAWA (1999), o músculo do pescado, em geral, pode conter 60 a 85% de umidade, 20% de proteínas, 1 a 2% de cinzas, 0,3 a 1,0% de carboidratos e 0,6% a 36% de lipídeos.

Há muito tempo, se usam os teores de proteína e gordura como critério prático para comparações entre as diferentes espécies de pescado. Assim, é muito comum dizer que determinado pescado é considerado rico em proteína, pobre em gordura, etc. Para a classificação do pescado com base nesses critérios existem várias sugestões, todas elas de natureza arbitrárias, como aquelas citadas por ACKMAN (1989), JACQUOT (1961) e STANSBY (1962).

Para ACKMAN (1989), o pescado é considerado magro (<2%), baixo teor (2-4%), médio teor (4-8%) e alto teor (>8%). Contudo, segundo JACQUOT (1961), o pescado pode ser classificado como magro, semigordo e gordo, caso tenham respectivamente, teores de lipídios de 2,5% (máximo), de 2,5 a 10% e de 10% (mínimo), enquanto STANSBY(1962) considera um peixe magro aquele contendo gordura abaixo de 5%, semigordo com 5 a 15% e gordo com mais de 15%.

Com relação ao teor de proteína, STANSBY (1962) diz que o pescado pode ter baixo teor de proteína (<15%), alto teor de proteína (15 a 20%) e muito alto teor de proteína (>20%). Através da combinação dos teores de proteína e gordura foram descritas cinco categorias de pescado (Tabela 2).



TABELA 2 - Classificação do pescado em categorias de acordo com as quantidades de gordura e proteínas.

Categoria	Teor de gordura	Teor de proteína
A	<5% (peixe magro)	15-20% (alto teor de proteína)
B	5-15% (peixe semi-gordo)	15-20% (alto teor de proteína)
C	>15% (peixe gordo)	<15% (baixo teor de proteína)
D	<5% (peixe magro)	>20% (muito alto teor de proteína)
E	<5% (peixe magro)	<15% (baixo teor de proteína)

Fonte: STANSBY (1962)

GURGEL & FREITAS (1972) investigaram a composição química de doze espécies de peixes de água doce do nordeste brasileiro. Entre as espécies encontra-se a curimatã comum, *Prochilodus cearensis*, que teve a seguinte composição química: 69% (59,6 – 77,0%) de umidade, 18,3% (16,9 – 21,4%) de proteína, 11,2% (4,1 – 26,1%) de gordura e 1,9% (1,1 – 3,6%) de cinzas.

A variação estacional do teor de gordura da curimatã comum, *Prochilodus cearensis*, novamente foi investigada por GURGEL & FREITAS (1977), com exemplares coletados no açude Orós, Ceará. Os resultados mostraram que a curimatã comum é um peixe semi-gordo e que o teor de gordura variou entre os indivíduos de uma mesma espécie. Observou-se uma boa correlação entre o comprimento total e o teor de gordura, o mesmo não ocorrendo entre a gordura e a época de captura.

OLIVEIRA & MAIA (1997), também determinaram a composição centesimal e apresentaram os resultados na forma de resumo para a curimatã comum, *Prochilodus cearensis*, (umidade, 82%; proteínas, 15,4%, lipídio, 1,3% e cinzas, 1,3%).

O conteúdo médio de umidade no filé de curimatã, *P. nigricans* variou de 76 a 82% e gordura entre 0,5 a 4,0%. O conteúdo de proteína ficou em torno de 20% mas diminuindo bruscamente para 17% com o aumento no volume de água do rio. Com base nos resultados, JUNK (1985) conclui que a curimatã amazonense sofre uma forte influência sazonal sobre os teores de gordura e umidade.

Os conteúdos de PL e LN foram determinados em 15 espécies de água doce de rios e lagos de Nova Iorque (EUA) por KINSELLA et al. (1977). A quantidade de

PL variou de 185 a 875 mg/100g de filé e mostrou uma relação inversa com os LT. Os teores de LN tiveram variação de 0,26-3,38g/100g de filé. As 4 espécies mais “magras” apresentaram 0,7-08% de LT; em duas delas, “rock bass” e “sunfish pumpkinseed”, *Lepomis gibbosus*, os teores de LN (65,7% e 59,4%, respectivamente) foram maiores do que os teores de PL (27,2% e 31,1%, respectivamente) e nas outras duas, “burbot”, *Lota lota* e perca amarela, *Perca flavescens*, o inverso ocorreu, com os teores de PL que foram de 51,1% e 49,4%, respectivamente, sendo portanto, superiores aos respectivos teores de 36,9% e 39,6% de LN.

