

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Otimização da extração de lipídeos, via mistura ternária hexano-
etanol- água, de matriz composta de resíduos do processamento
de tilápias**

Joseanne Rodella Rodrigues

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência e
Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2016**

**Joseanne Rodella Rodrigues
Cientista dos Alimentos**

**Otimização da extração de lipídeos, via mistura ternária hexano- etanol- água,
de matriz composta de resíduos do processamento de tilápias**

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientadora:
Profa. Dra. **MARISA APARECIDA BISMARA REGITANO D'ARCE**

Co-orientadora:
Profa. Dra. **MARÍLIA OETTERER**

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2016**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Rodrigues, Joseanne Rodella

Otimização da extração de lipídeos, via mistura ternária hexano- etanol- água, de matriz composta de resíduos do processamento de tilápias / Joseanne Rodella Rodrigues. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2016. 87 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Solventes 2. Misturas ternárias 3. Resíduos da filetagem de tilápia 4. Óleo de pescado I. Título

CDD 664.94
R696o

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Rodrigues e Maria Santana Rodella Rodrigues por me incentivarem e investirem na minha educação. Pelo amor incondicional e todos os sacrifícios e renúncias feitas ao longo de suas vidas e por sempre estarem presentes em todos os momentos.

À minha admirável orientadora Profa. Dra. Marisa A. B. Regitano d'Arce, pela acolhida no momento em que eu mais precisei de orientação, ensinamento, confiança, carinho e amizade.

À minha admirável co-orientadora Profa. Dra. Marília Oetterer, a quem tenho muito carinho, obrigada pelo afeto, dedicação e contribuições valiosas para a melhoria deste trabalho.

À querida amiga Naiane Sangaletti Gerhard, pela ajuda, dedicação, companheirismo e amizade. Sem ela o trabalho não seria efetuado em tempo. Suas longas conversas contribuíram largamente para o meu aprendizado, sendo fatores primordiais para o meu sucesso.

Ao Prof. José de Ribamar Macedo Costa, pela excelente co-orientação, paciência e competência nas resoluções dos problemas encontrados no decorrer desta tese.

À minha irmã Camila Rodella Rodrigues, pelo companheirismo, amizade, dedicação e amor.

Ao meu namorado Luís Fernando Vieira Nunes Freire, que sempre esteve do meu lado. Seus cuidados, amor, carinho, paciência e companheirismo contribuíram para que os dias se tornassem menos turbulentos.

À minha querida terapeuta, Josiane Marangoni, pela paciência e pelas longas conversas que contribuíram largamente ao meu equilíbrio mental e energia.

À minha amiga Larissa Bueno, que ajudou na interpretação de dados. Obrigada pelo carinho, paciência e dedicação.

À gloriosa Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" responsável pela minha graduação e pós-graduação.

À Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro para realizar este trabalho.

À FEALQ – Fundação de Estudos Agrários Luiz de Queiroz, pelo auxílio financeiro.

À equipe do Getep, pelo apoio e auxílio laboratorial, além da amizade e descontrações vividas nestes dois anos e meio.

Aos colegas de Laboratório de Óleos e Gorduras, pelo apoio em laboratório e amizade.

Aos meus amigos Brazilit (Mateus Quelhas) e Concha (Mariana Chiarini), por percorrerem essa trajetória comigo. Agradeço carinhosamente a disposição e ajuda.

À minha querida e mais que amiga Luciana Higa (Sis) por quem tenho muito amor, carinho e admiração. Seu apoio, amizade, generosidade e carinho foram muito importantes durante essa trajetória.

À minha querida amiga Elizângela Falcão, pela amizade e todo apoio durante esse período.

A todos os amigos que contribuíram de alguma forma, e também aos amigos que deixei para trás em busca de um sonho e que mesmo de longe me apoiaram e me deram muito carinho.

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Pesca, aquicultura, produção e consumo	13
2.1.1 A Tilápia	15
2.2 Resíduos gerados pela indústria pesqueira	16
2.2.1 O óleo de pescado como produto comercial	19
2.3 Lipídeos	20
2.3.1 Definição	20
2.3.2 Lipídeos do pescado	22
2.3.3 Fração lipídica da tilápia	25
2.3.4 Extração dos lipídeos	27
2.3.5 Métodos de extração	28
2.3.6 Utilização de solvente nos processos de extração	31
2.3.7 Equilíbrio líquido-líquido de três componentes	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.1 Coleta dos peixes e preparo dos resíduos	37
3.2 Preparo e caracterização da matriz para as análises	37
3.3. Métodos	38
3.3.1. Umidade	38
3.3.2 Extração de lipídeos pelo método de Soxhlet	38
3.3.3 Extração de lipídeos pelo o método de Bligh & Dyer	39
3.3.4 Extração de lipídeos com o método de Hara & Radin	40
3.4 Rendimento da extração das soluções propostas	41
3.5 Dados de equilíbrio	41
3.5.1 Construção das curvas de solubilidade	41
3.5.2 Obtenção das Curvas Binodais	42
3.5.3 Construção das curvas de solubilidade da mistura hexano- etanol-água	44
3.6. Determinação dos lipídeos por CCD	47
3.7 Análise Estatística	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Caracterização dos resíduos	49
4.3. Extração do óleo com os sistemas de solventes selecionados	50
4.4 Separação das classes lipídicas extraídas dos resíduos por CCD	57
5 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE	83

RESUMO

Otimização da extração de lipídeos, via mistura ternária hexano- etanol- água, de matriz composta de resíduos do processamento de tilápias

Determinar o conteúdo dos lipídeos presentes nos tecidos animais nem sempre resulta em uma resposta com precisão, devido á pouca disponibilidade de métodos adequados para a extração e determinação quantitativa destes lipídeos. A extração de lipídeos de matrizes complexas, como o pescado, por meio dos métodos tradicionais de Bligh & Dyer e Folch normalmente utilizam solventes com elevada toxicidade, cujos resíduos podem gerar um elevado impacto ambiental. A chamada segurança química está diretamente ligada à qualidade de vida e alerta para as questões de controle e prevenção dos efeitos adversos dos solventes ao ser humano e ao ambiente, compreendendo desde a extração, uso e descarte desses e seus resíduos. Portanto, o objetivo deste trabalho foi estudar as condições de extração de lipídeos totais de resíduos do processamento de tilápias, visando à proposição de um método alternativo que garanta uma eficiência tão satisfatória quanto as obtidas pelos métodos tradicionais de extração. Ademais, foi desenvolvido um método de extração mais seguro ao ambiente utilizando solventes menos tóxicos que os propostos pelo método de Bligh & Dyer, por meio da aplicação experimental de um diagrama de fases hexano- etanol- água. Após a identificação da melhor combinação de solventes, os extratos obtidos com hexano- etanol apresentaram rendimento eficiente em lipídeos totais e capacidade de extrair os componentes lipídicos polares e apolares das amostras analisadas. O melhor aproveitamento dos lipídeos a serem extraídos da matriz resíduos de peixes na proporção em massa de solvente hexano: etanol: água, foram da solução 1 (1: 7: 1,375) para a carcaça, da solução 2 (1: 2,5: 1,1875) para a cabeça e da solução 4 (4: 1: 4,375) para as vísceras totalizando 14,13%, 14,69 e 47,63% de teor de lipídeos, respectivamente. Logo, ao buscar sistemas de solventes alternativos ao clorofórmio - metanol, para extrair lipídeos de resíduos do processamento de tilápias, foi possível identificar as melhores proporções de hexano: etanol: água como substituição do método tradicional proposto por Bligh & Dyer (1959)

Palavras-chave: Solventes; Misturas ternárias; Resíduos da filetagem de tilápia; Óleo de pescado

ABSTRACT

Optimization of lipid extraction, with hexane- ethanol- water in a matrix composed of waste processing of tilapia

The total lipid content of animal tissues is not always accurately measured due to the lack of adequate methods for lipid extraction and quantitative determination of tissue fat. The extraction of lipids from complex matrices, such as fish, using the traditional methods proposed by Bligh & Dyer and Folch usually, employs solvents with high toxicity, whose residues can generate a high environmental impact. The chemical safety concern nowadays is directly linked to quality of life involving control and prevention of adverse effects of solvents to humans and the environment, ranging from the extraction, use and disposal of these and their residues. Moreover, the procedures of sample preparation, the sample: solvent ratio, the proportion of solvents applied, and the order of addition of solvents during the experiment are not standardized in these methods. Therefore, the present study aimed to assess the extraction conditions of total lipids from fish processing residues, and thus propose a standardized method which ensures a maximum efficiency in lipid extraction. Furthermore, a more environmental-friendly oil extraction method using less toxic solvents than those proposed by the Bligh & Dyer method (i.e. using the hexane-ethanol-water phase diagram) was developed. After identifying the best combination of solvents, the extracts obtained with hexane- ethanol showed effective yield on total lipids and the ability to extract the polar lipid components and nonpolar of the samples. The best use of lipids to be extracted from fish waste matrix, were the solution 1 (1: 7: 1,375) for the carcass of solution 2 (1: 2,5: 1,1875) for the head and the solution 4 (4: 1: 4,375) for the viscera totaling 14,13%, 14,69% and 47,63%(4: 1: 4,375) respectively. Therefore, to seek alternative solvent systems chloroform - methanol to extract lipids of tilapia processing waste, it was possible to identify the best proportions of hexane: ethanol: water as replacing the traditional method proposed by Bligh & Dyer (1959).

Keywords: Solvents; Tertiary mixture phase diagram; Tilapia-filleting wastes; Fish oil

1 INTRODUÇÃO

A produção global de pescado atingiu recorde mundial em 2013 com 160 milhões de toneladas (FAO, 2013). Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), a estimativa para 2030 será um déficit de pescado no mundo que atingirá 100 milhões de t. Outros dados da entidade indicaram que o consumo mundial de pescado atingiu 19,2 kg per capita, por ano, ultrapassando os 12 kg por habitante, por ano, preconizados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (BRASIL, 2015).

O pescado é um alimento indiscutível em termos de qualidade nutricional, uma vez que é uma fonte de excelência proteica e lipídica e fornecedor supremo de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (AQUA FEED, 2015). A *American Heart Association* (AHA) recomenda, para indivíduos portadores de doença cardiovascular diagnosticada, a ingestão de pescado duas vezes por semana; especialmente as espécies com teores mais elevados de ácidos graxos poli-insaturados. Contudo, o consumo está estritamente ligado ao hábito e aos aspectos econômicos que envolvem a oferta e a demanda de pescado em cada região produtora (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Os subprodutos de pescado, procedentes dos resíduos, têm sido considerados de baixo valor comercial e descartados com um mínimo de aproveitamento. Nos últimos dez anos, contudo, tem havido uma tendência global de crescente conscientização sobre os aspectos econômicos, sociais e ambientais da utilização ótima dos recursos da pesca, e da importância de reduzir as perdas nas fases de pós-captura, armazenagem, processamento e distribuição. A utilização de resíduos de pescado está ganhando a atenção porque o descarte contém quantidades significativas de minerais, proteínas e lipídeos, podendo ser reciclados para obtenção de coprodutos. A comercialização de coprodutos deve crescer como atividade industrial em vários países, uma vez que aumentará a receita das empresas, o que exigirá uma controlada manipulação dos descartes (FAO, 2014).

Globalmente, quase 70 milhões de t de pescado são destinados ao processamento por refrigeração, congelamento, enlatamento e salga-secagem. A maioria dos espécimes de tilápia, cuja produção global foi 3,95 milhões de t em 2011, é comercializada na forma de filés congelados com rendimento de cerca de 30 a 37%. Segundo projeções feitas pela FAO, em 2030, a produção de tilápia será

30% maior do que a da linha de projeção referência, enquanto que a dos moluscos, salmão e camarão deverá crescer 10%.

Em virtude do volume de resíduos gerado pelo processamento da tilápia, a extração do óleo desta espécie mostra-se como uma alternativa para o aproveitamento dessa biomassa, agregando valor a um coproduto e aumentando a receita da empresa. Embora o óleo seja uma fonte natural de ácidos graxos poli-insaturados utilizados em suplementos nutricionais, a capacidade de extrair esses óleos ainda é um desafio quando se trata de eficiência na extração de lipídeos polares e apolares, bem como a sua qualidade. Além disso, as maiores quantidades são geralmente encontradas nas partes não aproveitadas do pescado, como vísceras e descartes da etapa de filetagem (DAUKSAS et al., 2005).

Nesta pesquisa, a extração dos lipídeos foi realizada utilizando solventes com diferentes polaridades, hexano, etanol, água e a mistura de clorofórmio: metanol: água (2:1: 0,8 v/v, Bligh & Dyer), a fim de comparar a eficiência das diferentes metodologias. A vantagem apresentada pelo método proposto baseado na mistura binária hexano e etanol é a capacidade desta em extrair tanto os lipídeos neutros como os lipídeos polares de forma eficiente; a fase de hexano retém todos os lipídeos e a fase etanólica (água + etanol) retém os não-lipídeos (KATES, 1972). Tem-se a formação desse sistema bifásico baseado na teoria do equilíbrio líquido-líquido de três componentes (hexano- etanol- água). A determinação da solubilidade de cada componente pode ser avaliada por meio de um diagrama ternário de solubilidade de dois líquidos imiscíveis entre si (hexano e água) que formam uma região bifásica no diagrama, com um terceiro (etanol), completamente miscível nos outros dois. O etanol foi escolhido como solvente, pois este se apresenta vantajoso por proceder de uma fonte renovável, podendo ser amplamente usado na indústria, sendo que o Brasil é o segundo maior produtor mundial.

Portanto, o presente estudo visou propor um método alternativo de extração de lipídeos de resíduos do processamento da tilápia por meio de um sistema de extração com hexano e etanol como solventes de forma a justificar o seu aproveitamento quando feita a comparação com as metodologias tradicionais de extração

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pesca, aquicultura, produção e consumo

A pesca brasileira apresentou significativo crescimento nos últimos anos. Atualmente, o país produz 2 milhões de t de pescado, sendo 40% provenientes do cultivo. A atividade gera um PIB pesqueiro de R\$ 5 bilhões, mobilizando 800 mil profissionais entre pescadores e aquicultores e proporciona 3,5 milhões de empregos diretos e indiretos. O potencial brasileiro é significativo e promissor; o país pode se tornar um dos maiores produtores mundiais de pescado (BRASIL, 2014).

A produção de pescado nacional para o ano de 2011 registrou um incremento de aproximadamente 13,2% em relação a 2010. Em 2011, a região Nordeste continuou registrando a maior produção de pescado do país, respondendo por 31,7% da produção nacional. As regiões Sul, Norte, Sudeste e Centro-Oeste registraram 23,5%, 22,8%, 15,8% e 6,2%, respectivamente (Figura 1).

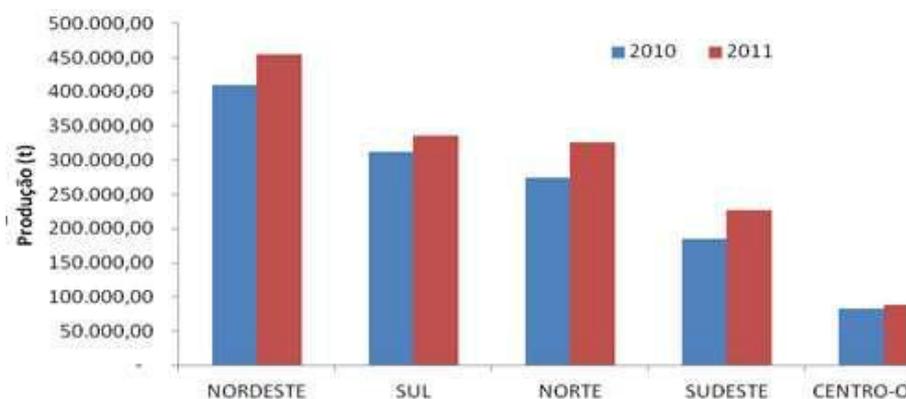


Figura 1 - Produção de pescado (t) nacional em 2010 e 2011 discriminada por região

Fonte: BRASIL, 2014

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a produção total da piscicultura brasileira em 2013 foi de 392,5 mil t, sendo a região Centro-Oeste a principal produtora com 26,8% do total (105 mil toneladas) (IBGE, 2015).

Um estudo realizado pelo Rabobank (2010) mostrou que a aquicultura poderá ser, na próxima década, a nova fronteira de proteína animal no Brasil. Na pesquisa, os dados mostraram que a produção de pescado em cativeiro poderá alcançar 960 mil t em 2022, praticamente o dobro, em relação as 479 mil t registradas em 2010 (AQUA FEED, 2015).

A produção global de pescado ultrapassou o crescimento da população mundial, e a aquicultura apresentou um rápido crescimento dentro do setor produtor de alimentos. Segundo dados da FAO, em termos globais, a pesca e a aquicultura se responsabilizam pelo maior aporte proteico da população, da ordem de 10-12%. Espera-se que a pesca e a aquicultura venham a desempenhar um papel fundamental na conquista de um futuro sustentável, garantindo a segurança alimentar à população, porém protegendo seus recursos naturais para gerações futuras (FAO, 2014).

As perspectivas para a pesca e aquicultura destacam a extensão do comércio mundial de pescado que tende a fluir fortemente com desenvolvimento suficiente para suprir a demanda de uma classe média global emergente, com o aumento da população mundial para 9 bilhões de pessoas até 2050. O crescimento poderá ser evidenciado com o aumento global da produção de tilápia, indo dos 4,3 milhões de t em 2010 para 7,3 milhões de t em 2030 (FAO, 2014).

A atual produção mundial de pescado é da ordem de 126 milhões de t (Figura 2). O Brasil é um dos poucos países que tem condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura. A análise feita no período de 2003 a 2013 sobre o consumo nacional de pescado apontou que o aumento foi superior a 100%. Em 2013, o consumo médio por habitante/ano foi de 14,5 Kg (BRASIL, 2014).



Figura 2 - Abastecimento mundial de pescado

Fonte: FAO. 2014

O pescado é composto por proteínas de elevado valor biológico e apresenta todos os aminoácidos essenciais. O tecido muscular de pescado é fonte de proteínas de alta digestibilidade, cerca de 90 a 95%, superando a carne bovina que atinge valores ao redor de 90% (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994; CRAWFORD, 1985; MORETTO et al., 2002; OETTERER, 2006; RUITER, 1995; SGARBIERI, 1996).

2.1.1 A Tilápia

"Tilápia" é o nome genérico de um grupo de ciclídeos, composto por três gêneros: *Oreochromis*, *Sarotherodon* e *Tilapia* (THOMAS & MICHAEL, 1999). A tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) é originária da região Leste da África, uma espécie versátil no cenário da piscicultura, pois se adapta tanto ao cultivo extensivo, quanto ao sistema de criação em tanques-rede, sendo cultivada com alta tecnologia de produção (MEURER et al., 2002).

Segundo a FAO, no Brasil, a produção de tilápias ultrapassou 155 mil t em 2010, sendo responsável por mais de 32% da produção aquícola brasileira total e proveniente dos criatórios das regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste. A tilápia já se consolidou como o principal produto pesqueiro/aquícola, e mesmo nos estados com tradição de consumo de peixe marinho, a tilápia já é encontrada com frequência nas barracas de praia, restaurantes, peixarias e supermercados (FAO, 2012).

