



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA**

**COMPARAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS EM
AMOSTRAS DE PEIXES DESIDRATADOS USANDO O
MÉTODO BLIGH & DYER ADAPTADO E O MÉTODO SOXHLET.**

SHEILA DE OLIVEIRA YAMAMOTO DE CASTRO

**Monografia apresentada ao Departamento
de Engenharia de Pesca do Centro de
Cências Agrárias da Universidade Federal do
Ceará, como parte das exigências para a
obtenção do título de Engenheiro de Pesca.**

**FORTALEZA - CEARÁ - BRASIL
NOVEMBRO - 2009**

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)

C353c Castro, Sheila de Oliveira Yamamoto de.
Comparação da extração de lipídios totais em amostras de peixes desidratados usando o método Bligh & Dyer adaptado e o método Soxhlet / Sheila de Oliveira Yamamoto de Castro. – 2009.
34 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 2009.
Orientação: Prof. Dr. Everardo Lima Maia.

1. Tilápia (Peixe). 2. Lipídios . I. Título.

CDD 639.2

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Everardo Lima Maia, D.Sc
Orientador/Presidente

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc
Membro

Profª Substituta Darlyane Gadelha de Castro, Eng. Pesca
Membro

VISTO:

Prof. Moisés Almeida de Oliveira, D.Sc
Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Raimundo Nonato de Lima Conceição, D.Sc
Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Takeski e Arlete.
Aos meus irmãos Aderbal e Kely.
As minhas avós Maria e Fumiê.
Aos meus sogros Paulo e Iza.
Ao meu esposo Oseas.
A minha filha Ana Letícia.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Everardo Lima Maia, pela orientação racional e criteriosa, porém atenciosa e paciente no período em que fui seu orientando na monografia.

A professora Silvana Saker Sampaio e ao professor Glácio Oliveira pela orientação na análise estatística.

A colega do Laboratório de Recursos Aquáticos (LARAq), Cláudia Cinthia e Norma Ogawa pela ajuda durante as análises químicas.

Aos meus pais, minha irmã, minha avó, meus sogros que me ajudaram em todos os momentos em que ficaram cuidando da minha filha para eu estudar e concluir este curso.

Ao meu esposo por ter me ajudado, em todos os aspectos, para a conclusão da faculdade.

Ao meu irmão, sua esposa e minha irmã por seus incentivos, mesmo que a distância.

As orações e incentivos, ainda em vida, da minha querida Dona Ana Clementino Morais de Castro na certeza que continua a olhar por nós.

SUMÁRIO	Página
DEDICATÓRIA	iii
AGRADECIMENTOS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
RESUMO	viii
1. INTRODUÇÃO	1
2. MATERIAL E MÉTODOS	3
2.1. Equipamentos Utilizados	3
2.2. Reagentes	5
2.3. Obtenção das amostras	6
2.4. Preparo das amostras para análise	7
2.5. Determinações químicas	8
2.6. Análise estatística	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1. Comparação do método de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado com amostras de tilápia e mapará desidratados	14
3.2. Métodos de extração de lipídios em pescado: Dados de literatura	18
3.3. Informações complementares sobre o método de Soxhlet	21
3.4. Informações complementares sobre o método Bligh & Dyer para extração de lipídios em pescado	22
4. CONCLUSÕES	24
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Equipamentos utilizados na extração de lipídios pelo método de Soxhlet (Com permissão da TECNAL)	3
FIGURA 2 Materiais usados na extração de lipídios pelo método Bligh & Dyer adaptado	4
FIGURA 3 Homogeneizador de sangue usado para extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer adaptado (Com permissão de Phoenix)	4
FIGURA 4 Estufa utilizada para desidratar as amostras de tilápia e mapará	5
FIGURA 5 Reagentes usados para extração de LT pelos métodos Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado	5
FIGURA 6 Instrumentos utilizados para homogeneizar as amostras desidratadas	7
FIGURA 7 Balança analítica utilizada para pesar as amostras desidratadas	7
FIGURA 8 Dados comparativos da extração de lipídios de mapará (<i>Hypophthalmus edentatus</i>) pelo método Soxhlet em diferentes tempos	10
FIGURA 9 Dados comparativos da extração de lipídios de mapará (<i>Hypophthalmus edentatus</i>) pelo método Bligh & Dyer adaptado em diferentes tempos	11
FIGURA 10 Dados comparativos da extração de lipídios de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) pelo método Soxhlet em diferentes tempos.	11
FIGURA 11 Dados comparativos da extração de lipídios de tilápia (<i>Oreochromis niloticus</i>) pelo método Bligh & Dyer adaptado em diferentes tempos.	11
FIGURA 12 Mapará, <i>Hypophthalmus edentatus</i> (Spix, 1829) (Cortesia de Lovshin, L. L. http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?ID=4533&what=species)	16

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1	Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais do Mapará pelo método de Soxhlet	12
TABELA 2	Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais do Mapará pelo método de Bligh & Dyer adaptado.	12
TABELA 3	Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais do tilápia pelo método de Soxhlet	13
TABELA 4	Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais de tilápia pelo método de Bligh & Dyer adaptado	13
TABELA 5	Quantificação percentual de lipídios em filés de tilápia e de mapará desidratados extraídos pelos métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado	14
TABELA 6	Teste "t" de STUDENT comparando a extração de lipídios totais de tilápia pelo método de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado	15
TABELA 7	Teste "t" de STUDENT comparando a extração de lipídios totais de mapará pelo método de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado	15
TABELA 8	Resultado do teor de umidade das três amostras mapará	17
TABELA 9	Resultado do teor de umidade das três amostras tilápia	18

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo verificar a possibilidade de uso do agitador de tubos, do tipo “homogeneizador de sangue” (marca Phoenix, modelo AP-22), para extração de lipídios totais (LT) em amostras de tilápia (*Oreochromis niloticus*) um peixe de baixo teor de lipídios – e amostras de mapará (*Hypophthalmus edentatus*), uma espécie de alto teor de lipídios, submetidos á previa secagem em estufa. Três amostras de filés de cada espécie de peixe foram obtidas no comércio de Fortaleza, Ceará. Estes foram previamente triturados em processadores domésticos e desidratados em estufa a 105°C e posteriormente homogeneizados para serem analisadas quanto ao teor de lipídios totais. O método de Soxhlet, descrito pelo manual do equipamento (TECNAL, modelo TE-044-8/50) serviu como método de referência para comparação da eficiência de extração dos LT pelo método de Bligh & Dyer (1959) adaptado, com o emprego do homogeneizador de sangue. Os resultados dos teores de lipídios totais, em base seca, para as amostras de Tilápia foram de $9,00 \pm 2,76\%$ e $8,12 \pm 2,82\%$ pelos métodos Soxhlet e Bligh & Dyer, respectivamente. Para o mapará obteve-se uma extração de LT de $53,21 \pm 1,85\%$ e $50,65 \pm 2,21\%$ pelo Soxhlet e Bligh & Dyer, respectivamente. O método Soxhlet demonstrou mais elevado rendimento na extração de LT nas amostras de peixes, porém a análise estatística mostrou a equivalência entre os métodos. Com base nos resultados concluímos que o agitador de tubos pode ser usado na extração de lipídios totais em amostras desidratadas de tilápia e mapará.

COMPARAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS TOTAIS EM AMOSTRAS DE PEIXES DESIDRATADOS USANDO O MÉTODO BLIGH & DYER ADAPTADO E O MÉTODO DE SOXHLET.

SHEILA DE OLIVEIRA YAMAMOTO DE CASTRO

1. INTRODUÇÃO

A determinação de lipídios (gordura ou óleo) em alimentos e em especial, no pescado, é de importância fundamental para o processamento e controle de qualidade dos produtos processados. A extração de lipídios é importante em estudos bioquímicos, fisiológicos, nutricionais, dos mais diversos tipos de alimentos. Por exemplo, sabe-se que os parâmetros para os processos de enlatamento, defumação e salga dependem do conhecimento prévio do teor de gordura presente na matéria prima a ser processada. É muito comentado que a salga seca deve ser realizada em pescado magro, enquanto a salga úmida é mais bem realizada para peixes gordos (Horner, 1992).

Geralmente, a determinação de gordura em pescado é realizada através do método de Soxhlet (Nagakura, 1972), usando éter etílico como solvente para extração de gordura em amostras de pescado previamente seca em estufa, enquanto Strong & Koch (1981) afirmam que o método pode ser usado para uma grande variedade de alimentos, em especial, para aqueles com baixo conteúdo de umidade. Estes procedimentos de secagem eliminaram a etapa de hidrólise ácida da amostra, tornando o método mais simples, porém sem redução do tempo de extração, que pode durar 16 a 20 horas contínuas.

Em função da recomendação para secagem da amostra em estufa a 105°C antes da extração dos lipídios e do aquecimento do solvente contendo os lipídios dissolvidos, o método de Soxhlet é chamado de método de extração a quente. Assim, cuidado especial deve ser observado durante a etapa de eliminação do solvente para evitar a queima e alterações indesejáveis dos componentes lipídicos o que interfere na sua quantificação.

O método de Soxhlet também tem sido usado como método de referência para o desenvolvimento de novos métodos, comparações ou modificações de métodos existentes como relatados por Brooks et al. (1998), Jahan et al. (2004), Katikou & Robb (2001), Manirakiza et al. (2001) e Vogt et al. (2002).

Segundo Brum (2004) o método Bligh & Dyer adaptado é considerado versátil, efetivo e a utilização clorofórmio e etanol tem a capacidade de extrair tanto os lipídios neutros como os lipídios polares, mas é claro que o tipo de tecido a ser analisado influenciara nos resultados. Isto porque os lipídios neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares, enquanto lipídios polares os quais estão ligados por forças eletrostáticas e pontes de hidrogênio requerem solventes polares capazes de quebrar tais ligações e liberá-los.

Foi usado por Bernardino Filho (2008) o método de Bligh & Dyer (1959) para extrair lipídios de amostras in natura de tilápia e mapará usando o agitador de tubos do tipo homogeneizador de sangue em comparação com o método Soxhlet mostrou que os valores da composição química das amostras indicaram que o agitador de tubos pode ser usado para extração de lipídios.

Considerando as vantagens e desvantagens do método de Bligh & Dyer (1959) e a sua modificação por Bernardino Filho (2008), objetiva-se no presente plano de pesquisa, verificar a influência do agitador de tubos (baixa rotação) para extração quantitativa de lipídios totais em tilápia, *Oreochromis niloticus* e mapará, *Hypophthalmus edentatus*, comparando os resultados com o método de Soxhlet.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Equipamentos Utilizados

2.1.1. Determinador de Gordura pelo método de Soxhlet

Para extração dos lipídios totais pelo método de Soxhlet foi utilizado o equipamento da marca TECNAL (modelo TE-044-8/50, Piracicaba, São Paulo), (TECNAL Equipamentos para Laboratórios Ltda) mostrado na Figura 1.

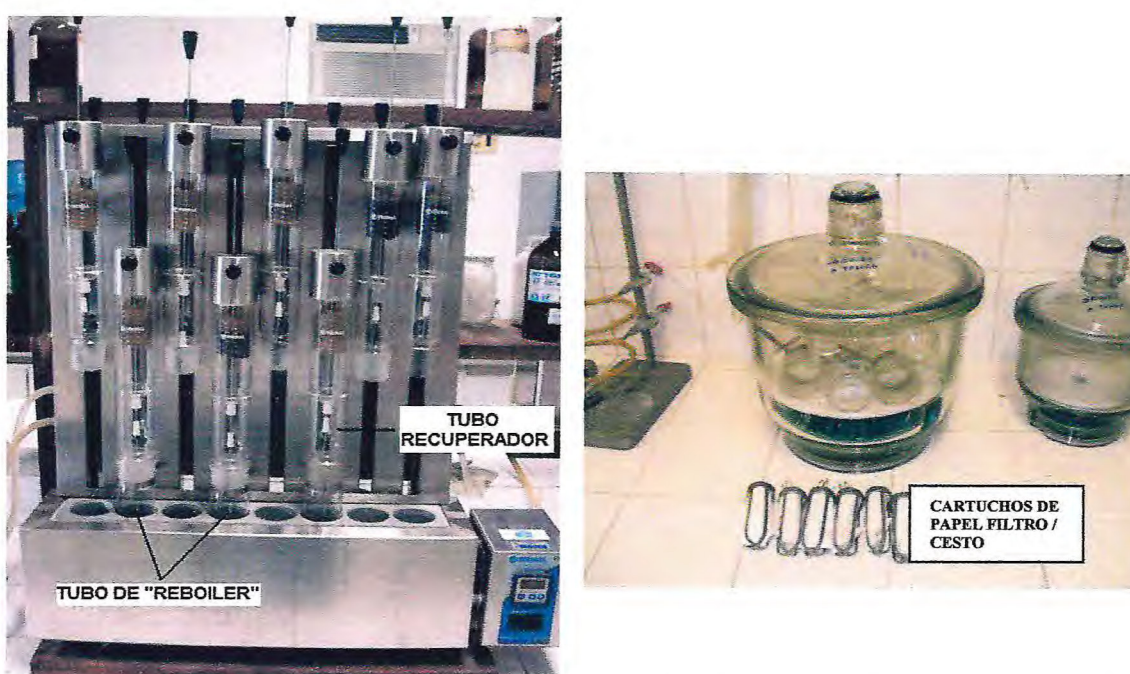


FIGURA 1 – Equipamentos utilizados na extração de lipídios pelo método de Soxhlet (Com permissão da TECNAL).

2.1.2. Extração de lipídios pelo método de Bligh & Dyer adaptado.

Para efeito ilustrativo estão mostrados nas Figuras 2 (acessórios) e 3 (agitador de tubos) os materiais utilizados para extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer adaptado.

Adaptados a condições do laboratório, o método de Bligh & Dyer (1959) foi usado com sucesso na pesquisa desenvolvida no Laboratório de Recursos Aquáticos – LARAq por Bernardino Filho (2008).



FIGURA 2 – Materiais usados na extração de lipídios pelo método & Dyer adaptado.



FIGURA 3 – Homogeneizador de sangue usado para extração de lipídios totais pelo método de Bligh & Dyer adaptado (Com permissão de Phoenix).