Em trabalhos realizados com o curimatá, *P. scrofa* capturado no estado de São Paulo, MAIA et al. (1994) encontraram média de 88,1% de LN e 11,8% de PL, mas não detectaram glicolipídios. Da mesma maneira, foi verificado a ausência de GL em tambaqui, *Colossoma macropomum* (MAIA & RODRIGUEZ-AMAYA, 1992) e em pacu, *Piaractus mesopotamicus* (MAIA et al, 1995), que apresentaram, respectivamente, 90,7% de LN e 8,7% de PL e 94,0% de LN e 5,0% de PL.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Obtenção das amostras

Para realização da presente pesquisa as amostras de cabeça de camarão, (*Litopenaeus vannamei*), estocadas em gelo foram adquiridas por amostragem de embalagens de 2Kg de camarões, sendo as mesmas inspecionadas visualmente quanto ao seu melhor aspecto de qualidade. Mensalmente, durante um período de cinco meses foram utilizados porções de 500g de cabeça contendo hepatopâncreas.

3.2 – Preparação das amostras para análise

No Laboratório de Recursos Aquáticos (LARAq) do Departamento de Engenharia de Pesca (DEP), as cabeças de camarões foram homogeneizadas em liquidificador comum antes da realização das determinações químicas.

3.3 – Determinações químicas

- ▶ UMIDADE – o conteúdo de água presente na amostra foi determinada em triplicada, através de secagem em estufa a 105°C, até atingir peso constante (NAGAKURA, 1972).

- ▶ PROTEÍNA TOTAL – determinado em triplicata, através do método semi-micro Kjeldahl (PEARSON, 1973), utilizando-se o fator de 6,25 para conversão de nitrogênio total em proteína total.

- ▶ SAIS MINERAIS (CINZAS) – através de incineração em forno mufla a 550°C, realizada em triplicata, até a obtenção de peso constante (NAGAKURA, 1972).

- ▶ CARBOIDRATOS – obtido por diferença, ou seja:
$$\% \text{carboidrato} = 100 - (\% \text{H}_2\text{O} + \% \text{proteína} + \% \text{cinza} + \% \text{lipídios})$$

- ▶ LIPÍDIOS TOTAIS – empregou-se dois procedimentos para extração de lipídios em grande escala, conforme descrição abaixo:

PROCEDIMENTO 1: Método de SOXHLET, descrito por NAGAKURA (1972), utilizando os seguintes materiais:

(a) Vidrarias e Aparelhagem (Figura 1).



FIGURA 1 – Aparelhagem para extração de lipídios totais pelo método de Soxhlet.

- Chapa de aquecimento com reostato para controlar a taxa de aquecimento
- Macro-extrator de Soxhlet de 500mL onde a amostra é colocada;
- Condensador de bola (Allihn) com água corrente usada como refrigerante.
- Balão receptor de vidro de fundo chato para recuperação do LT extraído;

(b) Procedimento: o método compreende três etapas:

- Desidratação da amostra

Para extração da gordura recomenda-se que as amostras sejam previamente desidratadas. Para isto, utilizou-se cerca de 200 g de amostra úmida para cada análise mensal, com a água tissular sendo removida em estufa a 105 °C,

resultando em torno de 50 g de amostra seca, que foi dividida em duas porções de pesos aproximadamente iguais para a extração de gordura.

➤ Extração da gordura da amostra com solvente

Sobre as amostra secas procedeu-se a extração da gordura usando acetona como solvente, que é considerado de média polaridade por ter um índice Snyder de 5,4 (KOK CHEMWARE, 1999-2002). O tempo de extração foi de cerca de 8 horas. Na primeira parte da pesquisa foi realizado também o uso de éter etílico como solvente a fim de uma padronização do solvente o qual foi usado na segunda parte da pesquisa.

➤ Quantificação da gordura extraída através de pesagem.