Em nível mundial, considerando as perspectivas para o crescimento das espécies, um crescimento mais rápido da oferta é esperado para a tilápia, a carpa e o bagre. A demanda pelos produtos óleo de peixe e farinha de peixe, provavelmente, terá um crescimento expressivo, dada a rápida expansão da aquicultura e a estabilidade global da pesca de captura. No período 2010-2030, os preços do óleo de peixe e da farinha de peixe tenderão a subir em termos reais de, 90% e 70%, respectivamente (MSANGI et al., 2013).

Diante da alta possibilidade de cultivo, a tilápia é uma das espécies mais comercializadas na forma de filé, e por isso apresenta baixo rendimento, de aproximadamente 33%, com o agravante de descartar resíduos comestíveis (SOUZA; MACEDO-VIEGAS, 2001).

2.2 Resíduos gerados pela indústria pesqueira

A definição de resíduos sólidos, segundo a NBR 10.004 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2004), refere-se a “todos os compostos de características sólidas ou semi-sólidas resultantes, de vários segmentos da indústria, do comércio e dos sistemas de produção agrícola e animal”. Ou seja, “todas as sobras do processamento de alimentos que são de valor relativamente baixo” (OETTERER, 2002). No entanto, quando o material residual é aproveitado e a indústria agrega valor a essas sobras, o termo resíduo passa a ser designado de subproduto ou coproduto (OETTERER, 2002).

Para pescado, são considerados resíduos, os peixes de baixo valor comercial, os descartes da filetagem, os tecidos escuros, cabeças, carcaças e vísceras (VISENTAINER et al., 2003). Os resíduos gerados no processamento que são constituídos de cabeça, vísceras, nadadeira, cauda, coluna vertebral, barbatana, escamas e restos de tecidos, podem representar significativos 50% da matéria-prima utilizada, variando conforme as espécies e o processamento (BANCO DO NORDESTE, 1999; NUNES, 2001; PESSATTI, 2001).

O setor pesqueiro gera uma quantidade expressiva de resíduos com alto valor nutricional, ricos em proteínas e em ácidos graxos de cadeia longa. Este material residual pode ser constituído de tecido escuro, peixes fora do tamanho ótimo para consumo, resíduos obtidos no processamento como descartes da filetagem, fígado, cabeça, carcaça, pele e vísceras (VISENTAINER et al., 2003). Quando o material residual é aproveitado e a indústria agrega valor a essas sobras, o termo resíduo passa a ser designado de subproduto ou coproduto (OETTERER, 2002).

A indústria processadora do pescado gera mais de 63,6 milhões de t de resíduos nas operações de processamento. Cerca de 45% do peso vivo da matéria-prima é descartado como lixo, sem tentativa de recuperação havendo, portanto, uma grande urgência em encontrar alternativas sustentáveis para a utilização desse resíduo, uma vez que o descarte incorreto leva a problemas ambientais (FAO, 2010). Certamente, o desenvolvimento de alternativas tecnológicas para o aproveitamento de resíduos de peixe aumenta a receita da empresa à medida que se agrega valor a este material. O resíduo pode ser processado para a obtenção de óleo, farinha ou silagem que, por sua vez, podem ser aplicados na alimentação

animal. O óleo obtido pode ainda ser estabilizado, obtendo triacilgliceróis estruturados que podem ser aplicados em rações, com vantagens nutricionais sobre o óleo original (FELTES et al., 2010).

A geração de resíduos está presente em todas as etapas exercidas pela atividade pesqueira, ao longo da cadeia produtiva, desde a captura até a comercialização. A natureza e o volume de resíduo do processamento de pescado dependem dos processos de transformação, das espécies de pescado e condições de pesca, época de colheita e a natureza do produto final. MARTINS (2012) relatou que a obtenção de filés caracteriza o menor grau de aproveitamento do pescado, resultando, conseqüentemente, em uma maior geração de resíduos. Da produção global de pescado de cerca de 140 milhões de t, 63 milhões de t de subproduto são geradas anualmente no mundo (RAI et al., 2012). A produção de resíduos, principalmente na etapa de filetagem de tilápia representa 62,5% a 66,5% da matéria-prima, o que requer o tratamento de tais resíduos, a fim de reduzir o impacto ambiental (BOSCOLO et al., 2001).

De acordo com a base gerencial de bolsa de resíduos, foi relatado que 68% destes são encaminhados às indústrias de farinha de pescado, 23% são encaminhados a aterros sanitários municipais e 9% são despejados diretamente nos rios, sendo assim um grave problema de impacto ambiental (STORI; BONILHA; PESSATI, 2002).

Os resíduos do processamento de peixes estão compostos pelas partes não comerciais dos animais que somam em torno de 50% do material residual do peixe capturado, e que não é utilizado como alimento e representa ao redor de 30 milhões de t de resíduo, por ano (KRISTINSSON; RASCO, 2011).

A distribuição média de cada porção pode ser observada na Figura 3. A sobra que é considerada um resíduo é descartada e pode gerar impacto ambiental (NORZIAH et al., 2009).

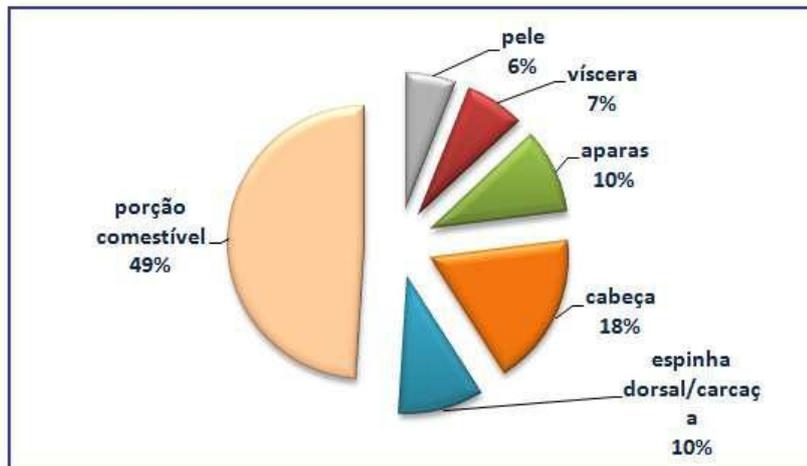


Figura 3 - Distribuição da porção comestível e do resíduo de pescado

Fonte: RUBIO-RODRÍGUEZ et al. (2012).

Os resíduos de peixe podem ser aproveitados para obtenção de um produto de maior valor agregado, como por exemplo, o óleo de peixe, que pode ser produzido a partir de peixe inteiro, da fauna acompanhante (espécies sem valor comercial) da pesca, de ovas e de sobras do processamento do pescado (ADEOTI; HAWBOLDT, 2014). A recuperação dos lipídeos presentes nos resíduos de processos industriais poderia ser uma fonte alternativa de energia de baixo custo (biocombustível e alimentação), reduzindo os problemas de descarte e poluição ambiental, e oferecendo um subproduto com valor agregado (RAI et al., 2013).

O problema com a produção de resíduos existe tanto na pesca quanto na aquicultura, não havendo apenas uma solução para este problema. A tilápia é a espécie de peixe de água doce mais processada no Brasil, especialmente para a produção de filés refrigerados ou congelados, porém com baixo rendimento (30 a 33%) e, conseqüentemente, gera uma grande quantidade de resíduos na indústria. Ademais, o comércio de tilápias inteiras também gera uma quantidade significativa de resíduos, tanto nos entrepostos (no atacado) como nas peixarias (no varejo) (VIDOTTI, 2006).

Portanto, a definição de um destino para esses resíduos permitiria aos produtores, frigoríficos e pescadores beneficiarem-se com o aproveitamento dessa matéria prima. Além disso, a produção de alguns subprodutos a partir dos resíduos resguardaria o Brasil de importar os mesmos de outros países em grandes quantidades, evitando gastos desnecessários, como é o caso do óleo de peixe.

Além disso, a reutilização e reciclagem de resíduos de pescado também irá reduzir consideravelmente o custo da produção alimentar do peixe e diminuir a poluição relacionada aos problemas gerados com o alto volume de resíduo produzido (KUBITZA et al., 2006).

2.2.1 O óleo de pescado como produto comercial

Os resíduos de pescado representavam cerca de 2/3 do volume da matéria prima da indústria, constituindo grave problema ambiental (BOSCOLO E FEIDEN, 2007). O óleo de pescado mostra-se como uma alternativa para o aproveitamento dos resíduos do processamento, sendo uma forma de agregar valor a esta matéria prima, por conta de suas amplas aplicações. A partir dos resíduos de pescado, principalmente das vísceras, é possível realizar a extração de lipídeos, potencialmente utilizáveis na alimentação humana (MORAIS et al., 2001; CREXI et al., 2010), animal (GUERRA; OÑA, 2009) ou na produção de biocombustíveis (SANTOS et al., 2010; LIN; LI, 2009). O percentual do óleo de pescado obtido após o processamento do resíduo depende de vários fatores, sendo o tamanho do peixe e o sistema de produção os que mais influem nos resultados finais (VIDOTTI & BORINI, 2006).

No Brasil, o óleo de pescado ganhou uma grande atenção nos últimos anos devido ao aumento da demanda global, assim como os seus preços (Figura 4). As estimativas mostram que 71% do óleo de peixe produzido é destinado ao abastecimento alimentar aquático e 26% à alimentação humana (FAO, 2014). O óleo de pescado também se utiliza no preparo de cosméticos, detergentes, tintas, vernizes e biodiesel (FEIDEN; BOSCOLO, 2007).

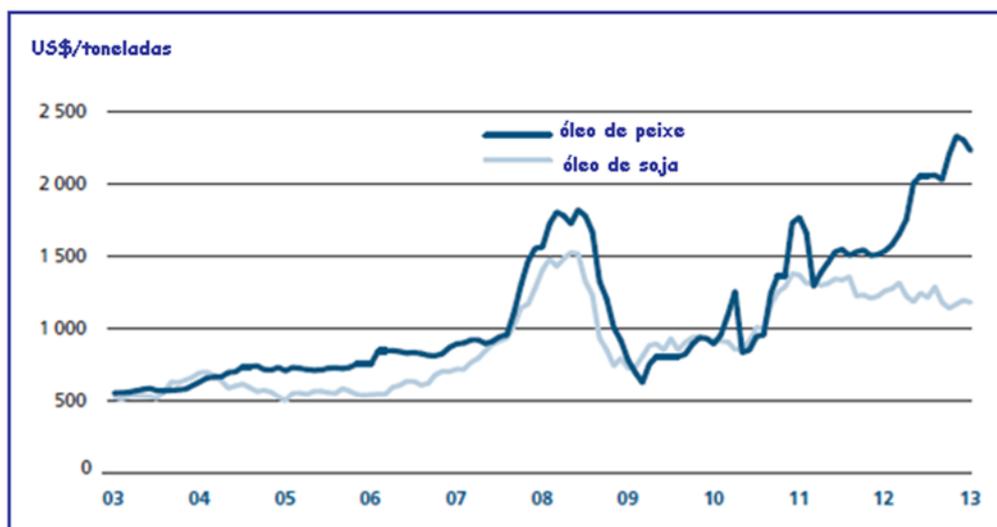


Figura 4 - Tendências no preço, em US\$/ t, de óleo de peixe e de óleo de soja

Fonte: FAO. 2014

Pesquisadores em todo o mundo têm procurado aumentar a produção de óleo de peixe por meio do tratamento dos resíduos do processamento. O óleo de peixe tem um conteúdo elevado de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (BIMBO et al., 1991). Quando o óleo de peixe não viabiliza a extração dos ácidos graxos poli-insaturados, devido à presença de diversas impurezas como metais pesados (mercúrio) e dioxinas, este pode ser matéria prima para a produção de biodiesel suprimindo a necessidade de novos insumos para a produção do biocombustível, além de ser uma alternativa para o problema de eliminação dos resíduos gerados com o beneficiamento do peixe, trazendo vantagens econômicas e sustentáveis para a piscicultura local (FERNANDES et al., 2010; SANTOS et al., 2010, NUTEC, 2010). O óleo obtido das vísceras parece ter o maior potencial para produzir biodiesel (217 L/t de víscera processada), seguido do resíduo obtido das cabeças (91 L/t de cabeça processada) e da mistura dos resíduos (60 L/t de resíduo processado) (MARTINS, 2012).

2.3 Lipídeos

2.3.1 Definição

Os lipídeos não são definidos por uma estrutura comum, ao contrário, constituem uma categoria de compostos que têm em comum a propriedade da

solubilidade em solventes apolares e a insolubilidade em solventes polares (AKOH, 2008).

Estes compostos são geralmente classificados em dois grupos: os lipídeos neutros ou apolares (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e esteróis) e os lipídeos polares (ácidos graxos livres, fosfolipídeos e esfingolipídeos) (MANIRAKIZA, COVACI; SCHEPENS, 2001).

Os lipídeos encontrados na natureza são associados a outras moléculas através da interação *Van der Waals* como, por exemplo, a interação de várias proteínas com moléculas de lipídeos; pontes de hidrogênio, principalmente entre lipídeos e proteínas; e ligação covalente entre lipídeos, carboidratos e proteínas. A insolubilidade em água é a propriedade geral utilizada para a separação lipídica de outros componentes celulares. A extração completa dos lipídeos de uma matriz pode exigir tempo até a separação em fases imiscíveis, porém, o mais eficiente é a combinação de solventes de diferentes polaridades (AKOH et al., 2008).

A insolubilidade dos lipídeos na água torna possível a sua separação de proteínas, carboidratos e água dos tecidos. Os lipídeos possuem uma hidrofobicidade relativa dependendo de seus componentes moleculares. Na análise de alimentos de rotina, o conteúdo de "gordura" refere-se aos constituintes lipídicos "livres" que podem ser extraídos por solventes menos polares em análises de curto tempo (AKOH et al., 2008).

A extração completa requer mais tempo ou a utilização de combinações de solventes, de modo que os lipídeos podem ser solubilizados integralmente a partir da matriz. Devido à complexidade dos lipídeos, os procedimentos de extração da fração lipídica estão definidos para amostras de tecidos animais ou vegetais. Alguns passos devem ser seguidos como: (A) pré-tratamento da amostra, que inclui a secagem (ou redução do teor de água), redução do tamanho da amostra ou hidrólise; (B) homogeneização do tecido na presença de um solvente; (C) separação das fases líquida (orgânica e aquosa) e sólida; (D) remoção de contaminantes não lipídicos; e (E) remoção do solvente e secagem do extrato (AKOH et al., 2008).

2.3.2 Lipídeos do pescado

Uma das vantagens nutritivas do pescado em relação à carne bovina está na qualidade da fração lipídica. Algumas espécies de peixes, principalmente os de águas mais frias, são ricos em lipídeos poli-insaturados e contêm baixos níveis de colesterol. O consumo desses lipídeos, da série ômega-3, pode prevenir doenças cardiovasculares. (CONTRERAS-GUZMÁN, 1994). Geralmente, a composição em lipídeos pode variar de acordo com a espécie de pescado, tipo de músculo corporal analisado, sexo, tipo de alimentação fornecida, dieta ou hábito alimentar, idade, grau de maturação gonadal, época do ano e *habitat* (OETTERER, 2002; OETTERER, 2009).

Uma característica da fração lipídica dos peixes é o seu alto teor em ácidos graxos insaturados que conferem uma vantagem nutricional ao alimento. Os ácidos graxos presentes nos peixes de água doce são provenientes dos ingeridos na dieta e das modificações fisiológicas (HENDERSON; TOCHER, 1987).

Os lipídeos são a maior fonte de energia metabólica para o crescimento das ovas até o animal adulto e a maior fonte de energia metabólica para a reprodução dos peixes (HALVER; HARDY, 2002). No ambiente aquático natural, os lipídeos são encontrados tanto nas fontes animais como vegetais, e são armazenados predominantemente como triacilgliceróis. Nos organismos de água doce, os triacilgliceróis são o principal componente do lipídeo ingerido na alimentação (COWEY; SARGENT, 1979).

A fração lipídica na dieta é fonte primária e energética para os animais aquáticos uma vez que seu papel principal é gerar energia metabólica na forma de ATP, num processo mitocondrial (SHERIDAN, 1988; HALVER; HARDY, 2002; CHOU et al., 2001).

Os lipídeos podem servir como veículo para a absorção de vitaminas lipossolúveis e esteróis e, além disso, desempenham um importante papel na estrutura das membranas biológicas na forma de fosfolipídeos e ésteres de esteróis (SHILO et al., 1989; HERTRAMPF; PIEDAD-PASCUAL, 2000; WEIRICH & REIGH, 2001; JOHNSON et al., 2002).

A quantidade de lipídeos da dieta para peixes varia entre 10 e 20% do peso seco, quantidade suficiente para permitir que a fração proteica da dieta seja eficiente

para o crescimento, sem que haja excessiva deposição de gordura na carcaça (COWEY; SARGENT, 1979; WATANABE, 1982). Assim, a quantidade de lipídeos na dieta depende da quantidade de proteína e, em alguns casos, dos carboidratos presentes (WATANABE, 1982).

O fígado desempenha o papel de armazenar gordura nos peixes habitantes de águas profundas, e que apresentam movimentação lenta (BRAEKKEN, 1959). Já os peixes de movimentação rápida possuem quantidades substanciais de lipídeos armazenados no músculo esquelético. Dos dois tipos de músculos esqueléticos, o músculo escuro armazena mais lipídeos do que o músculo claro (ROBINSON; MEAD, 1973; SHERIDAN et al., 1983; SHERIDAN, 1986).

Alguns peixes de água doce e de clima tropical acumulam lipídeos semissólidos, que se depositam principalmente sobre o peritônio e que podem ser separados facilmente na operação de filetagem. Logo, o aproveitamento das gorduras dos peixes de água doce pode ser uma alternativa a ser considerada, uma vez que apresenta adequada composição em ácidos graxos, maior estabilidade em relação às gorduras de origem marinha e ampla plasticidade (RIBEIRO et al., 2012).

Os principais compostos identificados no extrato lipídico do pescado podem ser agrupados em duas categorias: os lipídeos neutros, que constituem os triacilgliceróis, hidrocarbonetos, carotenoides, vitaminas lipossolúveis, esteróis, alquil e alquenil éteres de diacilgliceróis, álcoois graxos e ceras; e os lipídeos polares que apresentam glicolipídeos e fosfolipídeos (CONTRERAS-GUZMÁN, 1998).

Estudos sobre o metabolismo de ácidos graxos em peixes demonstraram que há especificidade quanto à exigência em ácidos graxos na dieta (MARTINO, 2003). Isto é evidenciado quando se compara o perfil de ácidos graxos de espécies marinhas e de água doce. A Tabela 1 apresenta as exigências de ácidos graxos poli-insaturados para algumas espécies de peixes.