Segundo descrição disponível no sítio da Empresa Phoenix (<http://www2.phoenix.ind.br/index.php?id=472>), o homogeneizador de sangue (marca Phoenix, modelo AP-22) permite manter as soluções em suspensão homogênea, lavar precipitados, preparar suspensões, dissolver as amostras que reagem vagarosamente e desempenhar muitas outras tarefas rotineiras. O suporte das garras é girado por um motor elétrico com velocidade regulável entre 8 e 22 rpm e tem capacidade para frascos de 14 a 22 mm ou 22 tubos de 10 a 13 mm de diâmetro. Tubos de ensaios com tampa rosqueável e vedante

para evitar vazamento de solvente, com dimensões de 25 x 200 mm (cerca de 70 ml de capacidade) foram usados no presente experimento, com isto podendo extrair simultaneamente 16 a 20 amostras.

2.1.3. Estufa para secagem e esterilização.



FIGURA 4 – Estufa utilizada para desidratar as amostras de tilápia e mapará.

2.2. Reagentes utilizados



FIGURA 5 – Reagentes usados para extração de LT pelos métodos Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado.

2.3. Obtenção das amostras

As amostras de peixes foram adquiridas em pontos comerciais de Fortaleza – CE. Três amostras de filés congelados sem pele de mapará, *Hypophthalmus edentatus*, cada uma composta de 4 a 5 filés com peso aproximado de 300g, e três amostras de tilápia, cada uma composta por três exemplares, com pesos aproximados de 1,5 Kg para cada exemplar. No Laraq as amostras de tilápia, *Oreochromis niloticus* foram processadas seguindo o fluxograma abaixo para a obtenção dos filés de tilápia sem pele para análises.

2.3.1 Fluxograma para produção de filé de tilápia:

RECEPÇÃO DA MATÉRIA PRIMA



LAVAGEM DO PEIXE



ESCAMAÇÃO



EISCERAÇÃO



RETIRADA DA PELE



RETIRADA DA CABEÇA



RETIRADA DO FILÉ

2.4. Preparo das amostras para análise

No Laboratório de Recursos Aquáticos (LARAq) do Departamento de Engenharia de Pesca da UFC, as amostras individuais de mapará descongeladas e os filés de tilápia foram triturados em multiprocessador doméstico (figura 6) até formar uma pasta bem homogênea, que foi espalhada em fôrmas de folhas de alumínio (tipo quentinha) para serem desidratados em estufa a 105°C durante 24 horas e finalmente trituradas no almofariz e no almofariz com pistilo (figura 6), visando a uniformidade das amostras secas.

As amostras desidratadas usadas nas determinações químicas e extração dos lipídios foram pesadas em balança analítica (Figura 7).



FIGURA 6 – Instrumentos utilizados para homogeneizar as amostras desidratadas.



FIGURA 7 – Balança analítica utilizada para pesar as amostras desidratadas.

2.5. Determinações químicas

2.5.1. UMIDADE – determinada em triplicata, através de secagem em estufa a 105° durante 12 horas (Nagakura, 1972).

2.5.2. LIPÍDIOS TOTAIS – foram extraídos pelo método de Soxhlet, como método de referência, e pelo método de Bligh & Dyer (1959) adaptado pelo uso do homogeneizador de sangue para extração dos lipídios (Bernardino Filho, 2008).

2.5.2.1. Método de Soxhlet

O método de Soxhlet seguindo os procedimentos básicos descritos no manual da TECNAL foi o seguinte:

- 1) Pesar de 2,0 a 4,0 g da amostra seca homogeneizada (item 2.4) dentro de cartuchos de papel filtro comercial.
- 2) Acionar o sistema de refrigeração do aparelho (Figura 1). Ligar a chave geral e programar a temperatura desejada (90°C). Aguardar a estabilização da temperatura.
- 3) Colocar os cartuchos com a amostra no cesto e posicioná-lo no gancho, travando a vareta na parte superior, através da trava da vareta.
- 4) Tarar e numerar os tubos de extração (tubo “reboiler”). Os tubos devem ser tarados depois de limpos e secos em estufa durante 1 hora a 105°C e esfriados em dissecador por 30 min.
- 5) Colocar 100 mL de acetona nos tubos de extração e introduzi-los no bloco de aquecimento.
- 6) Encaixar o tubo recuperador e o tubo extrator verificando sua perfeita vedação.
- 7) Soltar a trava da vareta abaixando o cesto da amostra até que fique mergulhado no solvente, fixando a vareta nessa posição.
- 8) Proceder a extração por 1 hora para amostra de mapará (Figura 8) e 2 horas para amostra de tilápia (Figura 10)

- 9) Após o término da extração por mergulho, soltar a trava da vareta e levantar os cestos até uma altura intermediária onde possa receber o gotejamento do solvente condensado, fixando a vareta nesta posição por 30 minutos.
- 10) Decorrido esse tempo, soltar a trava da vareta e puxá-la para cima até que a vedação de teflon feche a saída do solvente recuperado.
- 11) Aumentar a temperatura para 150°C e fazer a recuperação do solvente, ficando a gordura no tubo “reboiler” e o solvente no tubo recuperador.
- 12) Terminada a recuperação, levantar o conjunto dos tubos até travar na posição superior. Desencaixar os tubos, retirar os cestos e deixar por um tempo os tubos no bloco para que o restante do solvente evapore quase totalmente.
- 13) Colocar os tubos de extração em estufa a 105°C para evaporação total do solvente. Pesquisar o frasco extrator após resfriamento por 30 min. em dessecador. A diferença entre os pesos final e inicial será a quantidade de gordura da amostra.

2.5.2.2. Método de Bligh & Dyer adaptado

O método de Bligh & Dyer adaptado utilizado para amostras secas obedece ao seguinte procedimento:

- 1) Pesquisar entre 2,0 e 4,0 g de amostra finamente homogeneizada;
- 2) Transferir para o tubo de ensaio de 70ml;
- 3) Adicionar exatamente 20 mL de metanol (MeOH), 10 mL de clorofórmio (CHCl₃), 8 mL de água destilada;
- 4) Fixar os tubos no homogeneizador rotativo (Figura 3) e agitar por 50 minutos para as amostras de mapará (Figura 9) e 30 minutos para as amostras de tilápia (Figura 11).
- 5) Retirar os tubos do agitador e adicionar exatamente 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução aquosa de sulfato de sódio 1,5%;
- 6) Agitar vigorosamente por 2 minutos manualmente;
- 7) Filtrar a mistura amostra e solvente em funil Buchner com papel filtro de rápida filtração, usando um Kitassato conectado a uma trompa d'água para acelerar a filtração à vácuo;

- 8) O extrato filtrado foi transferido para uma proveta graduada e deixado em repouso para separação das duas camadas. Anotar o volume da camada clorofórmica e succionar a camada metanólica superior, descartando-a;
- 9) Medir exatamente 5 mL do filtrado e transferir quantitativamente para uma cápsula de alumínio previamente tarada;
- 10) Evaporar o solvente em estufa a 105°C durante 30 minutos, esfriar em dessecador e pesar. Levando em conta o volume da camada clorofórmica e o peso da amostra para expressar a % de LT.