Finalizada a extração, a acetona foi parcialmente removida do balão receptor e recolhida no extrator, evitando a sifonação, bem como o mesmo procedimento para o éter etílico. O extrato final foi transferido para uma proveta graduada, sendo então anotado o volume final. Em seguida, de cada extração, retirou-se três (3) alíquotas de 5,0 ml que foram transferidas para cápsulas de alumínio tarada, colocadas em estufa a 105°C durante 30 min. Após resfriamento à temperatura ambiente dentro de um dessecador à vácuo, as cápsulas foram pesadas em balança analítica. O teor de LT foi expresso em base úmida.

PROCEDIMENTO 2: Método de BLIGH & DYER (1959)

Após ter calculado a umidade da amostra, foi utilizado uma mistura de solventes metanol/clorofórmio/água na proporção, respectivamente, de 2:1:0,8, na primeira homogeneização, durando 3 minutos (Figura 2). Transcorrido esse tempo adicionou-se 100 ml clorofórmio e o mesmo volume de água, e após cada adição, homogeneizou por 30 segundos. Dessa maneira, a proporção extratante final passou a ser 2:2:1,8. O extrato foi filtrado em papel filtro, usando funil de Büchner e sucção à vácuo. Em seguida foi realizada uma nova extração do resíduo sólido com clorofórmio em quantidade aleatória com a finalidade de extrair possíveis lipídios restantes. Foi transferido o filtrado para uma proveta e deixado em repouso para completa separação das fases CHCl_3 e $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$. Descartamos a fase $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ e quantificamos os LT presentes na fase clorofórmica em triplicatas, retirando uma alíquota de 5 ml, colocando em cápsulas taradas para serem seca em estufas a 105 °C.



FIGURA 2 – Aparentagem para extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer (1959).

3.4 – Separação das classes de lipídios

Os lipídios totais obtidos pelos métodos Soxhlet e Bligh & Dyer foram separados nas classes de lipídios neutros e fosfolipídios de acordo com o procedimento descrito por MAIA (1992).

As alíquotas de lipídios totais (1g) foram fracionadas em lipídios neutros e fosfolipídio por cromatografia em coluna (Figura 3), num tubo cromatográfico de vidro de 30 cm de comprimento por 2,0 cm de diâmetro interno, contendo 12 g de sílica gel 60 (70-230 mesh) como adsorvente, de acordo com especificações de JOHNSTON et al. (1983).

Doze gramas do adsorvente foram misturadas com 60ml de clorofórmio e transferidas para a coluna. Depois de realizada essa operação foi adicionada uma camada de 1 cm de sulfato de sódio anidro, ficando a altura total da coluna de aproximadamente 12 cm.

Utilizou-se a seguinte seqüência de eluição para a separação das classes de lipídios na coluna cromatográfica: 1) Fração I: lipídios neutros – eluída com 200ml de

20% acetona em clorofórmio. 2) Fração II: fosfolipídios – eluída com 200ml de metanol.

O teor de lipídios de cada fração eluída foi determinada gravimetricamente. O solvente de eluição foi evaporado em roto-evaporador e, com auxílio de um pequeno volume de clorofórmio, o extrato foi transferido para um frasco pré-tarado. O solvente foi parcialmente evaporado com nitrogênio (N_2) e a secagem total completa em dessecador a vácuo, até atingir peso constante. As percentagens de lipídios neutros e fosfolipídios foram calculadas em relação ao peso de lipídios totais adicionado na coluna. As determinações foram realizadas em duplicatas.



FIGURA 3 - Cromatografia em coluna para separação das classes de lipídios totais.

3.5 – Análise estatística

Com o objetivo de verificar as diferenças nos métodos para a extração de lipídios, foi realizada a análise de variância unifatorial (ANOVA). Em caso de rejeição da hipótese (H_0), serão aplicados o teste de Tukey e análise de variância, a um nível de 5% de significância, segundo procedimentos recomendados por MONTGOMERY (1976) e CENTENO (1999).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 3 – Resultados sobre a composição química centesimal (%) da cabeça de camarão.