Tabela 1 – Exigência de ácidos graxos essenciais em peixes

Espécie	Ácido graxo	Exigência
Bagre americano (<i>Ictalatus punctatus</i>)	C18:2 n-6 e n-3 HUFA	1-2%
Truta arco-íris (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	C18:3 n-3	1,0%
Salmão chum (<i>Oncorhynchus keta</i>)	C18:3 n-3 e C18:2 n-6	1,0%
Carpa comum (<i>Cyprinus carpio</i>)	C18:3 n-3 e C18:2 n-6	0,8%
Carpa capim (<i>Ctenopharyngodon idella</i>)	C18:3 n-3 e C18:2 n-6	0,5%
Tilápia do Nilo (<i>Oreochromis niloticus</i>)	C18:2 n-6	0,5%
Besugo (<i>Chrysophrys major</i>)	C20:5 n-3	0,50%

Fonte: Martino (2003).

Em peixes, assim como em outras espécies de animais monogástricos, a composição lipídica tecidual reflete a alimentação e pode ser alterada pela manipulação da dieta. Dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados da série ômega-3 podem diminuir a capacidade lipogênica dos tecidos hepático e adiposo, melhorando a composição lipídica da carcaça (NIELSEN et al., 2005).

O perfil de ácidos graxos do pescado é diretamente influenciado por parâmetros fisiológicos e ambientais, podendo, desta forma, ser manipulado para a obtenção de alguns benefícios. Destacam-se como interferentes na composição de ácidos graxos fatores ambientais e a alimentação (RIBEIRO et al., 2012). A cadeia alimentar marinha é formada por animais ricos em ácidos graxos da série ômega-3, como, por exemplo, o EPA (ácido eicosapentaenoico) e o DHA (ácido docosahexaenóico). Os peixes de água doce geralmente possuem uma série de enzimas capazes de modificar o perfil da dieta e dos ácidos graxos, bem como dos produtos de sua biossíntese. Isso significa que muitas dessas espécies podem transformar um determinado ácido graxo em seu correspondente de cadeia mais longa. Por exemplo, o ácido α -linolênico (C18:3 n-3) pode ser convertido em EPA (C20:5 n-3), e este pode originar o DHA (C22:6 n-3) (MARTINO, 2003).

A dieta alimentar à qual o peixe for submetido influenciará a sua composição química em geral, e em especial, a composição em ácidos graxos. Logo, informações devem ser coletadas acerca do tipo de alimentação ou hábito alimentar

dos peixes em seu “*habitat*” natural para que, a partir do comportamento alimentar, seja possível medir o conteúdo de lipídeos do tecido animal.

Assim, a fonte de lipídeos utilizada na ração pode influenciar significativamente o crescimento e a conversão alimentar dos peixes (WILSON, 1998). A utilização de lipídeos como fonte de energia varia conforme a espécie de peixe, dependendo de seu hábito alimentar (WILSON, 1998). A inclusão de lipídeos na ração dos peixes promove um aumento do nível de gordura corporal, sendo assim, quanto maior o nível de lipídeos na dieta, maior o depósito de gordura no peixe (CYRINO, 1995). A nutrição, portanto, é um fator determinante na definição da composição de ácidos graxos do pescado cultivado.

O conteúdo total de lipídeos de amostras de tecidos animais e vegetais deve ser aferido com precisão nos estudos bioquímicos, fisiológicos e nutricionais. Assim, métodos confiáveis para a extração quantitativa de lipídeos dos tecidos são de suma importância. Algumas amostras animais requerem cuidados especiais para a obtenção da fração lipídica, pois fatores como co-extração dos componentes não-lipídicos e a oxidação indesejada podem influenciar a qualidade final da fração lipídica.

2.3.3 Fração lipídica da tilápia

Os resíduos do processamento de pescado são uma fonte alternativa de gordura, tendo como exemplo as vísceras, que representam entre 7,5% a 15% do peso corporal dos peixes, e contêm de 35% a 45% de óleo (SANTOS et al., 2010).

As aparas são partes do próprio filé obtido na etapa de filetagem para padronização do seu formato (cortes em “v” ou cortes dorsal e ventral). Uma planta de filetagem que processa 6 t/dia, gera 300 kg/dia de aparas, que pode ser uma matéria-prima de alta qualidade para a indústria, capaz de produzir coprodutos com valor agregado. Aparas dorsal, ventral e do corte em “v” representam em média 5% do peso dos peixes abatidos. Desse total de resíduo, cerca de 15% são provenientes do corte em “v”, para retirada das espinhas remanescentes no filé e 85% são provenientes do corte dorsal e ventral para padronização (VIDOTTI et al., 2006).

A fração lipídica encontra-se em maior quantidade nas aparas dorsais e ventrais, com 0,74: 1: 0,29 de ácidos graxos monoinsaturados, saturados e poli-insaturados, respectivamente. Já nas aparas do corte “v” a proporção é de 0,87: 1: 0,22 de monoinsaturados, saturados e poli-insaturados, respectivamente (VIDOTTI et al., 2006).

As aparas dos cortes “v” apresentam baixo teor de colesterol, 100 g de aparas apresentam 16% do recomendado diário (300 mg ao dia). Já as aparas do corte dorsal e ventral apresentam teor de colesterol maior em relação ao corte “v”, em que de 100 g é possível obter 33% da recomendação diária do colesterol (VIDOTTI et al., 2006).

A composição da fração lipídica encontrada na literatura das aparas dorsais e ventrais e do corte “v”, obtidos na filetagem da tilápia está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição da fração lipídica das aparas dorsais e ventrais e do corte “v”, obtidos na filetagem da tilápia

Composição da fração lipídica	Corte "v"	Dorsal e ventral
Lipídeos totais (g/100)	3,4	15
Colesterol (mg/100g)	47,1	98,9
Ácidos graxos saturados (g/100g)	1,1	4,91
Ácidos graxos monoinsaturados (g/100g)	1,27	6,68
Ácidos graxos poli-insaturados totais (g/100g)	0,29	1,95

Fonte: VIDOTTI et al., 2006.

As cabeças de tilápia, também podem ser utilizadas como matéria prima de baixo custo, sendo, assim, um coproduto para a indústria. As cabeças *in natura* apresentam 16,08% de ácidos graxos poli-insaturados, 33,90% de ácidos graxos saturados e 48,60% de ácidos graxos monoinsaturados (STEVANATO, 2006). Portanto, o aproveitamento dos resíduos de tilápia proveniente da filetagem pode ser viável economicamente ao fornecer material lipídico utilizado como alimento ou biocombustível.

2.3.4 Extração dos lipídeos

A primeira etapa para análise quantitativa e qualitativa de lipídeos de um alimento é a sua extração. Há diversos métodos para a determinação do teor de lipídeos em alimentos, adequados para diferentes produtos, como a extração com solvente a quente, extração com solvente a frio, extração da gordura ligada a outros compostos e extração por hidrólise ácida e alcalina, entre outros (CECCHI, 2003).

A extração por solvente é o método tradicional de extração de lipídeos que deve ser rápido, eficiente e delicado, a fim de minimizar a degradação dos componentes lipídicos (MOLINA et al., 1999). Vários estudos têm demonstrado que o conteúdo de lipídeos extraídos depende da combinação de solventes utilizada, que deve demonstrar uma capacidade de solubilizar todos os compostos lipídicos e deve ser suficientemente polar para remover os lipídeos de sua associação com membranas celulares e lipoproteínas (DE BOER, 1988; RANDALL et al., 1991,1998; MANIRAKIZA et al., 2001).

Os óleos são altamente solúveis em solventes orgânicos, tais como hexano, benzeno, ciclo-hexano, acetona e clorofórmio. Com isso, os fatores importantes a considerar na escolha de um solvente orgânico incluem a solubilidade preferencial do composto de interesse, o baixo ponto de ebulição do solvente para a sua mais fácil recuperação, o seu custo, toxicidade, disponibilidade e possibilidade de reutilização. O hexano é um dos poucos solventes com tais qualidades e utilizado em grande escala industrial (MERCER; ARMENTA, 2011).

Os lipídeos estão distribuídos na matriz dos tecidos, apresentando diferentes estruturas e funções. Os lipídeos simples, tais como glicerídeos, existem como tecidos adiposos superficiais e estão prontos para serem extraídos. Já os lipídeos complexos como fosfolipídeos, esfingolipídios e esteróis são geralmente encontrados como constituintes de membranas em estreita associação com proteínas e polissacarídeos, por isso, não são extraídos tão facilmente como os lipídeos simples (XIAO, 2010).

2.3.5 Métodos de extração

Diversos métodos foram desenvolvidos para determinar o conteúdo total de lipídeos, porém muitos deles demandam muito tempo e trabalho manual. O teor de lipídeos é tradicionalmente determinado gravimetricamente por extrações com solvente. Os métodos de Soxhlet e de Bligh & Dyer (1959) são os comumente utilizados na avaliação do teor de lipídeos em tecido animal e vegetal. O diferencial de ambos é o aquecimento do solvente e o material seco para o método descrito por Soxhlet e uma extração a frio utilizando solvente clorado e material sem tratamento prévio para o método proposto por Bligh & Dyer.

O método Soxhlet de extração de óleo com solvente a quente é o mais antigo e mais utilizado. Este método emprega vidraria específica e se baseia no aquecimento e volatilização dos solventes, normalmente éter de petróleo ou hexano, que se condensam sobre a amostra triturada contida em um cartucho presente na câmara de coleta dos solventes condensados. A extração ocorre por imersão + percolação, em temperatura levemente inferior á temperatura de condensação, o tempo de contato se restringe ao necessário para que o volume de líquido atinja o ponto de sifonagem, reiniciando o processo. O tempo desse processo de extração varia de 1 h até 72 h (CECCHI, 2003; BRUM, 2004). A extração com solvente a quente é baseada em três etapas: solubilização da fração lipídica da amostra no solvente, eliminação do solvente por evaporação e quantificação gravimétrica (BRUM & REGITANO-D'ARCE, 2009).

A extração lipídica de tecidos pode ser facilmente realizada com solventes não clorados em equipamentos Soxhlet, mas os resultados são muitas vezes inferiores aos obtidos pelo método de Bligh & Dyer, uma vez que os lipídeos extraídos não são considerados lipídeos totais, mas sim, lipídeos "extraíveis". De acordo com DE BOER (1988), a fração não extraída pelo método de Soxhlet é denominada lipídeos ligados. Além disso, o rendimento da extração por Soxhlet é determinado pela composição do solvente e afinidade com o composto de interesse e o tempo de extração ou, mais precisamente, o número de ciclos. BRUM & REGITANO-D'ARCE (2009) salientaram em seu trabalho sobre métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas, a limitação do solvente n-hexano. Os autores constataram que, sendo o hexano um solvente apolar, este não possui a mesma eficiência para extrair os lipídeos ligados (polares) como ocorre

com outros solventes de maior polaridade. No entanto, uma das vantagens do método de extração por Soxhlet, é a de que a amostra permanece boa parte do tempo imersa no solvente, ocorrendo sifonagens intermitentes que renovam o líquido constantemente, mantendo o gradiente de concentração do óleo entre solvente e amostra, fato que possibilita a solubilização do óleo.

As diferenças no rendimento lipídico entre os diferentes métodos se devem à maior ou menor eficiência na extração dos lipídeos polares, que depende da polaridade do solvente orgânico usado para extração. Deste modo, misturas de solventes polares e apolares são geralmente utilizadas para obter a máxima eficácia na extração total dos lipídeos (DE BOER, 1988; PHILLIPS et al., 1989).

Um único solvente apolar não tem capacidade de extrair os lipídeos polares dos tecidos. Para assegurar uma recuperação completa e quantitativa dos lipídeos dos tecidos, um sistema de solvente composto por proporções variáveis de componentes polares e apolares deve ser usado. Tal mistura extrai mais completamente lipídeos totais mais exaustivamente do extrato e é adequada para posterior caracterização dos lipídeos. Os métodos de FOLCH (1957) e BLIGH & DYER (1959) são amplamente utilizados para a extração dos lipídeos totais. Quando comparados os métodos de extração, os rendimentos em lipídeos totais nas amostras animais são maiores empregando o método de Bligh & Dyer e pela metodologia de Soxhlet os resultados são similares aos encontrados na literatura (BRUM & REGITANO-D'ARCE, 2009).

Para padronizar um método de análise de lipídeos totais, RANDALL et al. (1988) recomendaram que a extração da amostra deve usar a técnica de BLIGH; DYER (1959). A escolha do método foi justificada com base no fato de que, quantitativamente, a mistura clorofórmio + metanol tem a capacidade de extrair todas as classes de lipídeos, produzindo rendimentos mais elevados e é um método relativamente preciso (RANDALL et al., 1991; ROOSE; SMEDES, 1996). A principal desvantagem da técnica foi a de que era requerida sub-amostragem de tecidos e realização de vários passos de extração em separado. Apesar da constatação destes autores, tem havido algumas tentativas para avaliar se o maior rendimento da extração de lipídeos com clorofórmio / metanol representa também maior precisão na capacidade de partição de amostras que se constituam em contaminantes orgânicos hidrofóbicos (DELBEKE et al., 1995).

Bligh & Dyer (1959) modificaram o método a frio de Folch (1957) e propuseram um método rápido para extração líquido-líquido e purificação de lipídeos totais a partir de um sistema de duas fases utilizando dois solventes imiscíveis e caracterizando um fenômeno de equilíbrio que é governado por leis de distribuição de fases. Conforme os autores, o soluto extraído (lipídeos) distribui-se entre ambas as fases. Por exemplo, um dos sistemas de solventes, o clorofórmio, dissolve o soluto melhor que o outro sistema, água / metanol. A concentração do soluto é, portanto, mais elevada no clorofórmio (2% v/v) do que na fase água (0,8% v/v) / metanol (1% v/v). A relação existente entre estas concentrações das duas fases é o equilíbrio. Teoricamente, o equilíbrio estabilizado entre estas concentrações é constante e não é afetado pela temperatura ou pela concentração do soluto (GRØGAARD, 2011).

A metodologia proposta por BLIGH & DYER (1959) é uma adaptação, em termos de volume de solventes, entre procedimentos de FOLCH e procedimentos de extração lipídica ótima (NORZIAH et al., 2009; XIAO, 2010). O método Bligh & Dyer utiliza solventes polar e apolar (por exemplo, clorofórmio, metanol e água) necessários para penetrar nas células de gordura e extrair o lipídeo da membrana celular, incluindo a dos músculos e dos fosfolipídeos (NORZIAH et al., 2009; XIAO, 2010).

BRUM & REGITANO-D'ARCE (2009) estudaram o método de Bligh & Dyer e afirmaram que é um método rápido e simples, desenvolvido para extração e purificação de lipídeos do material biológico. Originalmente Bligh & Dyer (1959) definiram um método para determinar o teor de lipídeos totais no músculo de peixes, que hoje é amplamente usado para medir o teor total de lipídeos de outros tecidos (IVERSON et al., 2001).

O método Bligh & Dyer foi desenvolvido a partir da análise do diagrama de fases da água-metanol-clorofórmio. A amostra foi misturada com água, metanol e clorofórmio em proporções específicas, e homogeneizada para criar uma solução monofásica. A diluição com clorofórmio e água produz um sistema bifásico. A camada superior é feita a partir de metanol e água e a camada inferior é o clorofórmio. A camada de água-metanol contém os componentes polares da solução: proteínas, hidratos de carbono, ácidos graxos livres e fosfolipídeos. A

camada de clorofórmio contém os componentes apolares, como a maioria dos lipídeos (BLIGH; DYER, 1959).

Misturas de clorofórmio e metanol têm sido amplamente utilizadas como extratores de lipídeos, e o exame do diagrama de fases clorofórmio-metanol-água levou à hipótese comprovada por BLIGH & DYER (1959). A extração ótima de lipídeos deve ocorrer quando aos extratos monofásicos, água e clorofórmio são adicionados em quantidade adequada para tornarem-se sistemas bifásicos (BLIGH; DYER, 1959). A composição final dessas misturas ternárias desenha o diagrama de fases que possibilita a escolha da região mais favorável à extração dos lipídeos.

2.3.6 Utilização de solvente nos processos de extração

De uma maneira geral, quando a seleção de um solvente é feita para o processo de extração deve-se levar em conta não somente a segurança da operação, mas também a disponibilidade, eficiência de extração, a qualidade do produto final, o custo, além de toxicidade, biorrenovabilidade e grau de periculosidade ao meio ambiente (TEH CHENG LO et al., 1991).

Compostos orgânicos da classe dos álcoois, o metanol e o etanol são caracterizados pela presença de uma hidroxila ligada aos radicais hidrocarbonetos metil e etil, respectivamente. A escolha do álcool se dá de acordo com a disponibilidade e o objetivo a ser atingido. O metanol é mais tóxico que o etanol e é mais volátil, apresentando maior risco de incandescência (ARDILA, 2009).

A utilização de solventes alcoólicos apresenta vantagens atrativas, do ponto de vista ambiental, uma vez que o etanol é produzido por via biotecnológica, não gera resíduos tóxicos, apresenta menor risco de manuseio devido ao seu menor grau de inflamabilidade e é considerado seguro para a saúde humana. Vantagens do ponto de vista econômico também são evidentes, uma vez que a obtenção de etanol a partir da cana de açúcar coloca o Brasil em uma posição privilegiada na eliminação do uso de derivados de petróleo, diminuindo a dependência do país em relação aos outros solventes e pode ser facilmente recuperado, para posterior reutilização no processo (CARVALHO, 2001).

O etanol pode ser uma alternativa ao processo de extração, pois apresenta características físico-químicas que favorecem a extração. Do ponto de vista

ambiental, o etanol é produzido a partir de fontes renováveis, é um solvente que não gera resíduos tóxicos e apresenta pouco risco de manuseio por possuir menor grau de inflamabilidade (RODRIGUES, 2011).

A extração convencional do óleo é feita utilizando hexano como solvente, por ser o solvente orgânico mais seletivo, possuir estreita faixa de ebulição e ser imiscível com a água, o que evita misturas azeotrópicas (MORETTO; FETT, 1998), além de ser de baixo custo. Portanto, o clorofórmio pode ser substituído pelo hexano tornando o método menos agressivo ao analista e ao meio ambiente.

Devido aos riscos potenciais do clorofórmio à saúde, misturas de solventes contendo alceno: álcool: água, tais como hexano e isopropanol, com ou sem água, têm sido usadas com sucesso para extrair lipídeos dos tecidos (HARA & RADIN, 1978; RADIN, 1981). Hexano-isopropanol (3:2, v/v) (GUNNLAUGSDOTTIR; ACKMAN, 1993); (UNDELAND et al., 1998) heptano-etanol-água-sódio dodecilsulfato (1:1:1, v/v/v) (BURTON et al., 1985), cloreto de metileno-metanol (2:1, v/v) (SWACZYNA; MONTAG; SOARES et al., 1992) e hexano-acetona (1:1, v/v) (HONEYCUTT et al., 1995) são combinações de solventes utilizados para extrair lipídeos a partir de materiais biológicos.

Estudar a viabilidade técnica do emprego de solventes substitutos para processos de extração de óleos de matrizes sólidas, sob a ótica da gestão ambiental, pode incorporar novos saberes técnicos, além de produzir potencialmente um diferencial de competitividade. Para extrair os lipídeos dos tecidos, é necessário encontrar solventes que não só irão dissolver os lipídeos prontamente, mas irão superar as interações entre os lipídeos e a matriz tecidual. Vários solventes ou combinações de solventes têm sido sugeridos como extratores de lipídeos (RADIN, 1981).