Pode ser visto que no método Soxhlet foi fixado um tempo de uma hora (item 8) para extração dos lipídios na amostra de mapará, *Hypophthalmus edentatus* e duas horas para a amostra de tilápia, *Oreochromis niloticus*. Já pelo método Bligh & Dyer adaptado o tempo estipulado foi de 50 minutos para o mapará, *Hypophthalmus edentatus* e 30 minutos para tilápia, *Oreochromis niloticus* no presente trabalho.

Esse tempo foi definido preliminarmente com base nas curvas de extração lipídios na mapará (Figuras 8 e 9) e tilápia (Figura 10 e 11). A não homogeneidade da amostra interferiu na estipulação do tempo.

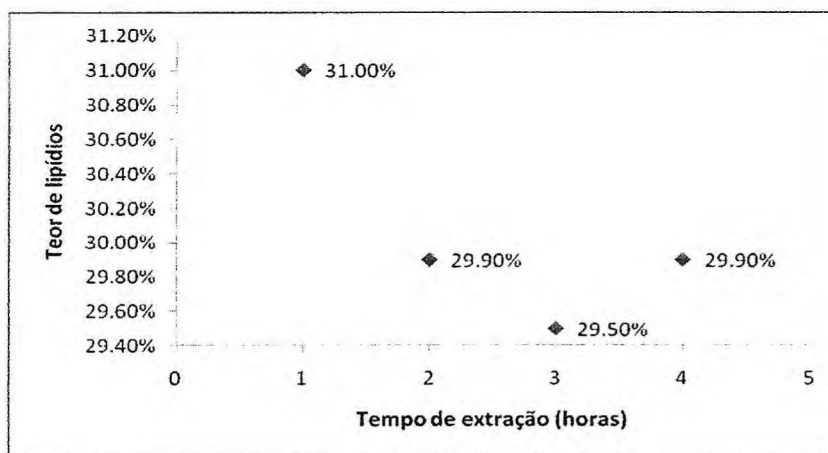


FIGURA 8 – Dados comparativos da extração de lipídios de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) pelo método Soxhlet em diferentes tempos.

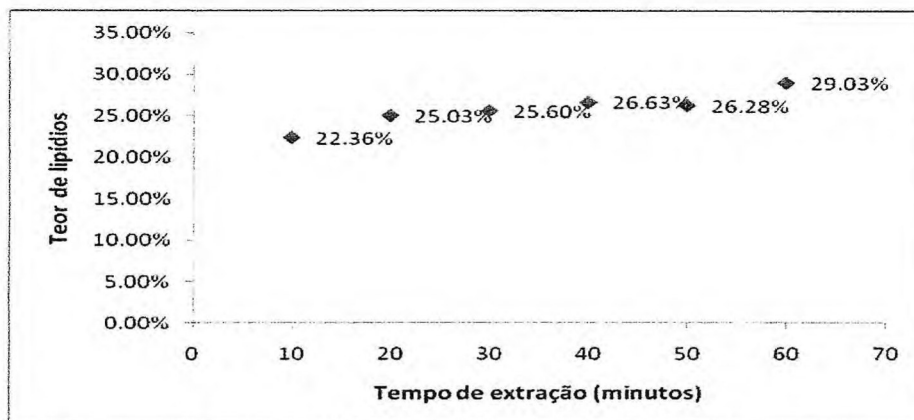


FIGURA 9 – Dados comparativos da extração de lipídios de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) pelo método Bligh & Dyer adaptado em diferentes tempos.

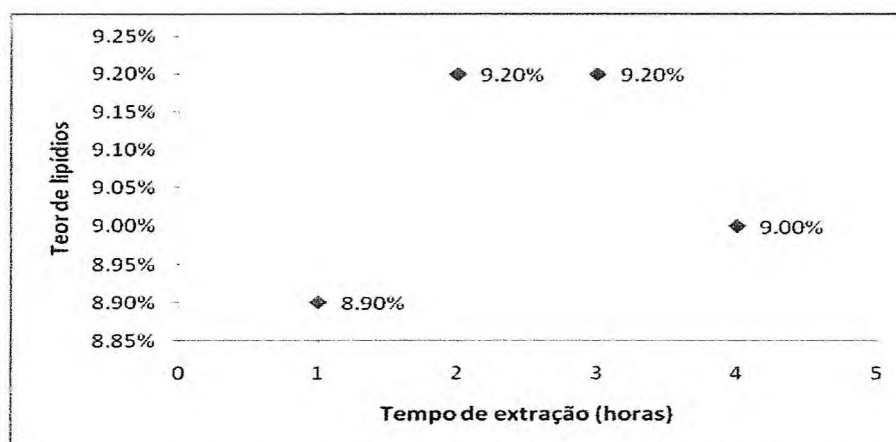


FIGURA 10 – Dados comparativos da extração de lipídios de tilápia (*Oreochromis niloticus*) pelo método Soxhlet em diferentes tempos.

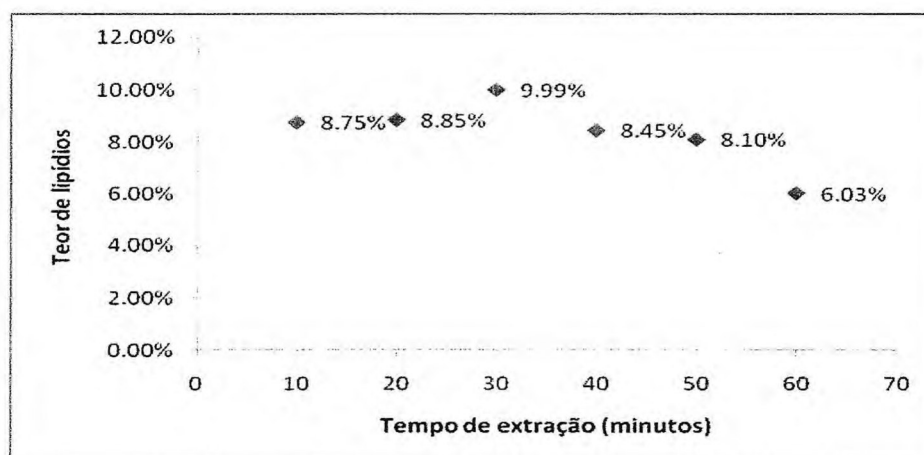


FIGURA 11 – Dados comparativos da extração de lipídios de tilápia (*Oreochromis niloticus*) pelo método Bligh & Dyer adaptado em diferentes tempos.

A análise estatística mostrou que houve diferença significativa, tanto para a amostra de mapará como para a amostra de tilápia com relação aos tempos de extração de LT pelo método Soxhlet e Bligh & Dyer.

A aplicação do teste ANOVA indicou que o melhor tempo de extração de LT para as amostras de mapará pelo método Soxhlet (tabela 1) é de uma hora após esse tempo a extração decresce com media de 30,6% e desvio padrão de 0,6421, pelo Bligh & Dyer (tabela 2) foi de cinquenta minutos com media de 25,6696 e desvio padrão de 3,4850 sendo diferentes estatisticamente entre eles ao nível de 0,05%. Para as amostras de tilápia a melhor extração pelo método Soxhlet (tabela 3) foi tempo de duas horas depois decresce com media de 9,0088% e desvio padrão de 0,4603, pelo Bligh & Dyer (tabela 4) foi de 30 minutos com media 10,28% e desvio padrão de 1,53.

TABELA 1 – Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais do Mapará pelo método de Soxhlet.