MESES	UMIDADE	PROTEÍNA	CINZA	LIPÍDIOS		CHO ¹
				Bligh & Dyer	Soxhlet	
Junho/05	73,3 ± 0,1	19,0 ± 0,5	1,4 ± 0,3	4,1 ± 0,3	4,0 ± 0,3	2,2
Julho/05	75,6 ± 0,3	16,9 ± 0,3	2,0 ± 0,5	4,3 ± 0,5	5,3 ± 0,2	1,2
Agosto/05	74,8 ± 0,4	18,0 ± 0,2	2,1 ± 0,1	3,5 ± 0,2	6,7 ± 0,4	1,6
Setembro/05	75,2 ± 0,1	18,5 ± 0,4	2,5 ± 0,2	3,8 ± 0,4	6,9 ± 0,0	-
Outubro/05	74,8 ± 0,2	17,5 ± 0,5	2,3 ± 0,1	4,5 ± 0,3	7,2 ± 0,2	0,9
Média ± dp	74,7 ± 0,9	18,0 ± 0,8	2,1 ± 0,4	4,1 ± 0,4	6,0 ± 1,3	

¹ %CHO (carboidratos) = [100 – (%H₂O + % Proteína + % Cinzas + %LT/Soxhlet)].

Verifica-se pela Tabela 3, que os teores médios de umidade na cabeça de camarão teve comportamento decrescente ao longo do período de análises. Com relação às proteínas, a amostra de cabeça de camarão mostra um leve aumento em função da época de análise.

Com os resultados apresentados na Tabela 3 pode-se classificar a cabeça de camarão como pescado de médio teor de gordura (5 – 15%) e alto teor protéico (15 –20%) na classificação de STANSBY (1962).

Em geral, o conteúdo de gordura varia inversamente com o teor de umidade. A soma desses dois componentes, em média é da ordem de 80 a 81% (THURSTON *et al.*, 1959). Este fato pode servir como um critério para fazer uma previsão do teor de lipídios conhecendo-se o teor de umidade ou vice-versa.

Verifica-se através da Tabela 3 que a soma das médias de umidade e lipídios(Bligh & Dier) na cabeça de camarão foi de 78,8,0% e a soma da umidade e lipídios(Soxhlet) foi de 80,7% , valores médios próximos daqueles relatados para os peixes em geral por THURSTON *et al.* (1959).

Valores de 72,2% de umidade, 7,9% de cinzas, 13,1% de proteína, 3,4% de gordura e 0,3% de carboidratos foram relatados por PAN (1989) para a cabeça de camarão *Penaeus fissurus* cultivado em Taiwan, resultados estes próximos dos obtidos nesta pesquisa.

A composição química do camarão está próximo ou dentro da faixa de variação dos valores descritos por CONTRERAS-GUZMÁN (1994), para a que foram os seguintes: umidade- 67,7-75,1%; proteína-19,4-23,6%; gordura-1,92-10,9%; e cinzas-1,3-2,4%.

Os teores de cinzas elevados encontrados para a cabeça de camarão pode ser atribuído a presença de quitina e minerais naturalmente presentes nesta amostra.

Todavia a extração pelo método de Soxhlet, usando acetona como solvente se mostrou quase sempre superior a aqueles extraído pelo método de Bligh & Dier. Talvez isto seja, por causa que a acetona seja um solvente de alta polaridade com isso venha a extrair componentes não lipídicos da amostra, como, uréia, sais, aminoácidos e açúcares livres (CHRISTIE, 1982; KATES, 1972), ou mesmo, proteínas ou carboidratos ligados aos lipídios (JOSLYN, 1970).

Estudo comparativo entre os métodos de Soxhlet e de Bligh & Dyer foi realizado por MEENENE (sem data) para extrair lipídios de fígado de *yellowfin* e albacora, com os resultados demonstrando rendimento superior para o método de Soxhlet e acetona como solvente. Idêntico comportamento foi relatado por MANIRAKIZA *et al.* (2001) para farinha de peixe, que usou acetona:hexano (1:4) como solvente no método de Soxhlet. Estes autores também verificaram que o poder de extração dos lipídios aumentou com o aumento da polaridade do solvente. Por outro lado, SOUTO *et al.* (2000) constataram que o método de Bligh & Dyer foi superior ($10,34 \pm 0,84$) ao método de Soxhlet ($8,02 \pm 1,66\%$) (sem especificação do solvente utilizado) para a extração de lipídios no filé de curimã (*Mugel lisa*).

Tabela 4 - Separação das classes de lipídios na cabeça de camarão.