2.3.7 Equilíbrio líquido-líquido de três componentes

Processos como a extração são caracterizados pelo contato entre duas ou mais fases que estão, inicialmente, deslocadas do equilíbrio. O equilíbrio de partição atinge uma condição de equilíbrio nas quantidades de solutos disponíveis na matriz e o solvente. Na extração líquido-líquido ocorre a partição do soluto (espécie que se

deseja extrair) entre matriz alimento e um solvente. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações (PRAUSNITZ, LICHTENTHALER; DE AZEVEDO, 1998; SMITH, VAN NESS; ABBOTT, 2000).

Pode-se observar através das relações de fases, em um sistema em equilíbrio, que alguns pares de líquidos puros, quando misturados em proporções apropriadas a certas temperaturas e pressões, não formam apenas uma fase líquida homogênea, mas duas fases líquidas com diferentes composições. Este fato acontece devido ao estado bifásico ser mais estável que o estado monofásico. Se estas fases estão em equilíbrio, então o fenômeno é chamado equilíbrio líquido-líquido (ELL) importante para a realização de muitas operações industriais como a extração de compostos de interesse, no caso, componentes lipídicos (SMITH et al., 2000).

Usualmente, os dados de equilíbrio líquido-líquido são representados em um gráfico denominado diagrama ternário (Figura 5). Estes gráficos representam isotermas em pressão suficiente para manter o sistema inteiramente líquido. O uso de tais diagramas demonstra as relações de fase nos sistemas líquidos ternários (SMITH et al., 2000).

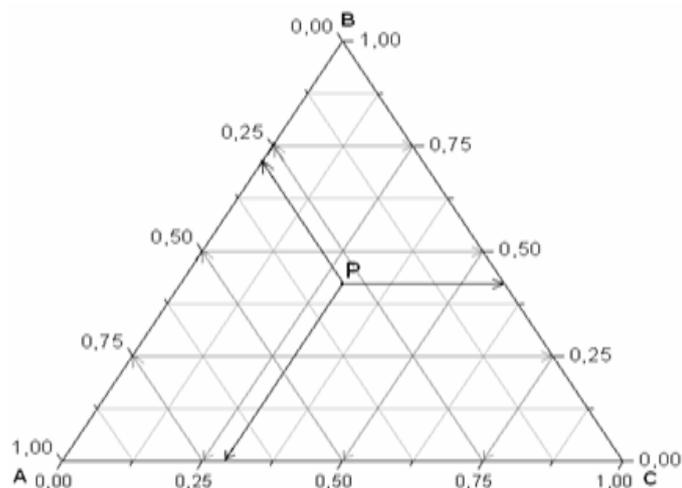


Figura 5 - Diagrama Ternário

Fonte: TREYBAL, 1968.

Segundo Treybal (1968), as distâncias do ponto P aos lados do triângulo correspondem às frações molares (ou mássicas) dos componentes. Os vértices do triângulo são os pontos com 100% da mistura que representam os compostos puros e, as arestas, as misturas binárias.

Os sistemas de importância são os em que ocorre imiscibilidade; assim, para o equilíbrio líquido-líquido, o interesse está na parte onde ocorre formação de um sistema bifásico da mistura, na qual o sistema homogêneo é instável, ou seja, no qual não é possível a coexistência dos três componentes em uma única fase, ocorrendo a separação do sistema em duas fases. Logo, existem faixas de composições nas quais o sistema permanece em uma única fase líquida, região monofásica. A linha no diagrama triangular, que separa essas regiões, é designada curva binodal ou curva de solubilidade, que pode ser visualizada na Figura 6 (HACKBART, 2007).

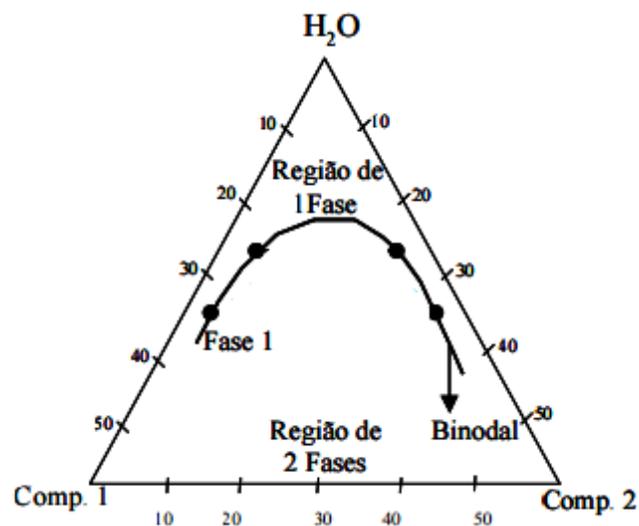


Figura 6 - Diagrama de fases expresso em coordenadas triangulares.

Fonte: ALBERTSSON, 1986.

Pelo diagrama de fases, representam-se as composições dos sistemas em que ocorre, ou não, a separação de fases, isto é, em qual composição global o sistema encontra-se bifásico ou monofásico. Os três vértices do triângulo equilátero representam, respectivamente, os componentes puros. Os lados do triângulo representam sistemas binários, constituídos pelo componente 1 + água, componente 1 + componente 2, componente 2 + água. Os pontos internos do triângulo representam misturas dos três componentes (SMITH et al., 2000).

Diferentes métodos são utilizados para construir um diagrama de fase. Um desses métodos é a titulação turbidimétrica, também denominada determinação do ponto de nuvem. Neste método parte-se de uma solução com solventes miscíveis (água e etanol) e adiciona-se, em gotas, o solvente parcialmente miscível ou imiscível (hexano). Após a adição de cada gota a solução é misturada completamente. O aparecimento de turbidez (ponto de nuvem) indica que o sistema passou para a região bifásica. Conhecendo-se as concentrações iniciais das soluções e as quantidades de solvente adicionadas, o primeiro ponto sobre a curva binodal pode ser determinado (ALBERTSSON, 1986; WALTER et al., 1985; ZASLAVSKY, 1995).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos peixes e preparo dos resíduos

As tilápias inteiras foram obtidas de uma indústria processadora de pescado localizada na cidade de Fartura, na região sul do Estado de São Paulo, no mês de setembro de 2014. Tilápias com peso aproximado de $571 \pm 23,5$ g foram coletadas no início da manhã e submetidas à hipotermia (imersão em água gelada, na proporção 1:1 água: gelo). Os peixes foram transportados ao Laboratório de Pescado do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da ESALQ-USP, em caixas de isopor com tampa, acomodados em camadas de gelo na proporção 1:1 (peixe: gelo). A distância aproximada, percorrida entre a unidade processadora e o Laboratório foi de 300 km. Os peixes foram eviscerados e filetados, sendo os filés destinados a outras pesquisas. O resíduo, constituído de cabeças, carcaça (ou espinhaço) e vísceras, foi moído em separado para cada um dos três constituintes e armazenado em saco de polietileno sob congelamento a -180C .

3.2 Preparo e caracterização da matriz para as análises

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras, no Laboratório de Pescado e na Planta Piloto de Pescado do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” - ESALQ-USP (Piracicaba – SP).

O resíduo (composto por amostras separadas de cabeça, vísceras e carcaça) foi a matriz para a realização das extrações dos lipídeos (Figura 7).

O resíduo foi processado em moedor elétrico utilizando disco de 4 mm para a obtenção de uma massa básica homogênea. Esse homogeneizado constituiu as amostras de carcaça, cabeça e vísceras do presente trabalho.



Figura 7 - Matriz de resíduos de tilápia, composta de cabeça, vísceras e carcaça.

3.3. Métodos

3.3.1. Umidade

Baseia-se na quantificação da massa da amostra dessecada final obtida pela perda de água por evaporação em estufa a 105°C (AOAC, 1995).

Para o cálculo de determinação da umidade utilizou-se a fórmula:

$$\text{Matéria Seca} = 100 \times \frac{(\text{Peso recipiente} + \text{Amostra pós estufa}) - (\text{Tara recipiente})}{\text{Peso amostra (g)}}$$

$$\% \text{ Teor de Água} = 100 - \text{Matéria Seca}$$

3.3.2 Extração de lipídeos pelo método de Soxhlet

Empregou-se o método de Soxhlet, segundo a IUPAC 1.122 com *n*-hexano (faixa de ebulição 68-70°C), seguida da sua remoção por evaporação (IUPAC, 1979).

Foram pesados 5 g de cada amostra triturada e homogeneizada, em placa de Petri. O material dessecado foi transferido para o cartucho de extração, com auxílio de um chumaço de algodão desengordurado e levemente umedecido de *n*-hexano.

A amostra foi coberta, no cartucho, com este chumaço de algodão. As extrações foram realizadas em períodos de 6 h, em aparelho de Soxhlet com n-hexano como solvente de extração. Balões foram utilizados no aparato e o volume de solvente usado para cada extração foi de aproximadamente 170 mL. Após o término do período de extração, o solvente foi eliminado em evaporador rotativo a 40-45°C. Os valores foram apresentados em base úmida para efeito de comparação.

3.3.3 Extração de lipídeos pelo o método de Bligh & Dyer

Bligh & Dyer (1959) descreveram a extração de lipídeo utilizando 100 gramas de arenque e elevada quantidade de solvente, tornando o método de alto custo e com dificuldade na manipulação. Alguns laboratórios aperfeiçoaram a técnica reduzindo o volume em dez vezes, tornando duvidosa a remoção total dos lipídeos. Desta forma, duas determinações lipídicas foram realizadas buscando comparar a extração de lipídeos utilizando 10 e 100 gramas da amostra.

Para a extração dos lipídeos segundo o método de Bligh & Dyer (1959), foram pesados aproximadamente 10 g de cada amostra úmida, moída e homogeneizada previamente. Em um Erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 20 mL de metanol, 10 mL de clorofórmio e 10 mL de água. Iniciou-se a homogeneização por 2 min em Erlenmeyer de 250 mL dotado de tampa de vidro, com uma mistura de solvente consistindo de 10 mL de clorofórmio e 20 mL de metanol. Após completa homogeneização, uma única fase foi obtida e procedeu-se à adição de mais 10 mL de clorofórmio, seguida de agitação por 30 s e mais 10 mL de água destilada seguida de agitação por mais 30 s. Filtrou-se a mistura a vácuo e o resíduo tissular foi re-homogeneizado com 3 lavagens com 5 mL de clorofórmio. Os filtrados foram combinados e seguiu-se o procedimento original. A solução com a amostra foi transferida para um funil de separação e o procedimento original foi obedecido. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para as amostras de 100 g, no Erlenmeyer de 1000 mL foram adicionados 200 mL de metanol, 100 mL de clorofórmio e 100 mL de água. Iniciou-se a homogeneização por 2 min em Erlenmeyer de 1000 mL com tampa de vidro, com uma mistura de solvente consistindo de 100 mL de clorofórmio e 200 mL de metanol. Após completa homogeneização, uma única fase foi obtida e procedeu-se

à adição de mais 100 mL de clorofórmio, seguida de agitação por 30 s e mais 100 mL de água destilada seguida de agitação por mais 30 s. Filtrou-se a mistura a vácuo e o resíduo tissular foi re-homogeneizado com 3 lavagens com 5 mL de clorofórmio. Os filtrados foram combinados e seguiu-se o procedimento original. A solução com a amostra foi transferida para um funil de separação e o procedimento original foi obedecido. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A extração foi realizada para valores de massa das amostras diferentes, porém foram mantidas as proporções massa: volume de solvente.

A alta umidade da matéria-prima favorece a utilização do método com extração por solvente á frio (método de Bligh; Dyer), pois a extração do material lipídico independe da umidade e acidez da amostra. O método de Bligh & Dyer pode ser usado para alimentos secos ou para produtos com altos teores de água (como peixes, vegetais verdes, por ex.). Além disso, ao não empregar fontes de aquecimento durante o processo de extração a agressão sofrida pelas estruturas dos ácidos graxos é minimizada, pois quanto maior o índice de insaturação dos ácidos graxos, menor sua estabilidade oxidativa, conseqüentemente o material perde qualidade com maior facilidade (LAGO; ANTONIASSI, 2000).

3.3.4 Extração de lipídeos com o método de Hara & Radin

Para a extração do óleo da fase etanol e água pelo método de HARA & RADIN (1978), a solução foi misturada com 20 mL de isopropanol. Em seguida, foram adicionados 30 mL de n-hexano. A mistura foi filtrada a vácuo para garantir a separação mais eficiente da parte sólida. O filtrado foi transferido para um funil de separação ao qual foram adicionados 30 mL da solução de sulfato de sódio (0,5 mol/L). Procedeu-se agitação rigorosa até repouso completo. Retirou-se a fase superior, fase rica em n-hexano e depois foi feita a evaporação do solvente em evaporador rotativo. O balão foi pesado e determinou-se o teor de lipídeo extraído. A extração de cada amostra foi realizada em duplicata.

O rendimento em lipídeos foi obtido calculando a diferença entre o peso final do balão e o peso do balão inicial.

3.4 Rendimento da extração das soluções propostas

O rendimento em lipídeos do material retido no filtro e seco após a separação de fases foi determinado segundo a metodologia de Soxhlet (item anterior número 3.3.2).

Os lipídeos na fase etanol-água foram recuperados e tiveram seu teor total determinado utilizando o método de Hara & Radin (item anterior número 3.3.4).

3.5 Dados de equilíbrio

Os dados de equilíbrio foram coletados nas temperaturas de 30°C, com o intuito de estudar o comportamento de fases do sistema hexano: etanol: água. Com os dados obtidos foi construído o gráfico de equilíbrio e a partir dele, procedeu-se à otimização da separação dos componentes (hexano, etanol e água).

Para definir o sistema de equilíbrio, na forma de um diagrama ternário, foram realizados testes preliminares, que consistiram de titulações com os solventes para a construção da curva binodal.

3.5.1 Construção das curvas de solubilidade

Os reagentes utilizados foram de grau analítico de alta pureza. O hexano 95% foi da marca TEDIA (HPLCQ/SPECTRO), o etanol 99,9% da marca Panreac (UV-IR-HPLC) e água ultrapura filtrada em sistema Milli-Q®.

As determinações das curvas de solubilidade binodais foram conduzidas por meio do ponto de turbidez. Visualmente, o ponto de névoa, verificado pela turbidez da mistura etanol e água, foi determinado gotejando o terceiro composto (hexano) através de uma bureta. Quando se detectou a turbidez da mistura, esperou-se um período de 10 minutos a fim de verificar a permanência da turbidez, confirmando a obtenção do ponto da curva binodal (JORQUEIRA et al., 2015). Esse procedimento foi repetido quinze vezes para determinação da curva de solubilidade.

Após determinação do teor de água dos resíduos iniciou-se a titulação. Resíduo com teor de água de aproximadamente 50 %, para o sistema hexano-etanol- água, em cada célula foi adicionado um volume inicial de 5 mL de água e 1

mL de etanol. Para teor de água de 60% foi adicionado inicialmente 6 mL de água e 1 mL de etanol em cada célula. Posteriormente, foi gotejado o hexano até a obtenção do ponto de névoa. O ponto de névoa foi identificado como o momento em que o sistema passava de límpido para turvo, quando era anotado o volume de hexano coletado na célula de equilíbrio. O gotejamento foi feito utilizando uma bureta de 50 mL.

Os pontos da curva binodal foram determinados por titulação. A titulação foi realizada com hexano adicionado à célula de equilíbrio, gota a gota, até o turvamento da solução (Figura 8).

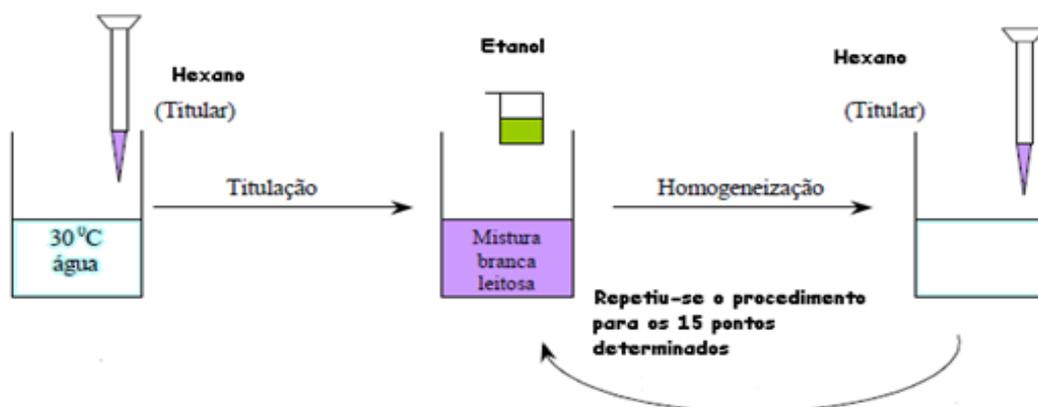


Figura 8 - Procedimento para determinação dos pontos de construção da curva de equilíbrio líquido-líquido.

Com base no esquema apresentado na Figura 8, foram definidos os pontos da curva binodal, a partir da qual foram definidas as melhores soluções para a extração líquido-líquido dos lipídeos presentes nos resíduos de pescado.

3.5.2 Obtenção das Curvas Binodais

Os resultados experimentais para definir o sistema de equilíbrio hexano-etanol- água foi tratado na forma de diagrama ternário, sendo possível visualizar a fase monofásica e bifásica, separadas pela curva binodal.

Trabalhou-se com massa (método gravimétrico) ao invés de volume (método volumétrico) para uma maior precisão na preparação de todas as soluções

necessárias durante o experimento. Portanto, foi utilizada uma equação na etapa de determinação das curvas binodais para obter a massa do componente usado na titulação de acordo com a temperatura de aproximadamente 30°C no momento da titulação.

O volume do componente adicionado foi transformado em massa pela sua densidade, cujo valor foi verificado na literatura. Para a construção das curvas binodais, as massas foram transformadas em frações mássicas como segue:

$$w_i = \frac{m_i}{m_1 + m_2 + m_3}$$

em que w_i é a fração mássica do componente i , m_i é a massa do componente i , m_1 é a massa do hexano, m_2 é a massa do etanol e m_3 a massa da água.

A partir dos dados de frações mássicas dos componentes foi possível construir as curvas binodais (Figura 9). A curva em vermelho foi obtida com amostras com 50% de teor de água e a curva em azul com 60% de teor de água. Pode-se observar que as curvas se apresentam muito próximas, com isso considerou-se apropriado o uso da curva de 50% de teor de água, uma vez que o aumento do teor de água deve diminuir o poder extrativo da mistura, pois aumenta a polaridade da solução, diminuindo a interação com o óleo a ser extraído.