Fonte de Variação	SQ	GL	QM	F	Valor- P	F crítico
Entre grupos	0,018	1	0,018	0,0378	0,8458	5,99
Dentro dos grupos	2,868	6	0,478			
Total	2,886	7				

SQ = soma de quadrados, GL = grau de liberdade, QM = quadrado médio, F = valor calculado, Valor - P = probabilidade obtida, F crítico = valor tabelado.

TABELA 2 – Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais do Mapará pelo método de Bligh & Dyer adaptado.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	Valor- P	F crítico
Entre grupos	9,670	1	9,670	1,1018	0,3179	4,96
Dentro dos grupos	87,128	10	8,713			
Total	96,828	11				

SQ = soma de quadrados, GL = grau de liberdade, QM = quadrado médio, F = valor calculado, Valor - P = probabilidade obtida, F crítico = valor tabelado.

TABELA 3 – Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais do tilápia pelo método de Soxhlet.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	Valor- P	F crítico
Entre grupos	13,0	1	13,0	0,0596	0,8075	5,32
Dentro dos grupos	0,002	8	22,6			
Total	13,002	9				

SQ = soma de quadrados, GL = grau de liberdade, QM = quadrado médio, F = valor calculado, Valor - P = probabilidade obtida, F crítico = valor tabelado.

TABELA 4 – Teste ANOVA para curva de extração de lipídios totais de tilápia pelo método de Bligh & Dyer adaptado.

Fonte de Variação	SQ	GL	MQ	F	Valor- P	F crítico
Entre grupos	0,107	1	0,107	0,0235	0,8757	4,96
Dentro dos grupos	45,650	10	4,565			
Total	45,757	11				

SQ = soma de quadrados, GL = grau de liberdade, QM = quadrado médio, F = valor calculado, Valor - P = probabilidade obtida, F crítico = valor tabelado.

2.6. Análise estatística

Os resultados comparativos entre os métodos de extração foram analisados estatisticamente empregando-se o teste “t” de STUDENT bilateral, com nível de significância de 0,005 (MENDES, 1999). Os dados da curva de extração dos LT pelo método de Bligh & Dyer adaptado e Soxhlet foram analisados estatisticamente pela análise de variância ANOVA (um critério). Em caso de rejeição da hipótese (H_0), as médias serão comparadas utilizando o teste de Tukey, com nível de significância de 5%, realizados conforme Centeno (1999) e Montgomery (1976).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Comparação do método de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado com amostras de tilápia e mapará desidratados.

Os resultados quantitativos sobre a extração de lipídios totais (LT) de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e mapará (*Hypophthalmus edentatus*) usando os métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado estão mostrados na Tabela 5.

TABELA 5 – Quantificação percentual de lipídios em filé de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) desidratados extraídos pelos métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado.

Amostra	Tilápia		Mapará	
	Método de Soxhlet	Método de Bligh & Dyer	Método de Soxhlet	Método de Bligh & Dyer
1	12,18 ^a	11,29 ^a	51,95 ^a	53,03 ^a
2	7,66 ^a	7,22 ^a	55,34 ^a	50,23 ^a
3	7,16 ^a	5,86 ^b	52,34 ^a	48,68 ^a
Média	9,00 ± 2,76	8,12 ± 2,82	53,21 ± 1,85	50,65 ± 2,21

A análise estatística (tabela 6) mostrou que houve uma diferença significativa ($P > 0,05$) na comparação entre os teores de lipídios extraídos pelos métodos de Soxhlet (método de referência) e de Bligh & Dyer adaptado em apenas na amostra 3 de tilápia. Já para as amostras de mapará a análise estatística (tabela 7) não apresentou diferenças significativas ($P < 0,05$) entre os teores de lipídios extraídos pelos dois métodos apresentados, podendo assim, concluir que é possível usar o homogeneizador de sangue para extração de lipídios nas amostras investigadas.

TABELA 6 – Teste “t” de STUDENT comparando a extração de lipídios totais de tilápia pelo método de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado.

Amostra	Tratamento	Média	Variância	n	GL	S^2_P	T	T crítico
1	Soxhlet	12,1875 ^a	0,8594	2	3	0,3949	1,5687	5,841
	Bligh & Dyer	11,2875 ^a	0,1627	3				
2	Soxhlet	7,6595 ^a	0,0106	3	4	10,46	1,6639	4,604
	Bligh & Dyer	7,2200 ^a	0,1987	3				
3	Soxhlet	7,1532 ^a	0,1146	3	4	0,1445	4,1664	4,604
	Bligh & Dyer	5,8600 ^b	0,1744	3				

^a = não há diferença entre as médias, ^b = há diferença entre as médias, n = n° de amostras, GL = grau de liberdade, S^2_P = variância ponderada, T = valor calculado, T crítico = valor tabelado.

TABELA 7 – Teste “t” de STUDENT comparando a extração de lipídios totais de mapará pelo método de Soxhlet e Bligh & Dyer adaptado.

Amostra	Tratamento	Média	Variância	N	GL	S^2_P	T	T crítico
1	Soxhlet	51,9507 ^a	0,1436	3	4	2,1869	-0,8959	-4,604
	Bligh & Dyer	53,0324 ^a	4,2303	3				
2	Soxhlet	55,3367 ^a	0,1240	3	2,04	3,7305	2,6438	9,025
	Bligh & Dyer	50,2303 ^a	11,0673	3				
3	Soxhlet	53,3400 ^a	1,9804	3	3	3,5065	2,1416	5,841
	Bligh & Dyer	48,6791 ^a	6,5587	2				

^a = indica que não há diferença entre as médias, ^b = indica que há diferença entre as médias, n = n° de amostras, GL = grau de liberdade, S^2_P = variância ponderada, T = valor calculado, T crítico = valor tabelado.

Confirmando os resultados de Bernardino Filho (2008) nota - se que os teores médios de lipídios totais (tabela 6) na tilápia pode ser considerado como um peixe de baixo teor de lipídios, enquanto que o mapará trata-se de um peixe de alto teor de lipídios, utilizando amostras in natura. Isto também pode ser comprovado pelo aspecto das amostras desidratadas.

Este resultado mostra que o método de Bligh & Dyer adaptado na presente pesquisa apresenta uma grande expectativa de poder ser usado para

extração de lipídios em peixes, tanto para espécies com baixos teores, quanto para espécies com altos teores de lipídios.

O método de extração com o homogeneizador também pode ser avaliado positivamente através de comparação de resultados para tilápia divulgados em várias pesquisas nacionais.

No Brasil, teores médios de 1,2% de LT para o filé cru (base úmida) foram relatados por Caúla (2003) e Ferreira et al. (2007), usando, respectivamente, o método de extração de Bligh & Dyer (1959) e o método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), enquanto Simões et al. (2007) encontraram um valor médio de 2,60% \pm 0,35 no filé submetido à extração pelo método de Bligh & Dyer (1959).

Como os dados do presente trabalho estão em base seca transformamos para base úmida e comparamos com os dados da literatura acima citado, os resultados médios nas amostras de tilápia pelo método Bligh & Dyer foi de 1,7% de LT em base úmida e de 1,9% de LT pelo Soxhlet; nas amostras de mapará pelo Bligh & Dyer foi de 14,6% de LT e no Soxhlet foi 15,3% de LT. Perante estes dados reforçamos a tese de poder usar o agitador de tubos pelo método Bligh & Dyer (1959).