Classe	Método	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Média ± dp
Lipídica							
% LN	Bligh & Dyer	62,0	67,2	60,0	72,0	70,3	66,5 ± 2,7
	Soxhlet	77,3	68,6	84,6	78,6	82,3	78,28 ± 2,8
% PL	Bligh & Dyer	33,3	31,9	38,2	26,0	28,6	31,6 ± 3,3
	Soxhlet	25,7	29,4	13,4	20,4	17,7	21,32 ± 3,6

¹ Abreviaturas: LN = lipídios neutros; PL = fosfolipídios; dp = desvio padrão

A tabela 4 mostra que a cabeça de camarão apresenta uma grande quantidade de lipídios neutros (LN), atingindo média de aproximadamente 66,5% para o método de Bligh & Dyer e média de 78,28% para o método de Soxhlet, apresentando variação de 11,78% entre os métodos citados, enquanto que os fosfolipídios (PL) apresentaram uma menor quantidade, em média 31,6% e 21,32% para os métodos de Bligh & Dyer e Soxhlet, respectivamente. Mostra também que a recuperação das classes não atingiram os 100% nos meses de análises para o método de Bligh & Dyer em nenhum mês, sendo que a menor recuperação foi no mês de Junho – 95,3% e a maior taxa de recuperação foi no mês de Julho 99,1%. Entretanto para o método de Soxhlet foi quase sempre 100%, ou até valor superior a esse 103% para o mês de Junho.

MAIA *et al.* (1994) e OLIVEIRA & MAIA (1997) pesquisaram, respectivamente, as classes de lipídios no curimatá, *P. scrofa* do estado de São Paulo e curimatã, *P. cearensis* do estado do Ceará. Teores de 88,1% de LN e de 11,8% de PL foram registrados no primeiro trabalho, ao passo que no segundo trabalho, foram relatados 85,8% de LN (incluindo 1,3% de GL) e 14,2% de PL. Em ambos os trabalhos a taxa de recuperação foi superior a 99,9%. Segundo OLIVEIRA (1999) os LN se mostraram como classe majoritária, com média de 76,7% e os PL com médias de 7,3%, possuindo uma porcentagem de recuperação em média de 84,0%, para curimatã, *P. cearensis*. Pode-se perceber que no presente trabalho, os LN se mostraram médias inferiores ao citados por MAIA *et al.* (1994) e superiores ao citados por OLIVEIRA (1999) e os PL se mostraram superiores ao citados por MAIA *et al.* (1994) e citados por OLIVEIRA (1999).

Em pesquisa realizada por ARAÚJO (2004) mostra que o filé de curimatã apresentou como classe majoritária os lipídios neutros(LN), atingindo média de

aproximadamente 85,5% no método de BD, enquanto que os fosfolipídios (PL) apresentaram uma menor quantidade, em média 13,4%. Já o método de SX atingiu média de aproximadamente de 88,1%, seguindo com média de 8,8% para a classe dos fosfolipídios(PL), Mostra também que a recuperação das classes atingiram os 100% em alguns meses de análises no método de BD, enquanto no método de SX nenhum mês atingiu os 100% de recuperação. podendo está relacionado com o método de extração por se tratar de um método a quente o extrato pode se mostrar impuro, já que no método de Bligh & Dyer o extrato clorofórmio se mostra mais puro por ser um método de extração a frio.

Comportamento inverso ao da presente pesquisa, já que a recuperação teve maiores valores no método de Soxhlet, podemos atribuir esse comportamento a espécie utilizada, pois ARAUJO (2004) realizou com peixe, enquanto aqui se utilizou crustáceo.

Feita um análise estatística entre os meses dos métodos para cada parâmetro, verificou-se que não houve diferença significativa entre os métodos.

5. CONCLUSÕES

Pelos resultados obtidos pode-se concluir que:

1. Os resultados sobre os conteúdos de proteína e lipídios permitem classificar a cabeça de camarão como um alimento de médio teor protéico e médio teor de gordura;
2. A recuperação das classes de lipídios foi inferior a 100% na maioria dos meses;
3. Os LN são as principais classes presente na cabeça de camarão apresentando uma concentração cerca de 2 vezes maior do que a de fosfolipídios;
4. O método de Soxhlet extraiu mais lipídios neutros em todos os meses, enquanto que o método de Bligh & Dyer obteve uma maior extração de fosfolipídios em todos os meses;
5. Foi observada uma relação inversa entre os conteúdos de umidade e de lipídios totais, com a soma entre estes constituintes sendo em média de 80%.
6. Não houve diferença significativa entre os métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer em todas as determinações realizadas, como não existiu diferença significativa entre os métodos comparados, seria mais prático a utilização do método de Bligh & Dyer, pois esse leva menos tempo para a extração dos lipídios totais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKMAN, R. G.; McLEOD, C. Total lipids and nutritionally important fatty acids of some Nova Scotia fish and shellfish food products. **Can. Inst. Food Sci. Technol. J.**, v.21, n.4 p.390-398, 1998

ANDRIGUETTO, J.M.; PERLY, L.; MINARDI, I.; et al.. Nutrição animal – As bases e os fundamentos da nutrição animal – Os alimentos. Volume 1, 4a edição, 2a impressão. São Paulo -Nobel. 1986. 395 p..