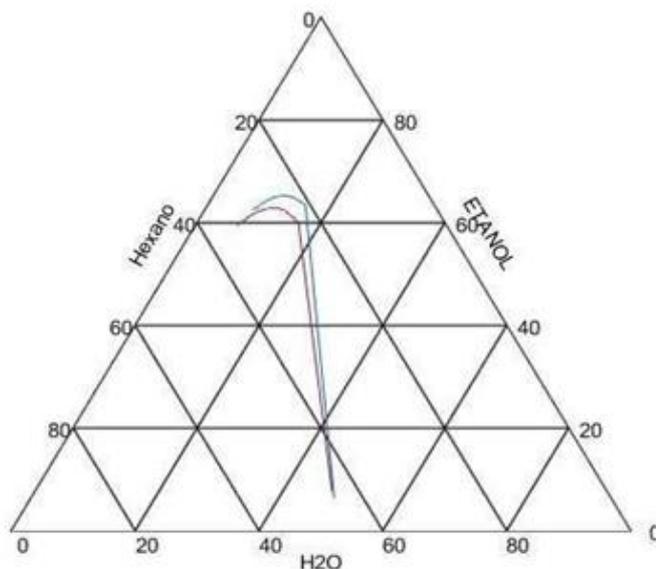


Figura 9 - Curvas binodais para os resíduos com 50% (linha vermelha) e 60% (linha azul) de teor de água e as misturas de hexano, etanol e água.

Os testes de solução de hexano- etanol- água para a extração quantitativa dos lipídeos presentes em resíduos de filetagem de tilápias seguiram as proporções calculadas com base nas curvas binodais (Figura 9) para que haja inicialmente a formação de um sistema monofásico que se torna bifásico, no qual ocorre a separação das fases, e o óleo pode ser recolhido na fase mais apolar.

3.5.3 Construção das curvas de solubilidade da mistura hexano- etanol- água

Após a construção das curvas de solubilidades (50% e 60% de teor de água) apresentadas na figura 9, as misturas de solvente (hexano- etanol- água) testadas para a extração quantitativa dos lipídeos presentes em resíduos de processamento de tilápias estão apresentadas na Tabela 3. Os volumes finais de solução extratora foram sempre de 400 mL para 50 g de amostras frescas, constituídas de cabeça, carcaça ou vísceras.

Tabela 3 - Composição (% v/v) das soluções extratoras de lipídeos de amostras de resíduos de tilápia

Solução	Hexano	Etanol	Água
1	10	70	20
2	20	50	30
3	30	30	40
4	40	10	50

Os cálculos realizados permitiram inferir que as composições das soluções extratoras correspondem aos pontos da região monofásica, no diagrama ternário indicado na Figura 10.

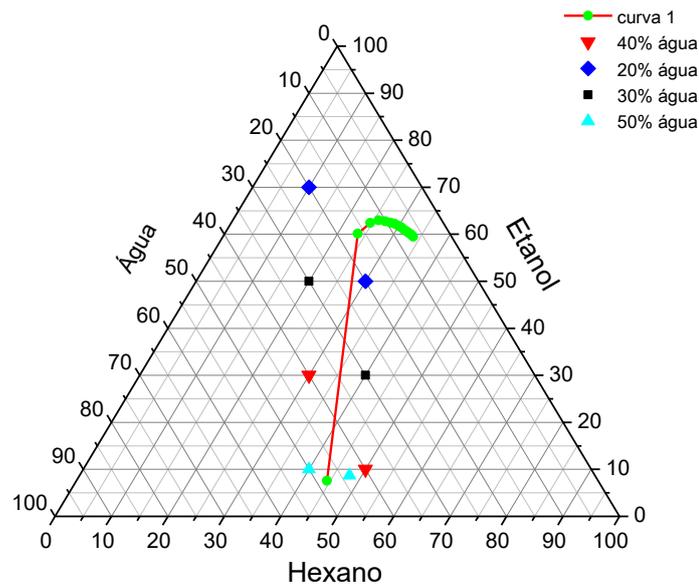


Figura 10 - Curva binodal de mistura hexano- etanol- água para extração de lipídeos.

Depois de definidas as zonas bifásicas e monofásicas, a escolha das composições das soluções extratoras na região monofásica foi baseada na proximidade com a curva binodal, o que após a etapa de extração pode ser deslocada para região bifásica pela adição de um dos componentes (água, hexano ou etanol).

Inicialmente foram elaboradas as misturas extratoras segundo a proporção dos volumes indicados na Tabela 4.

Tabela 4 - Volumes (mL) de hexano: etanol: água de misturas extratoras de lipídeos em amostras de resíduos de tilápia

Solução	Hexano	Etanol	Água
1	40	280	55
2	80	200	95
3	120	120	135
4	160	40	175

Em um Erlenmeyer de 250 mL, mantido em banho termoestabilizado, à amostra descongelada e triturada (50 g), adicionou-se 125 mL da solução extratora e procedeu-se à agitação à temperatura de extração de 30°C por 20 min. O líquido foi decantado e transferido para um balão de separação de 500 mL.

Repetiu-se a operação por mais duas vezes com volumes de 125 mL em cada uma. Ao final, juntaram-se todos os extratos no mesmo balão de separação, ao qual foram adicionados diferentes volumes e proporções de água e hexano (Tabela 5), de forma a induzir a separação de fases e produzir os pontos de mistura ternária do diagrama. Essa adição extra de solventes pouco influenciou no rendimento de lipídeo extraído.

Tabela 5 - Volumes (mL) de hexano e água das soluções extratoras para separação de fases

Solução	Hexano	Água
1	0	25
2	50	30
3	60	0
4	60	0

O sistema foi agitado durante 0,5-1 min. Após separação das fases, coletando a fase inferior (água + etanol) para ser novamente lavada com hexano para arrastar o residual de lipídeos da fase etanol- água.

Em balão de fundo chato, evaporou-se a fase superior em evaporador rotativo (45°C – 50°C, 600 mm Hg). O balão foi pesado e determinou-se a quantidade de lipídeos extraídos como apresentado em seguida. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Para o cálculo de rendimento de lipídeos utilizou-se a fórmula:

$$\text{Rendimento de lipídeos (\%)} = \frac{(\text{Peso final balão} - \text{Peso balão tarado}) \times 100}{\text{Massa da amostra úmida (g)}}$$

Após a extração, o material desengordurado retido no filtro foi levado à estufa para secagem (100–110°C durante 8 h) seguida da determinação de lipídeos conforme descrito no item 3.3.2.

3.6. Determinação dos lipídeos por CCD

A identificação das classes de lipídeos arrastados para a fase solvente durante as extrações foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), no modo de adsorção em gel de sílica (FUCHS et al., 2011).

Os lipídeos extraídos foram diluídos em hexano volumes de 10 μ L para lipídeos da cabeça e das vísceras, e em etanol volumes de 20 μ L para os lipídeos da carcaça foram aplicados em placa de sílica, com espaçamento de 1 cm entre as amostras e a uma distância de 1cm da base da placa. Testes preliminares determinaram separação ótima entre bandas do lipídeo extraído. Foram utilizadas duas fases móveis: fase 1, contendo proporções de 60: 30: 5 clorofórmio:metanol:água ; e fase 2, em proporções 80: 20: 1,5 hexano:éter:ácido acético. Foram utilizados o gliceril monononadecanoato (NU-CHEK PREP, Minnesota, U.S.A), o gliceril dinonadecanoato (NU-CHEK PREP, Minnesota, U.S.A), o óleo de soja e a lecitina como padrões de monoagliceróis, diacilgliceróis, triacilgliceróis e de fosfolipídeos, respectivamente, o que confirmou a disposição das bandas de interesse nas placas para que não fosse necessária a utilização destes padrões durante as análises. A identificação dos compostos foi determinada pelo fator de retenção (R_f), o qual é a razão entre a distância percorrida pela substância em questão e a distância percorrida pela fase móvel e é característica de cada composto e sua interação com a fase móvel.

Para cada amostra foram realizados dois desenvolvimentos: inicialmente com a fase móvel 1 até o ponto X da placa (Figura 11), visando a separação das classes de lipídeos polares. Em seguida, foi feita a corrida com a fase móvel 2 até o ponto Y, para separação das classes de lipídeos apolares.

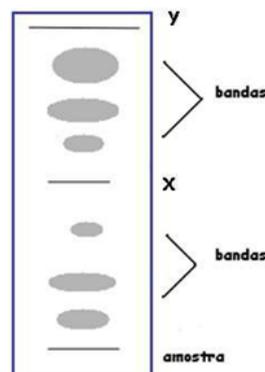


Figura 10 – Ilustração da placa de CCD

Após o término da eluição, com até 60% do comprimento da placa percorridos pela frente do solvente, e posterior secagem sob exaustor de ar em capela, a placa foi colocada em uma cuba fechada contendo pérolas de iodo elementar para que as bandas dos compostos sofressem ligeira pigmentação. O tempo de permanência da placa na cuba de pigmentação foi de aproximadamente 4 min, suficiente para a visualização de bandas de leve coloração amarelada. As regiões de interesse foram delineadas com lápis e a placa colocada em estufa a 90°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) durante 1 h para total eliminação de traços de iodo e solventes.

A aplicação das amostras ocorreu de forma ordenada (de esquerda a direita da placa) de acordo com a marcação carcaça, cabeça e víscera.

Através da coloração das placas, a identificação das classes de lipídeos foi realizada por meio de comparação entre os Rf dos padrões e das amostras (Figura 12).

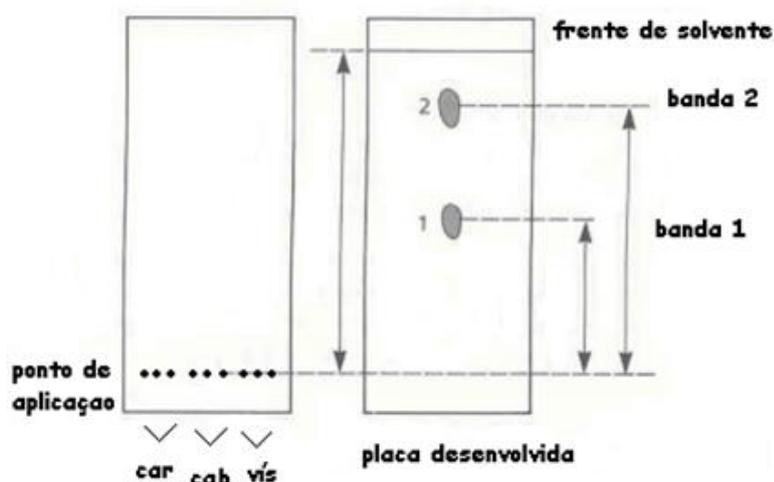


Figura 12 - Placa de CCD desenvolvida

3.7 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com os tratamentos e três repetições. O teste de Tukey foi aplicado para determinar a diferença entre médias de rendimento de extração (%) ao nível de 5% de significância através do programa ASSISTAT (2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos resíduos

O resíduo da filetagem é composto por $37,2 \pm 5,3$ % de cabeça, $45,7 \pm 5,1$ % de carcaça e $17,0 \pm 1,9$ % de vísceras.

O rendimento da cabeça, da carcaça e das vísceras dos peixes pode variar em função de alguns fatores como: espécie, tamanho do peixe, sexo, tipo de corte, época de abate, destreza do filetador, dentre outros. Os rendimentos são calculados em porcentagem em relação ao peso do resíduo por animal.

O teor de água e de lipídeos da cabeça, carcaça e vísceras, estão apresentados na Tabela 6. O método Soxhlet foi utilizado para determinação da quantidade de gordura presente na cabeça, carcaça e vísceras após remoção da água, o que levou a seleção principalmente de lipídeos apolares. Já o método de Bligh & Dyer extraiu todas as classes de lipídeos presentes na cabeça, carcaça e vísceras (polares e apolares) do material sem sofrer desidratação. Como relatado por Randall et al. (1991) e apresentado na Tabela 6, a utilização de diferentes métodos de extração resulta em rendimentos diferentes e também em classes de lipídeos diferentes extraídas.

Tabela 6 - Teor de água e lipídeos das amostras de cabeça, carcaça e vísceras em matéria úmida

Amostras	Teor de água (g/100g)	Teor de lipídeos (g/100g)	
		Soxhlet**	Bligh & Dyer**
Cabeça	$60,04 \pm 0,52$	$18,73 \pm 0,48$	$17,80 \pm 0,51$
Carcaça	$57,67 \pm 2,04$	$18,36 \pm 0,30$	$16,26 \pm 0,37$
Vísceras	$50,55 \pm 0,56$	$42,31 \pm 0,50$	$50,88 \pm 2,00$

*Os resultados estão apresentados em valores médios de triplicata \pm desvio padrão.

**Os resultados apresentados estão em valores de base úmida.

Apesar das vísceras representarem uma fração minoritária nos resíduos de tilápia (17% em comparação com 45,7% para a carcaça e 37,2% para a cabeça), estas são os mais ricos em lipídeos. Este conteúdo diferenciado em lipídeos proporcionou rendimentos também diferenciados nos ensaios posteriores

em função da afinidade dos compostos com os solventes. Embora, partes da carcaça e da cabeça apresentem considerável quantidade de tecido adiposo, os tecidos viscerais podem apresentar um acúmulo maior de gordura da região abdominal.

No tocante à cabeça e carcaça, podem-se adicionar outros fatores que interferem na baixa eficiência da extração do óleo, tais como sua estrutura fibrosa, temperatura de extração, tamanho das partículas e relação massa de sólido:solvente.

4.3. Extração do óleo com os sistemas de solventes selecionados

A fim de projetar o processo de extração líquido-líquido, foi necessário investigar a solubilidade mútua dos compostos do sistema, sendo necessária a elaboração de diagramas de fases. Pelos diagramas de fase foi possível identificar e descrever as condições da separação de fase dos líquidos com relação às suas composições e temperatura envolvida na mistura em equilíbrio.

As condições experimentais para a extração de lipídeos foram baseadas na tentativa de encontrar as proporções de hexano e etanol que renderiam uma extração quantitativa. Os solventes foram misturados em proporções nas quais, os sistemas ternários foram formados com a água contida nas amostras, como mostra o diagrama de fases (Figura 10). Depois de determinadas as zonas bifásicas e monofásicas, a escolha das composições das soluções extratoras (na região monofásica) a serem testadas, foram baseadas na proximidade com a curva binodal, o que após a etapa de extração, pode ser deslocada para a região bifásica, pela adição de pequenas quantidades de solvente (água, hexano ou etanol) possibilitando a separação entre fase aquosa e a fase orgânica (hexano), sendo que esta última concentra a maior parte do óleo extraído (CAETANO, 2003).

A fase orgânica (hexano + óleo) foi concentrada para a recuperação do óleo e cálculo de rendimentos da extração.

As extrações foram realizadas segundo o descrito no item 3.5.2 utilizando as soluções extratoras apresentadas na Tabela 3. A cada solução, denominou-se de ensaio a série de testes feitos. Os solventes foram misturados em proporções tais

que, com a água das amostras, as misturas ternárias foram formadas, tendo composições como as mostradas no diagrama de fases da Figura 10.

A sequência com que os solventes são adicionados ao meio de extração é também importante. No primeiro instante (adição de hexano, etanol e água) ocorre a quebra das ligações entre os constituintes da célula, em que os lipídeos estão dissolvidos em um sistema monofásico. Em seguida, a adição de mais solventes promove a formação de um sistema bifásico com a transferência dos compostos apolares para a fase orgânica. Como interferência provável do tipo de resíduo sobre a eficiência da extração, Smedes & Thomasen (1996) salientaram duas possibilidades: 1) adsorção dos lipídeos; 2) absorção da fase orgânica contendo os lipídeos pelo tipo de tecido presente.

As Figuras 13, 14 e 15 apresentam as fases separadas da extração do óleo de vísceras, carcaça e cabeça com solução que maior rendimento apresentou para cada material.



Figura 13 - Etapas da extração dos lipídeos das vísceras, sendo da esquerda para a direita o coletado da extração inicial após filtração, a fase hexano contendo os lipídeos e o lipídeo extraído.



Figura 14 - Etapas da extração dos lipídeos da carcaça, sendo da esquerda para a direita o coletado da extração inicial após filtração, a fase hexano contendo os lipídeos e o lipídeo extraído.



Figura 15 - Etapas da extração dos lipídeos da cabeça, sendo da esquerda para a direita o coletado da extração inicial após filtração, a fase hexano contendo os lipídeos e o lipídeo extraído.

Os métodos, que são baseados na mistura binária, têm a capacidade de extrair, com eficiência, tanto os lipídeos neutros quanto os lipídeos mais polares. Lipídeos apresentam uma grande faixa de hidrofobicidade; os mais neutros estão ligados covalentemente e podem ser extraídos dos tecidos por solventes apolares, enquanto lipídeos mais polares, que estão ligados por forças eletrostáticas e pontes

de hidrogênio, requerem solventes polares capazes de quebrar estas ligações e liberá-los (BRUM; REGITANO-D´ARCE, 2009).

Neste trabalho utilizou-se a metodologia original (100 g) e modificada (10 g) de Bligh & Dyer (1959) para comprovar a similaridade na remoção dos lipídeos em relação a quantidade de amostra utilizada, e também como parâmetro de referência para comparação de eficiência envolvendo as soluções de extração via hexano-etanol- água. Conforme demonstrado nas Tabelas 7, 8 e 9, o rendimento de lipídeos na fase hexano não diferiu estatisticamente entre a metodologia original (100 g) e modificada (10 g) de Blilgh & Dyer (1959) para a carcaça, cabeça e vísceras, restando no filtro, quantidades de lipídeos que variaram de 1 a 6 g/ 100g. Estas soluções comprovaram que são reproduzíveis os valores de teor de lipídeos pela redução de amostra e volume de solvente proporcionalmente. Além disso, dos resultados apresentados nestas tabelas depreendem-se a influência que as diferentes proporções dos solventes (hexano, etanol e água) exercem sobre a remoção dos lipídeos extraídos.

Ao observar a Tabela 7, nota-se que a solução 2 (1: 2,5: 1,1875 hexano: etanol: água) apresentou o maior rendimento na extração para a carcaça (29,12 g). Porém, quando feita a verificação do elevado teor de lipídeos residuais na carcaça retida no filtro da solução 2 (4,19 g) e o elevado valor de lipídeos retidos na fase etanol água (5,17 g), pode-se concluir que o sistema de extração não foi satisfatório devido a ineficiência na separação de fases por conta da proporção dos solventes. Além disso, a somatória de lipídeos extraídos (38,48 g) ultrapassou os valores obtidos com as extrações feita por Soxhlet e por Bligh & Dyer, o que sugere que além dos lipídeos, outros componentes não lipídicos foram removidos. De fato, em processo de extração, quanto maior o volume dos solventes com a polaridade mais acentuada, como o etanol e a água, maior deve ser o rendimento em compostos polares, como por exemplo, os fosfolipídeos, proteína e carboidratos, os quais estão geralmente presentes nas membranas celulares (lipídeos ligados).