O mapará, *Hypophthalmus edentatus* (Spix, 1829) uma espécie de peixe da ordem Siluriformes (catfish ou bagre) encontrado no Brasil nos rios e reservatório do Tucuruí na bacia amazônica, na região Sul, no rio Paraná e reservatório de Itaipu e nos rios do Centro-Oeste (COSTA, 2006; HAHN et al., 2008; BIALETZKI et al., 2005) é mostrado na Figura 12.



FIGURA 12 – Mapará, *Hypophthalmus edentatus* (Spix, 1829) (Cortesia de Lovshin, L.L. <http://www.fishbase.org/Photos/PicturesSummary.php?ID=4533&what=species>).

Trata-se de um peixe pouco pesquisado, contudo através de pesquisa bibliográfica intensiva em periódicos e internet foram encontradas as seguintes referências (JUNK, 1985; OLIVEIRA et al., 2003; INHAMUNS & FRANCO, 2008; RIBEIRO et al., 2008).

De acordo com Junk (1985), o teor de LT do mapará da Amazônia sofre grande influência sazonal em função do período de enchente e vazante dos rios amazônicos, com valores oscilando entre 3% a 32%, extraído com tetracloreto de carbono pelo método de Soxhlet. Ainda por este método, Costa (2006) relatou um teor médio de 21,2% extraído com éter de petróleo. Outros autores usando o método de Bligh & Dyer (1959) encontraram teores de LT variando de 15 a 21% (OLIVEIRA et al., 2003; INHAMUNS & FRANCO, 2008; RIBEIRO et al., 2008). Para Oliveira et al. (2003) existe diferença nos teores de LT entre machos (18,73%) e fêmeas (14,27%).

Pelas informações constantes no rótulo do mapará analisado nesta monografia constata-se que as amostras procederam da região amazônica e tiveram um teor médio de 14,55% de LT (Bligh & Dyer adaptado) e de 15,27% de LT (Soxhlet), estando, portanto, próximos dos valores relatados na literatura. Estes resultados reforçam a aplicabilidade do uso do agitador de tubos para extração de lipídios em peixes gordos como o mapará.

Com o intuito de comparar os resultados do teste de umidade do presente trabalho com os valores de Bernardino Filho (2008) que utilizou o tempo de quatro horas (NAGAKURA, 1972) obtendo os valores médios de 76,74% para as amostras de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e 73,41% para o mapará (*Hypophthalmus edentatus*), sendo que neste trabalho utilizamos o tempo de 12 horas em estufa a 105°C, os resultados estão disposto nas tabelas 8 e 9.

TABELA 8 – Resultado do teor de umidade das três amostras mapará

AMOSTRA	1	2	3	MÉDIA (%)
UMIDADE	69,65	70,81	73,52	71,33

TABELA 9 – Resultado do teor de umidade das três amostras tilápia

AMOSTRA	1	2	3	MÉDIA (%)
UMIDADE	77,63	79,21	79,19	78,68

Com base nos resultados das tabelas 8 e 9 pode – se concluir que apesar do tempo de exposição na estufa ter sido superior não houve diferenças quanto as medias do teor de umidade comparado aos resultados de Bernardino Filho (2008).

3.2. Métodos de extração de lipídios em pescado: Dados de literatura.

Um método para determinar gordura e as concentrações de pigmento do salmão com base nos métodos visível e infravermelho próximo (VIS / NIR) medida de espectroscopia de peixe / inteiro e em filetes, e por meio de fotografia digital (DP) de filés foi utilizado por Folkestad (2008). Dos peixes foram utilizadas duas populações de salmão do Atlântico (*Salmo salar* L.), constituído por 46 salmões em média 0,7kg (faixa 0,17-1,7kg, grupo S), e 30 salmões em média de 2,3 kg (variação de 1,4-4,1kg, Grupo L). As análises químicas de teor de gordura e pigmentos foram obtidas por tomografia computadorizada, LT (teor de gordura) foram utilizados como métodos de referência. Grupo L foi analisado no estado vivo (VIS/NIR), após a evisceração (VIS / NIR e LT), e como filetes (VIS / NIR e DP). Grupo S foi analisado no estado eviscerado (VIS / NIR) e em filetes (VIS / NIR e DP). Os autores chegaram ao seguinte resultado. No VIS os espectros apresentam uma mudança sistemática na região de 550nm, que indica que os peixes altamente pigmentados têm uma absorção mais acentuada na direção comprimentos de onda menor do que os peixes com menores níveis do pigmento no músculo. Nos espectros NIR o pico de absorção de água importante pode ser visto em torno de 980nm. A gordura tem um pequeno pico de absorção a 930nm, resultando em uma maior absorção na região espectral de peixes com maior muscular teor de gordura.

Um método envolvendo a combinação dos métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer foi usado para determinar a composição química, conteúdo de minerais e

os perfis de aminoácidos e ácidos graxos foram analisados em ossos de peixes provenientes de oito diferentes espécies de peixes (salmão, truta, arenque pequeno, cavala, bacalhau, verdinho, carapau e grandes arenque) a composição química variou significativamente, e os autores perceberam que principal diferença foi quanto ao teor de lipídios variando de 23g / kg de bacalhau (*Gadus morhua*) a 509g / kg de cavalas e sardinhas (*Scomber sp.*). O autor Toppe (2006) não relatou o procedimento das extrações de LT. Em geral, as espécies de peixes gordurosos apresentavam níveis mais elevados de lipídios em comparação com os ossos espécies de peixes magros. Do mesmo modo, níveis mais baixos de proteína e cinzas foram observados em ossos de espécies de peixes gordos. As amostras de peixes utilizados neste trabalho foram coletadas ao longo no litoral norueguês. Os resultados mostraram que a composição química do osso de peixes difere significativamente no nível de proteínas, lipídios e cinzas entre as espécies, sendo mais pronunciada a diferença no nível de lipídios nos ossos do pescado. Os peixes gordos, salmão, truta, arenque e cavala, que armazenam lipídeos no músculo, têm um maior teor de lipídios nos ossos ($318 \pm 101\text{g / kg}$, $n = 8$), em comparação com os peixes magros; bacalhau badejo, sardinha ($20,6 \pm 16,0\text{g / kg}$, $n = 5$), que armazenam lipídios no fígado. Diferença significativa no nível de lipídios também foi observada no salmão. Como consequência natural peixes magros mostraram os mais altos níveis de cinzas e proteína. Os lipídios absorvidos pela superfície óssea poderiam explicar em parte a diferença, no entanto Lee et al. (1975) relataram níveis ainda mais elevados de lipídios em ossos de peixe a partir de três diferentes espécies de peixes marinhos. Níveis de lipídios na alimentação dos animais são mostrados ao intervalo 1 - 27% (Johns, 1977). A diferença no rendimento de extração utilizando extração Soxhlet apolar em comparação com o Bligh & Dyer mais polar mostra na extração uma variação ($1,6 - 37,7\text{g / kg}$), indicando que o nível de lipídios polares (fosfolipídios, por exemplo), é um pouco diferente.