ARAÚJO, F. W. S.; Estudo comparativo entre os métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer para extração de lipídio total na curimatã comum, (*prochilodus cearensis*), Monografia (Curso de Engenharia de Pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004, 40p.

BLIGH, E.G.; DYER, W.K.A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, v.37, n. 8, p. 911 – 917, 1959.

BROOKS, S. P. J.; RATNAYAKE, W.M.N.; LAMPI, B.J.; HOLLYWOOD, R. Measuring Total Lipid Content in Rat Carcasses: A comparison of Commonly Employed Extration. Methods. **J. Agric. Food Chem.**, v.46, p 4214-4217 , 1998.

CENTENO, A.J. *Curso de estatística aplicada à biologia*. 2 ed. Goiânia: UFB, 234p, 1999.

CHRISTIE, W.W. Preparation of lipid extracts from tissues. In: W.W. Christie (ed.), *Advances in lipid Methodology – Two*. Dundee, USA. Oily Press, p. 195 – 213, 1982.

CONN, E.E. & STUMPF, P.K. Introdução à bioquímica. São Paulo, Edgard Blücher, 1980. 525 p..

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. Bioquímica de pescado e derivados. Jaboticabal: FUNEP., p.409, 1994.

FOLCH, J.; LEES, M.; SLOANE STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem*, v.226, n. 1, p. 497 – 509, 1957

GURGEL, J.J.S & FREITAS, J.V.F. Sobre a composição química de doze espécies de peixe de valor comercial de açudes do Nordeste brasileiro. *Boletim Técnico DNOCS*, 30 (1) : 45 – 57, 1972.

GURGEL, J.J.S & FREITAS, J.V.F. Variação Estacional do Teor de Gordura da Curimatã Comum, *Prochilodus cearensis* Steindachner, Pescada do Piauí, *Plagioscion squamosissimus* (Heckel) e Traíra, *Hoplias malabaricus* (Bloch) no açude Orós, em Orós, Ceará. Boletim Técnico do DNOCS, v.35,n.2,p.149-163,1977.

JACQUOT,R. Organic Constituents of Fish and Other Aquatic Foods. In: BORGSTROM,G. (Ed.), Fish Food. London: Academic Press,v.1,p.145-210,1961.

JAHAN, K.; PATERSON, A.; SPICKETT, C. M. Fatty acid composition, antioxidants and lipid oxidatin in chicken breasts from different production regimes. *International Journal of Food science and Technology* , v. 39, p.443-453,2004.

JOHNSTON, J.J.; GHANBARI, H.A.; WHEELER , W.B. & KIRK, J.R. Characterization of shrimp lipids. *J. Food Sci.*, 48: 33-35,1983.

JOSLYN, M. A. Extraction methods and separation processes. In: M. A. JOSLYN (Ed.), *Methods in food analysis*. Physical, chemical, and instrumental methods of analysis. Academic Press, New York, ch. VI, p. 141 – 200, 1970.

JUNK, W. J. Temporary Fat Storage an Adaptation of Some Fish Species to the Waterlevel Fluctuation and Related Environmental Changes of the Amazon River. *Amazoniana*, v. IX, n.3,p.315-351,1985.

KATES, M. *Techniques of lipidology: Isolation, analysis and identification of lipids*. London. North Holland/American Elsevier Publ. Co., p.269-610, 1972.

KINSELLA,J.E.;SHIMP,J.L.;MAI,J.;WEIHRAUCH,J. Sterol, Phospholipids, Mineral Content and Proximate Composition of Fillets of Select Freshwater Fish Species. *Journal of Food Biochemistry*, v.1, n.2, p. 131-140,1977.