Tabela 7 - Rendimento de lipídeos totais por 100g de amostra úmida da carcaça extraída por metodologias diferentes e lipídeos remanescentes na carcaça utilizada nas soluções de extrações (g/ 100g de amostra)

Metodologias	Lipídeos (g)			
	Fase hexano	Sólidos retidos no filtro	Fase etanol + água	Total
Soxhlet	18,36 ^b ± 0,30	-	-	18,36 ^c ± 0,30
B & D (10g)	15,06 ^{cd} ± 0,68	6,35 ± 1,84	-	23,15 ^b ± 1,41
B & D (100g)	16,26 ^c ± 0,37	2,28 ± 0,03	-	18,55 ^c ± 0,35
1 (1: 7: 1,375)	14,13 ^d ± 0,82	4,76 ± 1,41	0,77 ± 0,17	19,66 ^{bc} ± 2,22
2 (1: 2,5: 1,1875)	29,12 ^a ± 0,24	4,19 ± 1,44	5,17 ± 0,55	38,48 ^a ± 1,68
3 (1:1: 1,125)	11,72 ^e ± 0,48	3,23 ± 2,05	2,63 ± 0,23	17,58 ^c ± 1,73
4 (1: 2: 1,375)	1,98 ^f ± 0,30	2,40 ± 1,08	0,32 ± 0,15	4,7 ^d ± 0,90

*Os resultados estão apresentados em valores médios de triplicata ± desvio padrão

**Os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey

***Resultados apresentados em massa úmida

A proporção 1: 7: 1,375 hexano- etanol- água, que correspondeu à solução e 1, apresentou o melhor resultado em remoção dos lipídeos (14,13 g) não diferindo estatisticamente do método modificado de Bligh & Dyer (15,06 g). Apesar do método proposto com a solução 1 não ter removido completamente os lipídeos da carcaça (4,76 g no sólido), a quantidade de lipídeos retido na fase etanol e água foi de somente 0,77 g, menor do que 1 % da amostra úmida, o que indicou devida separação das fases líquido-líquido.

Similarmente ao observado com a solução 2 da carcaça (Tabela 7), nota-se na Tabela 8 que a solução 1 (1: 7: 1,375 hexano: etanol: água) para a cabeça apresentou elevada remoção de lipídeos (26,39 g) indicando a extração de componentes não lipídicos, uma vez que ultrapassou os valores obtidos com as extrações feita por Soxhlet e por Bligh & Dyer.

Tabela 8 - Rendimento de lipídeos totais por 100g de amostra úmida da cabeça extraída por metodologias diferentes e lipídeos remanescentes na cabeça utilizada nas solução de extrações (g/ 100g de amostra)

Metodologias	Lipídeos (g)			
	Fase hexano	Sólidos retidos no filtro	Fase etanol + água	Total
Soxhlet	18,73 ^{ab} ± 0,48	-	-	18,73 ^{bc} ± 0,48
B & D (10g)	17,34 ^b ± 0,92	4,35 ± 1,70	-	21,69 ^b ± 1,70
B & D (100g)	17,80 ^b ± 0,51	2,95 ± 0,93	-	20,75 ^{bc} ± 1,03
1 (1: 7: 1,375)	20,48 ^a ± 0,17	5,39 ± 0,79	0,52 ± 0,06	26,39 ^a ± 0,65
2 (1: 2,5: 1,1875)	14,69 ^c ± 1,1	3,28 ± 1,30	0,35 ± 0,17	18,32 ^c ± 2,09
3 (1:1: 1,125)	14,59 ^c ± 0,64	2,27 ± 0,68	1,11 ± 0,27	17,97 ^c ± 0,37
4 (1: 2: 1,375)	9,41 ^d ± 0,76	3,04 ± 0,34	1,41 ± 0,34	13,86 ^d ± 0,58

*Os resultados estão apresentados em valores médios de triplicata ± desvio padrão

**Os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey

***Resultados apresentados em massa úmida

A extração dos lipídeos com a solução 2 para a cabeça apresentou o melhor rendimento (14,69 g) apresentando também, quantidades bastante reduzidas de lipídeos na fase etanol e água (0,35 g). Entretanto, ajustes devem ser feitos para aumentar o rendimento alcançando valores próximos aos encontrados pelo método de Soxhlet e Bligh & Dyer, uma vez que as soluções 1, 2, 3 e 4 diferiram estatisticamente entre si e com os métodos de Soxhlet e Bligh & Dyer.

A Tabela 9 apresenta os rendimentos de lipídeos determinado nas vísceras. As soluções 1 (1: 2: 1,375 hexano: etanol: água) e 4 (4: 1: 4,375 hexano: etanol: água) apresentaram os maiores rendimentos na extração para as vísceras de 47,90 g e 47,63 g, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre si. Porém, quando feita a comparação do teor de lipídeos retidos na fase etanol-água entre as soluções 1 (3,97 g) e 4 (1,58), pode-se concluir que o sistema de extração da solução 4 apresentou maior eficiência na separação dos componentes polares e apolares.

Tabela 9 - Rendimento de lipídeos totais por 100g de amostra úmida das vísceras extraída por metodologias diferentes e lipídeos remanescentes nas vísceras utilizadas nas soluções de extrações (g/ 100g de amostra)

Metodologias	Lipídeos (g)			
	Fase hexano	Sólidos retidos no filtro	Fase etanol + água	Total
Soxhlet	42,31 ^d ± 0,50	-	-	42,31 ^{bc} ± 0,50
B & D (10g)	50,26 ^{ab} ± 0,26	1,03 ± 0,04	-	51,29 ^a ± 0,23
B & D (100g)	50,88 ^a ± 2,00	4,27 ± 0,42	-	55,15 ^a ± 1,68
1 (1: 7: 1,375)	47,90 ^{bc} ± 1,02	2,66 ± 1,08	3,97 ± 0,66	54,53 ^a ± 2,39
2 (1: 2,5: 1,1875)	37,26 ^e ± 0,20	4,54 ± 2,47	3,42 ± 0,33	45,22 ^b ± 2,69
3 (1:1: 1,125)	37,25 ^e ± 0,05	1,12 ± 0,15	1,01 ± 0,00	39,38 ^c ± 0,16
4 (1: 2: 1,375)	47,63 ^c ± 0,70	1,99 ± 2,52	1,58 ± 0,11	51,2 ^a ± 2,65

*Os resultados estão apresentados em valores médios de triplicata ± desvio padrão

**Os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Tukey

***Resultados apresentados em massa úmida

Em suma, a proporção 1: 7: 1,375 hexano: etanol: água (solução 4), apresentou o melhor resultado em remoção total dos lipídeos (51,2 g) não diferindo estatisticamente do método de Bligh & Dyer original (55,15 g) e modificado (51,29 g).

Ao verificar rendimentos mais elevados para a solução 1 da cabeça, solução 2 da carcaça e solução 4 das vísceras, contudo, ainda é necessária uma verificação da identidade desses compostos, se lipídica ou não. A solução 1 da cabeça e as soluções 1 e 3 da carcaça não diferiram significativamente na eficiência da metodologia de Soxhlet (1879), rendendo resultados que não ficaram aquém do esperado, quando comparados aos obtidos com as metodologias tradicionais. Estes resultados são promissores, uma vez que os métodos propostos poderão auxiliar na extração e avaliação da qualidade de lipídeos de resíduos de tilápia.

A mistura de três solventes de diferentes polaridades, proporcionou a remoção de lipídeos em resíduo de tilápia de forma satisfatória, uma vez que o hexano é apolar e não tem a mesma eficiência para extrair os lipídeos ligados em proteínas e carboidratos como outros solventes de maior polaridade (etanol e a água) (UNDELAND et al., 1998). Portanto, o bom rendimento em lipídeos totais, nas soluções realizadas, pode ser explicado pela ampla faixa de polaridade apresentada pela mistura de solventes utilizada. Clorofórmio e metanol são mais polares que -hexano e etanol, entretanto, há uma extração eficiente de lipídeos polares e apolares com a mistura n-hexano e etanol, com as proporções mantidas dos volumes totais de cada solução existente no sistema ternário formado pela mistura dos solventes, e incluindo a água tissular do alimento estudado. Isso pôde ser verificado pelas placas de cromatografia de camada delgada (CCD) em que apresentaram as mesmas classes lipídicas para os métodos de Bligh & Dyer e o proposto (item 4.4).

4.4 Separação das classes lipídicas extraídas dos resíduos por CCD

Indrasena et al. (2005) analisaram qualitativa e quantitativamente os lipídeos de óleo de peixe por meio de cromatografia de camada delgada (CCD) com detecção por ionização de chama durante o processo de transesterificação. Os autores obtiveram como resposta picos com as classes dos lipídeos neutros (triacilgliceróis, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres e ésteres etílicos).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma técnica de adsorção líquido-sólido. Nesse caso, a separação se dá pela diferença de afinidade dos componentes de uma amostra dissolvida na fase móvel pela fase estacionária, no caso, a sílica (COLLINS et al., 1995).

As fases estacionárias mais usadas são extremamente polares, não devendo, por isso, serem utilizados solventes pouco polares, que não removem os compostos do ponto de aplicação, nem solventes muito polares, capazes de arrastar os componentes da amostra até o topo da placa. Em vista disso, melhores resultados são obtidos com misturas de solventes, de modo a se obter uma polaridade média em relação à polaridade dos componentes da amostra.

Nos estudos de KUPKE; ZEUGNER (1978), os lipídeos do plasma sanguíneo foram separados por CCD e identificados de acordo com suas classes (Figura 16). Utilizando alternadamente as fases móveis clorofórmio- metanol- água nas proporções de 60:30:5 e hexano: éter dietílico: ácido acético (80:20:1.5), os autores identificaram bandas de ésteres de colesterol, triacilgliceróis, ácidos graxos livres, colesterol livre e fosfolipídeos. Assim, a separação e identificação das classes de lipídeos de tilápia desse estudo foram baseadas nos achados de KUPKE & ZEUGNER (1978).

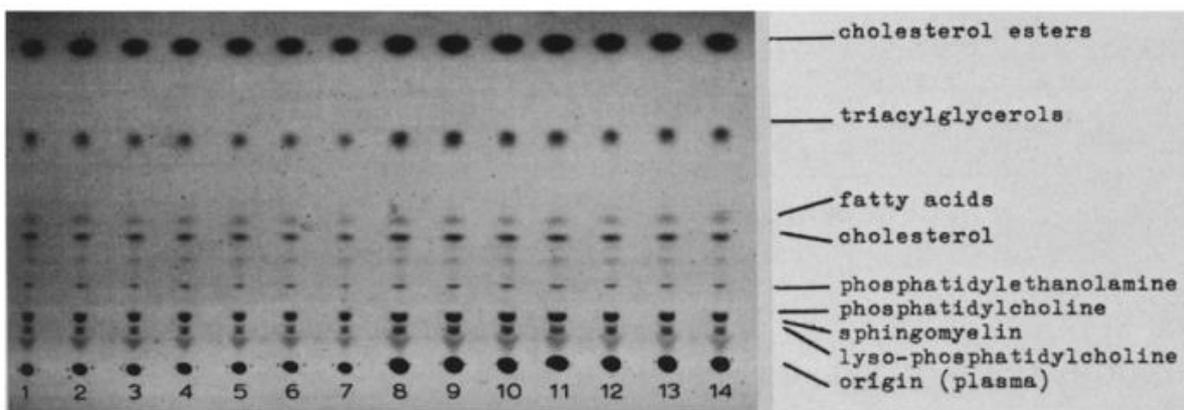


Figura 17 - Separação de lipídeos do plasma através de CCD de alta eficiência.

Inicialmente, uma placa foi preparada com padrões para identificação das diferentes misturas do éster, mono, di e triglicerídeos (Figura 17), cujos Rf foram utilizados para identificação das manchas nas placas das amostras com as soluções propostas.

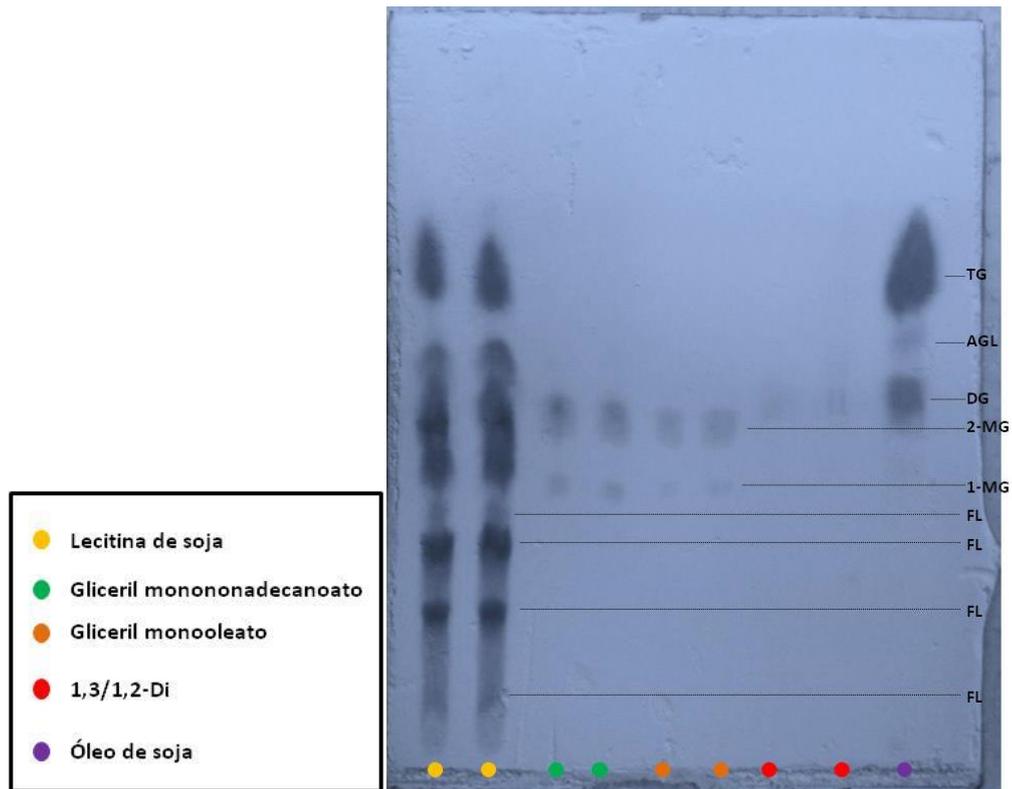


Figura 17 - Placa de CCD com os padrões de mono (MG), di (DG) e triacilgliceróis (TG), ácidos graxos livres (AGL) e fosfolipídeos (FL) desenvolvida em solventes clorofórmio: metanol: água (60:30:5) (fase 1) e hexano: éter: ácido acético (80:20:1,5) (fase 2)

A placa de CCD permitiu visualizar o desempenho na extração dos compostos lipídicos pela solução 1 após o desenvolvimento das fases móveis 1 e 2 (Figura 18).

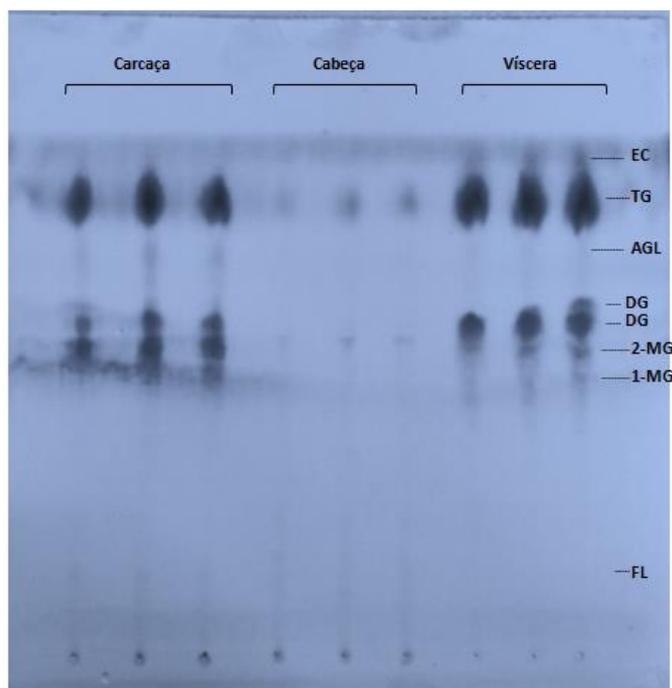


Figura 18 - Placa de CCD com os lipídeos da carcaça, cabeça e vísceras extraídas com a solução 1, desenvolvida em solventes clorofórmio: metanol: água (60:30:5) (fase 1) e hexano: éter: ácido acético (80:20:1,5) (fase 2)

As extrações da solução 1 foram realizadas com hexano: etanol: água (1: 7: 1,375), na qual a proporção de solventes polares é maior que a do solvente apolar. Consequentemente, é nítida a presença de lipídeos polares nas amostras de carcaça, cabeça e víscera (Figura 18). A extração dos compostos apolares como os triglicerídeos ocorreu para as amostras da carcaça e vísceras, mas em quantidade reduzida para a cabeça. Porém, ésteres de colesterol puderam ser visualizados com nitidez para a amostra das vísceras. Isto indica que o solvente utilizado possui afinidade pela classe de compostos (lipídeos) extraída, aliada a capacidade de penetração do solvente na matriz da amostra.

Ainda em relação à solução 1, a carcaça e as vísceras apresentaram um ótimo rendimento se comparados aos resultados obtidos com a extração por Bligh & Dyer (Tabela 9). Já a cabeça, apresentou rendimento superior ao Bligh & Dyer, mas isso não significou ótimo rendimento em lipídeos, uma vez que os triglicerídeos quase não aparecem na placa. O alto rendimento verificado para a cabeça com a solução 1 pode ser justificado pela extração de compostos não lipídicos, como proteínas e outros componentes celulares presentes na amostra em questão.

A placa de CCD permitiu visualizar o desempenho da solução 2 das amostras após o desenvolvimento das fases 1 e 2 (Figura 19).

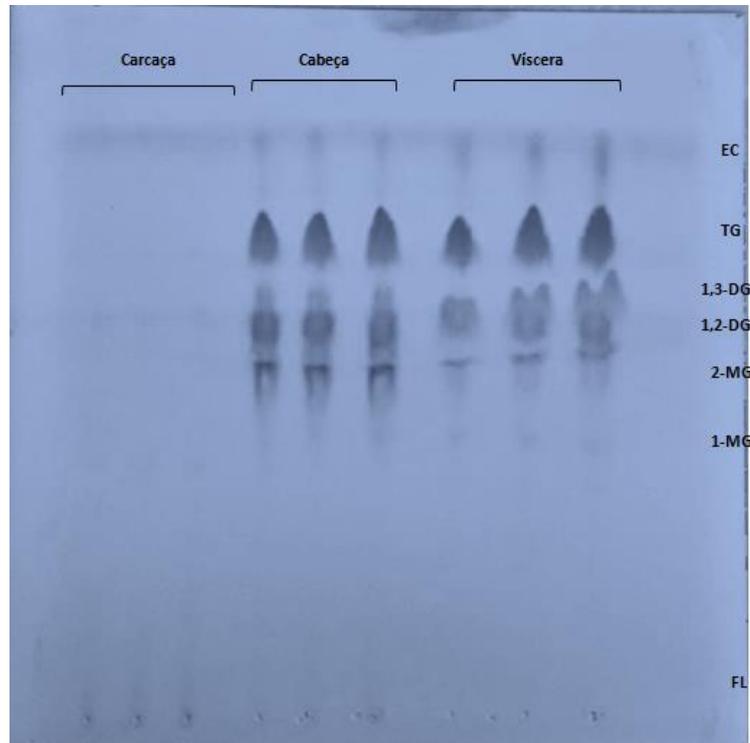


Figura 19 - Placa de CCD com os lipídeos da carcaça, cabeça e vísceras extraídas com a solução 2, desenvolvida em solventes clorofórmio: metanol: água (60:30:5) (fase 1) e hexano: éter: ácido acético (80:20:1,5) (fase 2)

As extrações realizadas com a solução 2 ocorreram com hexano: etanol: água (1: 2,5: 1,1875), cuja proporção de solventes polares também é maior que a do solvente apolar é ainda maior do que a solução 1. A extração dos fosfolipídeos não ocorreu para as amostras carcaça, cabeça e víscera (Figura 19). Já a extração dos lipídeos que possuem maior afinidade com o solvente apolar ocorreu somente para amostras da cabeça e das vísceras, apresentando um bom rendimento em triacilgliceróis e ésteres de colesterol.