O método de Soxhlet, considerado como padrão por Katikou & Robb (2001) foi comparado com um método de extração rápida (8min por amostra) denominado método CEM, um sistema automático computadorizado para determinação simultânea de LT e água, utilizando secagem com microondas para umidade, seguida da extração dos LT com o solvente DCM. O método

CEM apresentou resultados bastante acurados para amostras individuais, gastando aproximadamente 8 min por amostra. Amostras de salmão com teores de LT variando de 2,0 a 25,4% foram investigadas. A comparação destes métodos mostrou uma correlação linear significativa, mas o método CEM foi consistentemente mais baixo que o padrão por um fator de 0,37%, principalmente para amostras com teores inferiores a 10%. Finalmente foi concluído que o método CEM foi efetivamente mais rápido para uso sob condições comerciais, enquanto que, para propósito de pesquisa, um fator de correção adicional deverá corrigir o método CEM para níveis abaixo de 10%.

Método baseado na extração assistida por microondas (MAE) foi desenvolvido para extrair lipídios de peixe para a determinação da composição de ácidos graxos. Segundo Brisbin & Caruso o MAE foi realizado com um aparelho de extração em aberto dentro do navio semelhante ao sistema de Soxhlet. O solvente foi uma mistura de equivalente volume de acetato de etila, álcool etílico, e hexano. As fórmulas de um solvente ternário azeótropo com a água, onde água é separada após re-condensação em uma armadilha contendo água. Com esta técnica, a extração pode ser realizada sem pré-secagem dos tecidos do peixe. Após a extração lipídica é realizado uma esterificação com hidróxido de trimetilsulfônio (TMSH) e os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) que foram determinados por GC / FID. Os resultados foram comparados com os obtidos após a extração de líquido - líquido de acordo com o método Bligh e Dyer. Foram utilizados como amostras filés de cavala (*Scomber scombrus*) e fígado de bacalhau (*Gadus morhua*). O autor chegou aos seguintes resultados: que o teor de lipídios obtido após MAE foi ligeiramente superior ao obtido com o método Bligh & Dyer. As vantagens do MAE versus Bligh & Dyer é que ambos os métodos de extração mostraram boa reprodutibilidade, mas MAE tem a vantagem de usar menos material e solvente. Além disso, os solventes aplicados em outros métodos são mais tóxicos e no MAE não, portanto, menos poluente. Outra vantagem é que menos tempo são exigidos (40min x 160min para uma amostra), e MAE é mais fácil de executar com várias amostras em paralelo. Uma desvantagem adicional do o método de Bligh & Dyer é que o teor de água tem uma grande influência na precisão dos resultados e cuidado especial deve ser colocado em condições

ótimas. Com a técnica do MAE, no entanto, a água não teve influência nos resultados. Sendo um método adequado para a extração de lipídios.

3.3. Informações complementares sobre o método de Soxhlet.

Este método é considerado 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; KATIKOU & ROBB, 2001; MANIRAKIZA et al., 2001; RONALD & BARNETT, 2003; VOGT et al., 2002).

A carne bovina *in natura* (método 960.39) e ração animal (método 920.39) as recomendações da AOAC (1990) envolvem o uso de éter de petróleo ou éter etílico anidro para extração de gordura bruta em amostra seca. Para desidratação, a amostra deve ser misturada com areia e posterior secagem em estufa a 100 – 120°C durante 6 horas ou a 125°C por 90 minutos. A extração propriamente dita deve ser realizada durante um período de tempo variando de 4 a 6 horas, dependendo da taxa de condensação.

Para pescado, a AOAC (1990) descreve o método de hidrólise ácida seguida de extração da gordura com éter de petróleo (ponto de ebulição <60°C) no frasco Mojonnier (método 948.15) ou o método rápido de Babcock modificado (método 964.12). A extração com acetona (método 948.16) também é descrita pela AOAC (1990) para farinha de peixe. Por serem trabalhosas e demoradas, devido á necessidade de realizar umas hidrólises ácidas e várias outras manipulações da amostra antes de iniciar a extração que dura 16 horas, estes métodos têm sido pouco citados em pesquisas na área de pescado.

Alternativamente aos métodos da AOAC, existe o procedimento descrito por Nagakura (1972) que é menos trabalhoso, pois a amostra pode ser secada na estufa sem a necessidade de ser misturada com areia. A gordura é extraída com éter etílico durante 16 horas.

3.4. Informações complementares sobre o método Bligh & Dyer para extração de lipídios em pescado.

O método de Bligh & Dyer foi publicado em 1959, tendo como título “um método rápido para extração e purificação de lipídios totais” que foi desenvolvido com o intuito de acompanhar as alterações lipídicas em peixes congelados. O procedimento completo pode ser realizado em cerca de 10 minutos. Para tanto, usa-se também uma mistura de dois solventes, clorofórmio e metanol, na proporção de 1:2. Além disso, a quantidade de água tissular presente nas amostras de peixes deve ser rigorosamente levada em conta no estabelecimento das proporções dos solventes visando à extração efetiva dos lipídios totais. Uma das vantagens desse método é formação de um sistema bifásico a partir das proporções de solventes adicionais durante o processo de extração. A formação desse sistema bifásico está baseado na teoria líquido – líquido de três componentes (clorofórmio/metanol/água).

A determinação das solubilidades de cada componente pode ser avaliada através de um diagrama ternário de solubilidade de dois líquidos parcialmente miscíveis entre si (clorofórmio e água) com um terceiro (metanol), completamente miscível nos outros dois. Nos últimos anos diversos pesquisadores realizaram trabalhos em que o objetivo foi encontrar o método mais eficiente para a obtenção da fração lipídica desejada e determinar sua composição. Além disso, também buscaram métodos que não alterassem a qualidade do óleo e utilizassem solventes menos tóxicos que a mistura clorofórmio e metanol. No entanto, devido à alta eficiência que este sistema apresenta na extração de lipídios polares e apolares, nenhuma mistura alternativa testada recentemente tem obtido o êxito esperado, ou seja, uma eficiência equivalente ao sistema que utiliza um solvente clorado.

Segundo Cecchi o método tem uma série de vantagens em relação à extração a quente:

- Extrai todas as classes de lipídios, inclusive os polares que representam um alto teor em produtos de trigo e soja e são importantes para avaliações dietéticas.

- Os lipídios são extraídos sem aquecimento e os extratos podem ser utilizados para avaliação de deterioração dos lipídios através dos índices de

peróxidos e ácidos graxos livres, além da determinação do teor de carotenóides, vitamina E, composição de ácidos graxos e esteróis.

- Pode ser utilizado em produtos com altos teores de umidade, além dos produtos secos.

- A determinação completa pode ser realizada em tubos de ensaio não necessitando de equipamentos especializados e sofisticados.

4. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos nas análises utilizando os métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer (1959) adaptado utilizando o agitador de tubos não foi observado diferença estatisticamente significativa em relação ao total de lipídios extraídos de todas as amostras analisadas, exceto em uma das amostras de tilápia.

Em relação ao tempo de extração no método de Bligh & Dyer (1959) adaptado, o tempo de duas horas foi suficiente para extração dos lipídios para as amostras de tilápia e uma hora para as amostras de mapará.

O método de Bligh & Dyer (1959) adaptado com o agitador de tubos apresentou maior praticidade e menor tempo de extração quando comparado com o método de Soxhlet.