LEHNINGER, A.L. Princípios de bioquímica. São Paulo -SARVIER, p. 725,1986

MAIA, E.L. *Otimização da metodologia para caracterização de constituintes lipídicos e determinação da composição em Ácidos Graxos e aminoácidos de peixes de água doce*. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. 242 p., 1992.

MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; MORAES, M.A.C. Formulation, Acceptability and Stability of Fish Patties Made with the Freshwater Fish,

Prochilodus scrofa Steindachner. Ciênc. E Tecnol. De Aliment.,v.2,n.1,p.33-46,1992.

MAIA, E.L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. & FRANCO, M. R. B. Fatty acids of the total, neutral and phospholipids of the Brazilian freshwater fish *Prochilodus scrofa*. *J. Food Comp. Analysis*, v. 7,p. 240-251, 1994.

MANIRAKIZA, P.; COVACI, A.; SCHEPENS, P. Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of food composition and analysis*, 14 (1) : 93 – 100, 2001..

MEENENE, M. Optimal processing for lipid extraction from tuna liver. Abstract. http://www.clib.psu.ac.th/acad_41/mmut1.htm. Acessado em 11/01/2005.

MONTGOMERY, D.C. *Design and analysis of experiments*. New York. John Wiley & Sons, 418p, 1976.

NAGAKURA, , K. General analysis. In: OKADA, M; HIRAO, S.; NOGUCHI, E.; SUZUKI, T.; YOKOSUKI, M. (Eds.), *Utilization of marine products*, Tokyo, Japan. Overseas Technical Cooperation Agency, p. 159 –169, 1972.

NUNES, I.J. *Nutrição animal básica*. 2. ed. Ver. Aum. Belo Horizonte: FEP – MVZ. Editora, 1998. 388 p..

OGAWA, M. Química do pescado. IN : OGAWA, M.;MAIA, E.L. (Ed.).Manual de pesca – ciências e tecnologia do pescado. São Paulo: Varela, 1999, cap.4, p.29-71

OLIVEIRA, F. R. & MAIA, E. L., 1997. Estudo dos constituintes lipídios de peixes do Ceará. XVI Encontro de iniciação à pesquisa, resumo nº. 1975. Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós graduação/UFC, Fortaleza-Ce.

OLIVEIRA, S. L. C. L., Estudo dos constituintes lipídicos em peixes do Ceará. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza – Ceará.117p. 1999.

PAN, B. S. Recovery of shrimp waste for flavourant. In: M. N. VOIGT and J. R. BOTTA (Eds.), *Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability*. 34th. Atlantic Fisheries Technological Conference and Seafood Biotechnology Workshop. Aug, 27 to sept.1, Canada.Technomic Publ. Comp., Inc. Pensylvania, USA, p. 437 – 452, 1989.

PEARSON, D. *Laboratory techniques in food analysis*. John Wiley & Sons, New York, p.27 – 77, 1973.

SOUTO, S.K.C; FREIRE, I.M.G.; MELO FILHO, A.B.de; MELO FILHO, S.C. de; GUERRA, N.B. Determinação de lipídios em peixe curimã (*Mugel lisa*): Comparação entre os métodos de Soxhlet e de Bligh & Dyer. In: *XVII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS*. Fortaleza, Brasil. SBCTA, v. 1, p. 2.32, 2000.

STANSBY, M. E. 1962. Proximate composition of fish, p. 55-60. In: Heen, F. & Kreuzer, R. (eds), *Fish in nutrition*. Fishing News (Books) Ltd., London.1962.

SWEELEY, C.C. Chromatography on columns of silicic acid. In: J. M. LOWENSTEIN (Ed.), *Methods in Enzymology*. New York, USA. Academic Press, v. XIV - Lipids, p. 254-267, 1969.

THURSTON, C.E.; STANSBY, M.E.; KARRICK, N.L.; MIYAUCHI, D.T. & CLEGG, W.C. Composition of certain species of freshwater fish. II. Comparative data for 21 species of lake and river fish. *Food Research*, v.24, n .5, p. 493 – 502, 1959.

VASCONCELLOS, P.M.B. Guia prático para o confinador. São Paulo:Nobel,1993. 226 p..

VOGT, A.; GORMLEY , T. R.; DOWNEY, G.; SOMERS, J. A comparison of Selected Rapid Methods for Fat Measurement in Fresh Herring (*Clupea harengus*). *JFCA*, v.15, n.2, p.205-215,2002.