Ainda em relação à solução 2, a cabeça e as vísceras apresentaram um rendimento razoável se comparados aos resultados obtidos com a extração feita por Bligh & Dyer (Tabela 9). Já a carcaça, segundo esta mesma tabela, apresentou rendimento superior ao Bligh & Dyer, mas isso não significou ótimo rendimento em lipídeos, como pode ser comprovado pela análise já comentada. A interação da carcaça com a solução 2 não foi eficiente para extrair lipídeos e o rendimento alto

da extração também pode ser justificado pela extração de compostos não lipídicos, como proteínas e outros componentes celulares presentes na amostra em questão uma vez que a proporção de etanol na solução 2 é a maior se comparada às outras soluções em relação à proporção de hexano.

A placa de CCD permitiu visualizar o desempenho da solução 3 das amostras após o desenvolvimento das fases 1 e 2 (Figura 20).

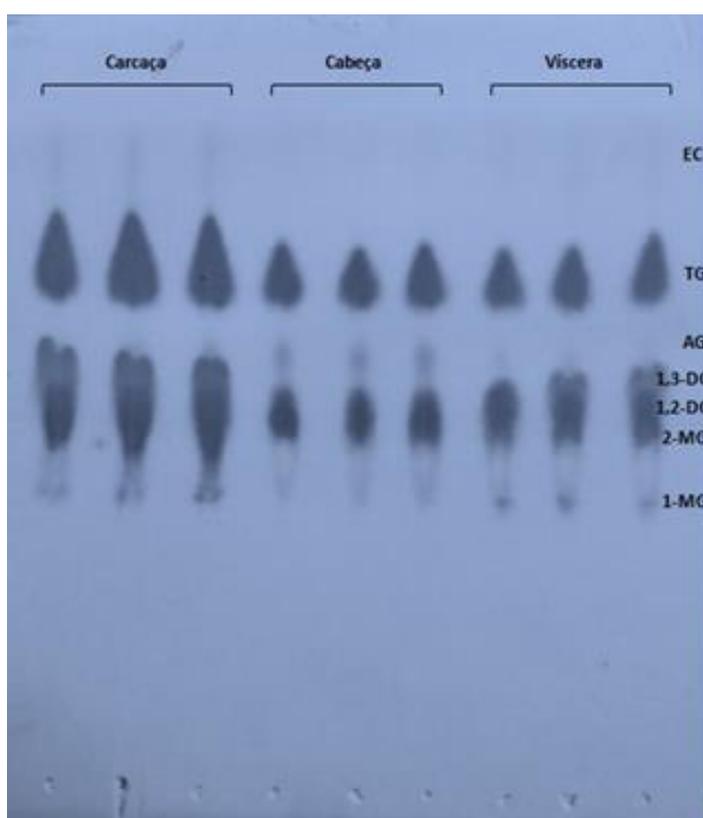


Figura 20 - Placa de CCD com os lipídeos da carcaça, cabeça e vísceras extraídas com a solução 3, desenvolvida em solventes clorofórmio: metanol: água (60:30:5) (fase 1) e hexano: éter: ácido acético (80:20:1,5) (fase 2)

As extrações realizadas com a solução 3 ocorreram com hexano: etanol: água (1:1:1,125), em que a proporção de solventes polares também é maior que a do solvente apolar. A extração de fosfolipídeos não ocorreu para as amostras carcaça, cabeça e vísceras, ao contrário dos lipídeos apolares. As três amostras apresentaram um bom rendimento aparente em triacilgliceróis, porém ésteres de colesterol apareceram em menor proporção.

Na comparação destes resultados com os da Tabela 9, verifica-se que as três amostras apresentaram um rendimento inferior comparados com os resultados obtidos com a extração feita por Bligh & Dyer, deduzindo-se que a solução não foi tão eficiente quanto a solução 1 na extração dos lipídeos da carcaça e das vísceras e da solução 2 para a cabeça.

A placa de CCD permitiu visualizar o desempenho da solução 4 das amostras após o desenvolvimento das fases 1 e 2 (Figura 21).

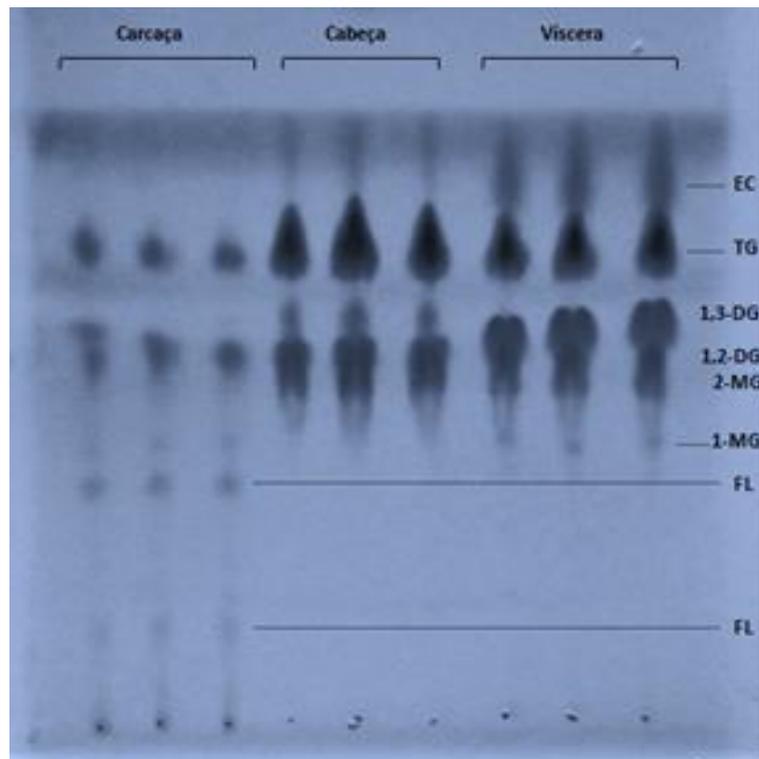


Figura 21 - Placa de CCD com os lipídeos da carcaça, cabeça e vísceras extraídas com a solução 4, desenvolvida em solventes clorofórmio: metanol: água (60:30:5) (fase 1) e hexano: éter: ácido acético (80:20:1,5) (fase 2)

As extrações realizadas com a solução 4 ocorreram com hexano: etanol: água (4:1:4,375), em que a proporção de solventes polares também é maior que a do solvente apolar. A extração de fosfolipídeos não ocorreu para as amostras cabeça e vísceras, porém esses compostos podem ser observados para a carcaça. Já a extração dos lipídeos apolares ocorreu para todas as amostras, sempre com eficiência inferior à encontrada com o método de Bligh & Dyer, explicando inclusive o baixo rendimento encontrado para a carcaça na Tabela 9.

A Figura 22 apresenta a placa de cromatografia de camada delgada para a extração realizada segundo Bligh & Dyer para uma melhor visualização dos estudos comparativos entre as extrações realizadas.

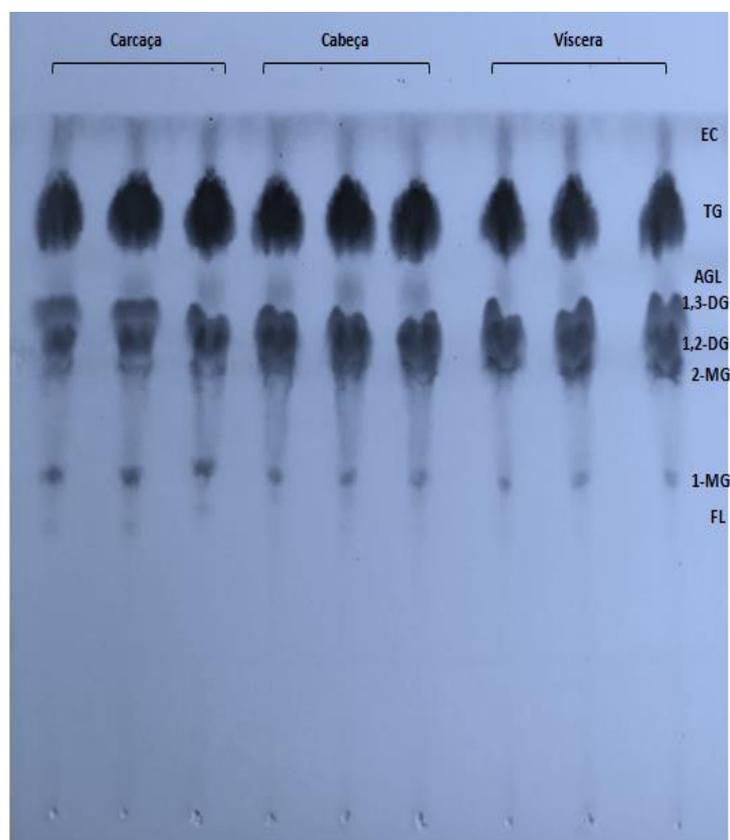


Figura 22 - Placa de CCD com os lipídeos da carcaça, cabeça e vísceras extraídas segundo Bligh & Dyer, desenvolvida em solventes clorofórmio: metanol: água (60:30:5) (fase 1) e hexano: éter: ácido acético (80:20:1,5) (fase 2)

Através da observação da placa contendo as amostras obtidas segundo Bligh & Dyer, pode-se constatar a robustez desta metodologia em extrair, de forma eficiente, as diferentes classes de lipídeos para todas as amostras do estudo. No entanto, as bandas de fosfolipídeos não podem ser visualizadas com nitidez, o que sugere que a combinação de solventes utilizadas nesta metodologia possui afinidade inferior, em comparação às soluções estudadas neste trabalho, com essa classe de lipídeos.

Ao longo do estudo, foram observadas, para todas as amostras, bandas correspondentes aos produtos de degradação, por hidrólise, de triacilgliceróis, ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis. No entanto, como anteriormente

discutido, o objetivo do estudo do poder extrator das diferentes combinações de hexano: etanol: água foi, principalmente, a obtenção de triglicérides.

A cromatografia em camada delgada foi uma ferramenta que permitiu ilustrar o desempenho variado entre as misturas de solventes testadas na obtenção das diferentes classes de lipídeos, aliado a utilização de solventes menos tóxicos para o analista e o ambiente.

Em suma, partindo-se do pressuposto que o método foi proposto a partir das soluções de misturas ternárias, as soluções que apresentaram o melhor equilíbrio dos solventes, sem afetar a separação dos lipídeos foram a solução 1 para a carcaça, a solução 2 para a cabeça e a solução 4 para as vísceras se comparados com os resultados obtidos pelo Bligh & Dyer.

5 CONCLUSÕES

A metodologia a ser escolhida para a extração da fração lipídica de uma determinada matriz pode afetar a quantidade dos lipídeos extraída.

As proporções dos solventes utilizados nas extrações influenciaram a eficiência da extração, de acordo com as especificidades e interações nas diferentes matrizes analisadas.

O solvente para extração de óleo de um tecido animal deve ser escolhido conforme as características intrínsecas da matriz. A extração eficiente de lipídeos requer que o solvente, ou mistura de solventes, penetrem nas membranas dos lipídeos e que possuam polaridade correspondente aos compostos específicos que fazem parte da matriz.

Os extratos obtidos com hexano- etanol- água apresentaram rendimento eficiente em lipídeos totais e capacidade de extrair os componentes lipídicos polares das amostras analisadas. As proporções hexano, etanol e água que melhor resultaram rendimentos satisfatórios quando comparados à metodologia tradicional do Bligh & Dyer foram de 1: 7: 1,375 (solução 1) para a carcaça, de 1: 2,5: 1,1875 (solução 2) para a cabeça e de 4: 1: 4,375 (solução 4) para as vísceras se comparados com os resultados obtidos pelo Bligh & Dyer. Portanto, ao avaliar métodos que utilizam solventes menos tóxicos do que clorofórmio e metanol, uma substituição do método de Bligh & Dyer (1959) apresenta-se viável.

A otimização deste método analítico alternativo, via utilização da mistura ternária hexano- etanol- água, torna-o aplicável para extração de lipídeos em tecidos animais, substituindo os solventes tóxicos clorofórmio e metanol.

Os resultados obtidos assinalaram novas informações sobre o aproveitamento da fração lipídica dos resíduos seletivos provenientes do peixe tilápia do Nilo que, poderão subsidiar ações úteis de manejo do descarte do processamento para o setor industrial.

O melhor aproveitamento dos lipídeos a serem extraídos da matriz resíduos de peixes é altamente justificável, pois trará vantagens econômicas à processadora e ao colaborar para mitigar o problema de eliminação de resíduos, material impactante ao meio ambiente, propicia à indústria, o status de empresa ecoeficiente.

REFERÊNCIAS

ADEOTI, I.A.; HAWBOLDT, K. A review of lipid extraction from fish processing by product for use as a biofuel. *Biomass and Bioenergy*, v.63, p.330-340, 2014.

AKOH, C.C.; MIN, D.B. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology (Food Science & Technology)*. 3rd ed. CRC Press, 2008. 930p.

ALBERTSSON, P-A. Partition of cell particles and macromolecules. Separation and purification of biomolecules, cell organelles, membranes, and cells in aqueous polymer two-phase systems and their use in biochemical analysis and biotechnology, 1v. 1986.

AOAC - American Oil Chemists' Society. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists' Society. 4 th ed. (A.O.C.S. Official Method Ce 1-62: Fatty acid composition by gas chromatography); 1995. 1v.

AOAC – Association Analytical Chemists. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 16th ed. Washington: AOAC, 1995.1v.

AQUA FEED, 2015. Disponível em: <http://editorastilo.com.br/revista-aqua-feed/item/4148-piscicultura-pode-alcancar-960-mil-toneladas-em-2022>. Acesso em: 20 mar. 2016.

AQUA FEED, 2015. FAO projeta aumento no crescimento da aquicultura. Disponível em: <http://editorastilo.com.br/revista-aqua-feed>. 2.ed. Acesso em: 22 mar. 2016.

ARDILA, Y.C. Sistemas de extração líquido – líquido para processos de purificação de biodiesel. 2009. 174p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 10004: Resíduos sólidos: classificação. 2004. vip. 71p.

BANCO DO NORDESTE. Manual de impactos ambientais. Orientações básicas sobre aspectos ambientais de atividades produtivas. Banco do Nordeste, 1999.297p.

BIMBO, A.P.; CROWTHER, J.B. Fish Oils: Processing Beyond Crude Oil. Infofish International, Kuala Lumpur, v.4, n.6, p. 20-24. 1991.

BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian Journal of Biochemistry and Physiology, v. 37, n.8, p. 911-917, 1959.

BOSCOLO W.R.; HAYASHI, C.; SOARES, C.M. Desempenho e características de carcaça de machos revertidos de tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), linhagens tailandesa e comum, nas fases iniciais e de crescimento. Revista Brasileira de Zootecnia, v. 30, n. 5, p. 1391-1396, 2001.

BOSCOLO, W.R.; FEIDEN, A. Industrialização de tilápias. Toledo: GFM Gráfica & Editora, 2007. 272p.

BRAEKKEN O.R. A comparative study of vitamins in the trunk muscles of fishes. Rep. Technology Resources Norw. Fish. Industry, v. 3, n. 8, p. 1-51. 1959.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA, 2014). Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao>. 2014. Acesso em: jun. 2015.

BRASIL. MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA (MPA, 2015). Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao>. Acesso em: jun. 2015.

BRUM, A.A.S. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica. 2004. 66p. Dissertação (Mestrado em Óleos e Gorduras) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, 2004.

BRUM, A.A.S.; ARRUDA, L.F.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, v.32, n.4, p. 849-854, 2009.

CAETANO, T. Estudo da miscibilidade do etanol com componentes do diesel e biodiesel. 2003. 103p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, – SP, 2003.

CARVALHO, L.C.C. Álcool do Brasil: energia limpa e renovável. *Agroanalysis*, v. 21, n. 9, p.213-224, 2001.

CECCHI, M.H. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2.ed. : Editora UNICAMP, 2003. 207p.

CHOU, R.L.; SU, M.S.; CHEN, H.Y. Optimal dietary protein and lipid levels for juvenile cobia (*Rachycentron canadum*). *Aquaculture*, v. 193, n. 1, p. 81-89, 2001.

CONTRERAS-GUZMÁN, E.S. Bioquímica de Pescados e Derivados. p. 315-330. 1994.

COWEY, C.B.; SARGENT, J.R. Nutrition. In: HOAR, W.S.; RANDALL, D.J.; BRETT, J.R. (Ed). *Fish Physiology*, v.8: Bioenergetics and growth. Academic Press, 1979. p. 1-69.

CRAWFORD, A.M.C.D. Seleção e preparo de alimentos. Rio de Janeiro: Record, 1985. 383p.

CREXI, V.T.; MONTE, M.L.; SOARES, L.A.S.; PINTO L.A.A. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Food Chemistry*, v. 119, p. 945–950, 2010.

CYRINO, JEP. Regulação nutricional do alimento. SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE NUTRIÇÃO DE PEIXE E CRUSTÁCEOS, v. 1, p. 69-91, 1995.

DAUKSAS, E.; FALCH, E. ; SLIZYTE, R.; RUSTAD, T. Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 8, p. 2659–2670, 2005.

DE BOER, J. Chlorobiphenyls in bound and non-bound lipids of fishes; Comparison of different extraction methods. *Chemosphere*, v. 17, n. 9, p. 1803-1810, 1988.

DELBEKE, K.; TEKLEMARIAM, T.; DE LA CRUZ, E.; SORGELOOS, P. Reducing the variability in pollution data: the use of lipid classes for normalization of pollution data in marine data. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 58, n. 1/4, p. 147-162, 1995.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations). CWP manual de normas de pesca de estatística. 2013. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics>. Acesso em: fev. 2016.

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations). . Roma;The State of World Fisheries and Aquaculture, 2012.1V

FAO - Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (Food and Agriculture Organization of the United Nations). The State of World Fisheries and Aquaculture. Rome. 2014.

FEIDEN, A.; BOSCOLO W.R. Óleo e biodiesel de tilápia. In: BOSCOLO W.R.; FEIDEN, A. (Ed.). *Industrialização de tilápias*. Toledo: GFM Gráfica & Editora, 2007. p. 151-164.