O método Bligh & Dyer adaptado foi eficiente tanto na extração de LT em amostras com baixos teores de lipídios, quanto em amostras com altos teores de lipídios.

Os valores médios de LT extraídos das amostras analisadas são compatíveis com os resultados encontrados na literatura.

O método de Soxhlet ainda é considerado o mais eficiente para extração de lipídios.

O tempo de exposição na estufa para retirar toda a água foi superior ao da literatura 12 horas, e concluímos que apesar do tempo de exposição na estufa ter sido superior não houve diferenças quanto às médias do teor de umidade comparado aos resultados de Bernardino Filho (2008).

Os dados obtidos na extração dos LT no presente trabalho foram transformados para base úmida e comparados com os resultados de outros autores não havendo muita diferença e reforçando a idéia de que o agitador de tubos pode ser usado para a extração de LT.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Official Methods of Analysis. K.Helrich (ed.). **Association of Official Analytical Chemists**, Inc., Arlington, 1990, 15th. ed., v. 2, p.871 – 872.

BIALETZKI, A.; NAKATANI, K.; SANCHES, P.V.; BAUMGARTNER, G.; GOMES, L.C. **Larval fish assemblage in the Baía River (Mato Grosso do Sul State, Brazil): temporal and spatial patterns.** *Environmental Biology of Fishes*, v.73, n.1, p.37–47, 2005.

BERNARDINO FILHO, M.O.O. **Determinação de lipídios em pescado: Avaliação do agitador de tubos do tipo homogeneizador de sangue na extração de lipídios.** 2008, 38p. Monografia (Graduação em Engenharia de pesca) – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. **A rapid method of total lipid extraction and purification.** *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, 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 extraction methods.** *Journal Agricultural Food Chemistry*, v.46, p.4214-4217, 1998.

BRUM, A. A. S. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica.** 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Departamento de Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

BRISBIN & CARUSO. **Comparison of extraction procedures for the determination of arsenic and other elements in lobster tissue by inductively coupled plasma mass spectrometry.** University of Cincinnati.

CAÚLA, F.C.B. **Determinação de colesterol e avaliação nutricional de algumas espécies de pescado do Estado do Ceará.** 2003. 99f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Pesca) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2003.

CENTENO, A.J. **Curso de estatística aplicada à biologia.** 2^a Ed., Goiânia: Da UFB, 1999. 234p.

Cecchi, Heloísa Máscia. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos.** Editora da Unicamp.

COSTA, T.V. **Identificação de novas espécies com potencial para a criação em cativeiro: pescado capturado no estado do Amazonas.** 2006. 65f. Dissertação (Pós-Graduação em Zootecnia, Produção Animal), Instituto de Zootecnia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2006.

FERREIRA, M.W.; BRESSAN, M.C.; SOUZA, X.R.; VIEIRA, J.O.; FARIA, P.B.; ANDRADE, P.L.. **Efeito dos métodos de cocção sobre a composição química e perfil lipídico de filés de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* Linnaeus 1757)**. Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.31, n.3, p.798 – 803, 2007.

FOLKESTAD A.; Wold P. J. **Rapid and non-invasive measurements of fat and pigment concentrations in live and slaughtered Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)**, 2008, Aquaculture 280 (2008) 129–135.

HAHN, N.S; FUGI, R.; PERETTI, D.; RUSSO, M. R.; LOUREIRO-CRIPPA, V.E. **Estrutura Trófica da Ictiofauna da Planície de Inundação do alto Rio Paraná**. In: **A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná**. Relatório Anual 2002. Disponível em: <http://www.peld.uem.br/Relat2002/pdf/comp_biotico_estruturaTrofica.pdf > Acesso em: 07 nov. 2008.

HORNER, W.F.A. **Preservation of fish by curing (drying, salting and smoking)**. In: Hall, G.M. (Ed.) **Fish Processing Technology 1ª ed.**, London: Chapman & Hall, 1992, p. 31 – 71.

INHAMUNS, A.J.; FRANCO, M.R.B.. **EPA and DHA Quantification in two species of freshwater fish from Central Amazonia**. Food Chemistry, v.107, n.2, p.587 – 591, 2008.

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

JUNK, W.J. **Temporaty fat storage, an adaptation of some fish species to te waterlevel fluctuations and related environmental changes of the Amazon river**. Amazoniana, v.IX, n.3, p.315-351, 1985.

KATIKOU, P.; ROBB, D.H.F. **Evaluation and composition of the CEM rapid extraction method with official standard methods for the determination of lipid content in fillets of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*)**. Aquaculture, v.194, v.1-2, 99 – 105, 2001.

LEE, C.M.; TREVINO, B.; CHAIYAWAT, M. **A simple, rapid extraction method for determination of total lipids in fish tissue**. Proceedings of the 18th Annual Tropical and Subtropical Fisheries Technological Conference of the Americas. August 20 – September 1, Williamsburg, Virginia, US, p.337-343, 1993.

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 Food Composition Analysis, v.14, n.1, p.93-100, 2001.

MONTGOMERY, D.C. **Desing and analysis of experiments**. New York: Institute of Technology, 1976, 418p.

MENDES, P.P. **Estatística aplicada à aqüicultura**. Recife, Bagaço, 1999. 265p.

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

OLIVEIRA, E. R. N., AGOSTINHO, A. A.; MATSUSHITA, M. **Effect of biological variables and capture period on the proximate composition and fatty acid composition of the dorsal muscle tissue of *Hypophthalmus edentatus* (Spix, 1829)**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.46, n.1, p.105 – 114, 2003.

RIBEIRO, S.C.A.; PARK, K.J.; HUBINGER, M.D.; RIBEIRO, C.F.A.; ARAUJO, E.A.F.; TOBINAGA, S. **Otimização da desidratção osmótica de filés de mapará (*Hypophthalmus edentatus*) através da metodologia de superfície de resposta**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.28, n.2. p.485 – 492, 2008.

RONALD, B.J.; BARNETT, H.J. **Determination of fat content in fish feed by supercritical fluid extraction and subsequent lipid classification of extract by thin layer chromatography-flame ionization detention**. Aquaculture, v.3, n.216, p.1-4, p.263-282, 2003.

SIMÕES, M.R.; RIBEIRO, C. F.A.; RIBEIRO, S.C.A.; PARK, K.J.; MURR, F.E.X. **Composição físico-química, microbiológica e rendimento do filé de tilápia tailandesa (*Oreochromis niloticus*)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v.27, n.3., p.608 – 614, 2007.

STRONG, F.M.; KOCH, G.H. **Biochemistry Laboratory Manual**. Wm. C. Brown Company Publishers, Iowa, 1981, 3rd ed., p.155.

TECNAL. **Manual de instruções Determinador de gordura**. CD-ROM. TECNAL – Equipamentos para laboratório Ltda. Piracicaba, São Paulo. (s.d)

TOPPE J. **Chemical composition mineral content and amino acid and lipid profiles in bones from various fish species**. 2006. Science.

VOGT, A.; GORMLEY, T.R.; DOWNEY, G.; SOMERS, J. A. **Comparison of selected rapid methods for fat measurement in fresh herring (*Clupea harengus*)**. Journal Food Composition Analysis, v.15, n.2, p. 205 – 215, 2002.