FELTES, Maria et al. Alternatives for adding value for the fish processing wastes. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 14, n. 6, p. 669-677, 2010.

FERNANDES, F.A.N.; SANTOS, F.F.P; MALVEIRA J.Q; CRUZ, M.G.A. Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of *Oreochromis niloticus* oil. *Fuel*, v. 89, p. 275–279, 2010.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G.H.S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, v. 226, n. 1, p. 497-509, 1957.

FUCHS, B.; SÜß, R.; TEUBER, K.; EIBISCH, M.; SCHILLER, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography—a review of the current state. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, n. 19, p. 2754-2774, 2011.

GRØGAARD, H. C. Extraction and Analysis of Marine Lipids with Emphasis on Phospholipids Evaluation and Improvement of Methods. *Biotechnology*, v.3, n.1, p.202-258, 2011.

GUERRA, J.; OÑA, M. Obtención de aceite de vísceras de pescado, caracterización de los ácidos grasos presentes y su efecto en la alimentación de pollos parrilleros y trucha arco-íris. 2009. 137p. Trabajo de Conclusão de Curso (Engenharia Agropecuária) – Instituto Agropecuario Superior Andino, Escuela Politécnica del Ejército – ESPE. 2009.

GUNNLAUGSDOTTIR, H.; ACKMAN R. G. Three extraction methods for determination of lipids in fish meal; alternative to chloroform-based methods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 61, n. 2, p. 235-240, 1993.

HACKBART, L.M. Equilíbrio líquido-líquido de sistemas contendo fenol-água-solvente: obtenção e modelagem termodinâmica. 2007. 120p. Dissertação

(Mestrado em Termodinâmica) - Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia, Setor de Tecnologia, 2007.

HALVER, J.E.; HARDY, R.W. Nutrient Flow and Retention. In: HALVER, J. E. ; HARDY, R.W. (Ed.). Fish Nutrition, v. 3, p. 755-770, 2002.

HARA, A.; RADIN, N.S. Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. Analytical Biochemistry, v.90, n.1, p.420-426, 1978.

HENDERSON, R.J.; TOCHER, D.R. The lipid composition and biochemistry of freshwater fish. Journal Progress Lipid Research, v. 20, p. 281-346, 1987.

HERTRAMPF, J.W.; PIEDAD-PASCUAL, F. In: Handbook on Ingredients for Aquaculture Feeds, 2000. p. 338-350.

HONEYCUTT M.E.; MCFARLAND, V.A.; MCSANT. D.D. Comparison of three lipid extraction methods for fish. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 55, n. 3, p. 469-472, 1995.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2015. Disponível em: http://www.cliptvnews.com.br/mma/amplia.php?id_noticia=124257. Acesso em: jun. 2015.

INDRASENA, W.M.; HENNEBERRY, K.;BARROW, C.J.;KRALOVEC, J.A. Qualitative and Quantitative Analysis of Lipid Classes in Fish Oils by Thin-Layer Chromatography with an Introspect Flame Ionization Detector (TLC-FID) and Liquid Chromatography with an Evaporative Light Scattering Detector (LC-ELSD). Journal of liquid chromatography & related technologies, v. 28, n. 16, p. 2581-2595, 2005.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Standard methods for the analysis of oils, fats and derivatives. 6th. ed. Oxford: Pergamon Press, 1979. 170p.

IVERSON, S.J.; LANG, S.; COOPER, M.H. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue. *Lipids*, v. 36, n. 11, p. 1283-1287, 2001.

JABEEN, F.; CHAUDHRY, A.S. Chemical compositions and fatty acid profiles of three freshwater fish species. *Food Chemistry*, v. 125, p. 991–996, 2011.

JOHNSON, E.G.; WATANABE, W.O.; ELLIS, S.C. Effects of dietary lipid levels and energy: protein ratios on growth and feed utilization of juvenile Nassau Grouper fed isonitrogenous diets at two temperatures. *North American Journal of Aquaculture*, v. 64, n. 1, p. 47-54, 2002.

JORQUEIRA, D.S.S.; HOMRICH, P.O.B; CERIANI, R. Densidade, índice de refração e equilíbrio líquido-líquido do sistema modelo óleo de semente de girassol + n-hexanal + lactato de etila a 20°C sob pressão atmosférica. I CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 9, Proceedings... Campinas: Unicamp, 2015. p. 234-245.

KATES, M. *Techniques of Lipidology: Isolation, Analysis and Identification of Lipids*. 1972.172p.

KRIS-ETHERTON, P.M. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*, v. 106, n. 21, p. 2747-2757, 2002.

KRISTINSSON, H.G.; RASCO, B.A. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 40, n. 1, p. 43–81, 2011.

KUBITZA, F.; CAMPOS, J.L. O aproveitamento dos subprodutos do processamento de pescado. *Panorama da Aquicultura*, v. 16, n. 94, p. 23-29, 2006.

LIN, C.; LI, R. Engine performance and emission characteristics of marine fish-oil biodiesel produced from the discarded parts of marine fish. *Fuel Processing Technology*, v. 90, p. 883–888, 2009.

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*, v. 14, n. 1, p. 93-100, 2001.

MARTINO, R.C. Exigências e cuidados da adição de lipídeos em rações para peixes e a sua importância para o homem – Parte 2. *Rev. Panorama da Aqüicultura*, v. 13, n. 75, p. 58-60, 2003.

MARTINS, G.I. Potencial da extração de óleo de peixe para produção de biodiesel. 2012. 213p. Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Energia na Agricultura – PPGEA). Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 2012.

MARTINS, G. I.; SECCO, D.; TOKURA, L.K.; BARICCATTI, R.A.; DOLCI, B.D., SANTOS, R.F. Potential of tilapia oil and waste in biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 42, p. 234-239, 2015.

MARTINS, W.S. Inquérito exploratório referente a geração, armazenamento, transporte e descarte de resíduos em indústrias de pesca do Brasil. 2011. 100p. Dissertação (Mestrado em Indústria de Pesca) – Universidade de São Paulo – Piracicaba, 2011.

MSANGI, S., KOBAYASHI, M., BATKA, M., VANNUCCINI, S., DEY, M. M., & ANDERSON, J. L. Fish to 2030: prospects for fisheries and aquaculture. *World Bank Report*, (83177-GLB). 2013.

MERCER P.; ARMENTA, R.E. Developments in oil extraction from microalgae. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 113, n. 5, p. 539-547, 2011.

MEURER, F., HAYASHI C., BOSCOLO W., SOARES C. M. Lipídeos na Alimentação de Alevinos Revertidos de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*, L.). Revista Brasileira de Zootecnia, v. 31, n. 2, p. 566-573, 2002.

MOLINA, G.E.; MEDINA, R.A.; GIMÉNEZ, G.A. Recovery of algal PUFAs. In: COHEN, Z. Chemicals from microalgae. London: Taylor & Francis, 1999. 155p.

MORAIS, M.M.; PINTO, L. A. A; ORTIZ, S.C.A.; CREXI, V.T.; DA SILVA, R.L.; DA SILVA, J.D. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. Revista Instituto Adolfo Lutz, v. 60, n. 1, p. 23-33, 2001.

MOREIRA, A.B.; SOUZA, N.E.D.; VISENTAINER, J V.; MATSUSHITA, M. Composição de ácidos graxos e teor de lipídeos em cabeças de peixes: matrinxã (*B. cephalus*), piraputanga (*B. microlepis*) e piraicanjuba (*B. orbignyanus*), criados em diferentes ambientes. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2003.145p.

MORETTO, E.; FETT, R.; GONZAGA, L.V.; KUSKOSKI, E.M. Introdução à ciência de alimentos. Editora: UFSC. 255 p. 2002.

NIELSEN, N.S.; GOTTSCHÉ, J.R.; HOLM, J. . Effect of structured lipids based on fish oil on the growth and fatty acid composition in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, v. 250, p. 411-423. 2005.

NORZIAH, M.H.; NURAINI, J.; LEE, K.Y. Studies on the extraction and characterization of fish oil from wastes of seafood processing industry. Asian Journal of Food and Agro-Industry. King Mongkut's University of Technology Thonburi (KMUTT), 2009. p. 959-973.

NUNES, S.B. Estabelecimento de um plano de análise de perigo e pontos críticos de controle (APPCC) para Peixe-Sapo (*Lophius piscatorius*) eviscerado e congelado.2001. 121p. Dissertação (Mestrado Tecnologia de Pescado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: UFSC, 2001.

NUTEC – Fundação Núcleo de Tecnologia industrial do Ceara. NUTEC viabiliza produção de biodiesel de gordura de peixe. Disponível em: Acesso em: 30 maio 2016.

OETTERER, M. Industrialização do pescado cultivado. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200p.

OETTERER, M. Pescado - um alimento importante e nem sempre selecionado e conservado adequadamente. In: RAMIRES, J.A.F (Ed.). Viva com mais saúde. São Paulo: Editora da USP, 2009. p. 37-43.

OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. 2006. p. 99-134.

PESSATTI, M. L. Aproveitamento dos Subprodutos do Pescado: Met 11. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2001. Relatório final d ações prioritárias ao desenvolvimento da pesca e aqüicultura no sul do Brasil, convênio Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA.

PHILLIPS, D.L.; PIRKLE, J.L.; BURSE, V.W.; BERNERT, J.T. JR.; HENDERSON, L. O.; NEEDHAM, L.L. Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: Effects of fasting and feeding. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v 1, p. 495-500. 1989.

PRAUSNITZ, J.M.; LICHTENTHALER, R N. DE AZEVEDO, E.G. Molecular Thermodynamics of Fluid – Phase Equilibria. 3.ed. Pearson Educacion, 1998.

RADIN N. S. Extraction of tissue lipids with solvent of low toxicity. In: LOWENSTEIN, J. (Ed.). Methods of Enzymology, Academic Press,1981. p. 5–7. v.72

RAI AK, SWAPNA HC, BHASKAR N, BASKARAN V. Potential of seafood industry byproducts as sources of recoverable lipids: fatty acid composition of meat and

nonmeat component of selected Indian marine fishes. *Journal Food Biochemistry*, v.36, n.4, p.441, 2012.

RAI, A. K.; BHASKAR, N.; BASKARAN, V. Bioefficacy of EPA–DHA from lipids recovered from fish processing wastes through biotechnological approaches. *Food Chemistry*, v.136, n.1, p. 80-86, 2013.

RANDALL, R.C.; LEE II, H.L.; OZRETCH, R.J.; LAKE, J.L.; PRUELL, R.J. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 10, n. 11, p. 1431-1436, 1991.

RIBEIRO P.A.P.; MELO D.C.; COSTA L.S.; TEIXEIRA E.A. Manejo nutricional e alimentar de peixes de água doce. 2012. p. 19 – 30.

ROBINSON J.S.; MEAD J.F. Lipid absorption and deposition in rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *Canadian Journal of Biochemistry*, v. 51, n. 7, p. 1050-1058, 1973.

RODRIGUES, C.E.C. Utilização de um solvente biorenovável nos processos de extração e desacidificação de óleos vegetais. 2011. 134p. Tese (Livre Docência). Área de concentração: Equilíbrio de fases e Processos de separação na indústria de alimentos. Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos. USP. Pirassununga, 2011.

ROOSE, P.; SMEDES, F. Evaluation of the results of the QUASIMEME lipid intercomparison: The Bligh & Dyer total lipid extraction method. *Marine Pollution Bulletin*, v. 32, n. 8, p. 674-680, 1996.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N., DIEGO, S. M., BELTRÁN, S., JAIME, I., SANZ, M. T., ROVIRA, J. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. *Journal of Food Engineering*, v.109, p. 238–248, 2012.

RUITER, A. Fish and fishery products: composition, nutritive properties and stability. CAB International. 1995. 387p.

SAHENA F, ZAIDUL ISM, JINAP S, JAHURUL MHA, KHATIB A, NORULAINI NAN. Extraction of fish oil from the skin of Indian mackerel using supercritical fluids. *Journal of Food Engineering*, v. 99, n. 1, p. 63-69, 2010.

SANTOS, F.F.P.; MALVEIRA, J.Q.; CRUZ, M.G.A.; FERNANDES, F.A. N. Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of *Oreochromis niloticus* oil. *Fuel*, v. 89, p. 275–279, 2010.

SGARBIERI, V. C. Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações, modificações. Livraria Varela. 1996. 517p.

SHERIDAN, M.A. Effects of thyroxin, cortisol, growth hormone, and prolactin on lipid metabolism of coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, during smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, v. 64, n. 2, p. 220-238, 1986.

SHERIDAN M.A., ALLEN W.V.; KERSTETTER T.H. Seasonal variation in the lipid composition of steelhead trout, *Salmo gairdnerii* Richardson, associated with the parr-smolt transformation. *Journal of Fish Biology*, v. 23, p. 125-134, 1983.

SHERIDAN, M.A. Lipid dynamics in fish: aspects of absorption, transportation, deposition and mobilization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, v. 90, n. 4, p. 679-690, 1988.

SHILO, Moshe; SARIG, Shmuel. Fish culture in warm water systems: problems and trends. CRC press, 1989.

SMEDES, F; THOMASEN T.K. Evaluation of the Bligh and Dyer lipid determination method. *Marine Pollution Bulletin*, v.32, n.8/9, p.681-688, 1996.

SMITH, J.M., VAN NESS, H.C., ABBOTT, M.M. Introdução à termodinâmica da engenharia química 5.ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos. Editora, 2000.

SOUZA, M.L.R.; MACEDO-VIEGAS, E.M. Comparação de quatro métodos de filetagem utilizados para a tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) sobre o rendimento do processamento. Infopesca International, v. 7, p. 26-31, 2001.

STEVANATO, F.B. Aproveitamento de cabeças de tilápias de cativeiro na forma de farinha como alimento para merenda escolar. 2006. 123p. Dissertação de (Doutorado) Universidade Estadual de Maringá, 2006.

STORI, F.T.; BONILHA, L.E.C.; PESSATTI, M.L. Proposta de aproveitamento dos resíduos das indústrias de beneficiamento de pescado de Santa Catarina com base num sistema gerencial de bolsa de resíduos. In:_____ Social, Inst. Ethos de Empresas e Resp. Econômico, Jornal Valor. Responsabilidade social das empresas, 2002.p. 373-406;p. 390-397.

SWACZYNA H.; MONTAG, A. Estimation of cholesterol fatty acid esters in biological materials. Fette Seifen Anstrichmittel. p. 86:436–446, 1992.

TEH CHENG LO, MALCOLM H I BAIRD. Handbook of Solvent Extraction, p.593-597,1991.

THOMAS, P.; MICHAEL M. Tilapia: Life History and Biology, 1999 (Southern Regional Aquaculture Center, Publication, 283).

TREYBAL, R.E. Extracción en fase líquida. Mexico: Union Tipografica Editorial Hispano Americana, 729p. 1968.

UNDELAND I.; HARROD N., LINGNERT H. Comparison between methods using low toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). Food Chemistry, v. 61, p.355–365, 1998.

VIDOTTI, R.M.; BORINI, M.S. M. Aparas da filetagem da tilápia se transformam em polpa condimentada. Panorama da Aquicultura, v. 16, n. 96, p. 38-41. 2006.

VIDOTTI, R.M.; GONÇALVES, G.S. Produção e caracterização de silagem, farinha e óleo de tilápia e sua utilização na alimentação animal. 2006. Disponível em: <http://www.pesca.sp.gov.br>. Acesso em: 15 jan. 2014.

VISENTAINER, J. V., GOMES, S. T. M., HAYASHI, C., SANTOS, O. O., SILVA, A. B. M., JUSTI, K. C.; SOUZA, N. E., MATSUSHITA, M. Efeito do tempo de fornecimento de ração suplementada com óleo de linhaça sobre a composição físico-química e de ácido graxos em cabeças de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 23, n. 3, 2003.

WALTER, H., BROOKS, D., FISHER, D. Partitioning in aqueous twophase systems. Theory, methods, uses and applications to biotechnology. United Kingdom Edition. London: Academic Press, 1985.123p.

WATANABE, T. Lipid nutrition in fish. Comparative Biochemistry and Physiology, v. 73, p. 3-16, 1982.

WILSON, R.P. State of art of warm water fish nutrition. In: AQUICULTURA BRASIL'98, 1. Recife. Anais. Recife: SIMBRAQ, p. 375-380, 1998.

XIAO, L. Evaluation of extraction methods for recovery of fatty acids from marine products [Master's Thesis]. Bjørn Grung: University of Bergen, 2010.

ZASLAVSKY, B.Y. Aqueous two-phase partitioning. Physical Chemistry and Bioanalytical Applications. New York:Marcel Dekker , 1995. 234p.

APÊNDICE

Tabela 10 - Frações mássicas dos componentes da curva binodal do equilíbrio líquido-líquido ternário para o sistema hexano- etanol- água a 30°C, para amostras com 50% de teor de água

Ponto	Hexano	Etanol	H₂O
1	0,4440	0,0758	0,4802
2	0,2359	0,6011	0,1630
3	0,2465	0,6242	0,1293
4	0,2586	0,6295	0,1120
5	0,2714	0,6274	0,1012
6	0,2819	0,6249	0,0932
7	0,2904	0,6225	0,0871
8	0,2998	0,6175	0,0827
9	0,3065	0,6145	0,0790
10	0,3139	0,6097	0,0764
11	0,3198	0,6060	0,0742
12	0,3243	0,6035	0,0722
13	0,3290	0,6005	0,0705
14	0,3326	0,5985	0,0689
15	0,3373	0,5950	0,0678

Tabela 11 - Frações mássicas dos componentes da curva binodal do equilíbrio líquido-líquido ternário para o sistema hexano + etanol + água a 30°C, para amostras com 60% de umidade

Ponto	Hexano	Etanol	H₂O
1	0,4464	0,0644	0,4893
2	0,2077	0,6347	0,1576
3	0,2189	0,6494	0,1316
4	0,2305	0,6530	0,1165
5	0,2414	0,6519	0,1068
6	0,2503	0,6498	0,0999
7	0,2578	0,6474	0,0948
8	0,2656	0,6432	0,0912
9	0,2720	0,6395	0,0886
10	0,2769	0,6369	0,0862
11	0,2823	0,6333	0,0843
12	0,2865	0,6311	0,0825
13	0,2899	0,6292	0,0808
14	0,2924	0,6282	0,0794
15	0,2951	0,6266	0,0783

Tabela 12 - Cálculo da composição da solução da mistura extratora

Solução	Massa amostra (g)	Umidade da amostra (%)	Volume solução (mL)
1	50	50	400
2	50	50	400
3	50	50	400
4	50	50	400
5	50	50	400
6	50	50	400
7	50	50	400

Tabela 13 - Definição da composição (%) da mistura extratora

Etanol	Hexano	Água	Total
70	10	20	100
50	20	30	100
30	30	40	100
10	40	50	100

Tabela 14 - Volume (mL) de cada solvente empregado, levando em consideração a massa e a umidade da amostra

Etanol	Hexano	Água
280	40	55
200	80	95
120	120	135
40	160	175

Tabela 15 - Volume (mL) de cada solvente empregado para a extração da região monofásica

Hexano	Etanol	Água	Total
40	280	80	360
80	200	120	320
180	120	160	280
220	40	200	240