

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

NATALIE PEREIRA TOYAMA

**MINIATURIZAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS EM PEIXES E
INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO EM *Piaractus
mesopotamicus***

MEDIANEIRA

2021

NATALIE PEREIRA TOYAMA

**MINIATURIZAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS EM PEIXES E
INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO EM *Piaractus
mesopotamicus***

**Miniaturization of lipid extraction method in fish and incorporation of
docosahexaenoic acid in *Piaractus mesopotamicus*.**

Trabalho de conclusão de curso de Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Tecnologias Ambientais, do Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais – PPGTAMB – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR – Campus Medianeira.
Discente: Natalie Pereira Toyama
Orientador: Prof. Dr. Adelmo Lowe Pletsch
Coorientador: Prof. Dr. Anderson Coldebella

MEDIANEIRA

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



**Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Campus Medianeira**



NATALIE PEREIRA TOYAMA

**MINIATURIZAÇÃO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS EM PEIXES E INCORPORAÇÃO DO
ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO EM PIARACTUS MESOPÓTAMICUS**

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologias Ambientais da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologias Ambientais.

Data de aprovação: 10 de Agosto de 2021

Prof Adelmo Lowe Pletsch, - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Arcangelo Augusto Signor, Doutorado - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Paraná (Ifpr)

Prof Ismael Laurindo Costa Junior, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 10/08/2021.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela oportunidade de estar firme e forte nesse momento tão difícil ao qual o mundo se encontra. Ao meu avô João de Oliveira Pereira, que me deixou esse ano com muitas lições de vida, por me motivar a ser a primeira na família a se tornar mestre. Meus pais Rosemeire de Souza Pereira e Takeshi Toyama pelo dom da vida, obrigada por serem meus pais e por serem exatamente quem são, sou a mulher que sou graças a tudo o que já fizeram a mim e ao meu mentor, amigo, parceiro MSc. Newmar Wegner, muito obrigada por tudo, pelo incentivo, pelas noites me ajudando na pesquisa, pela paciência nessa jornada, te devo muito.

Ao meu orientador professor Dr. Adelmo Lowe Pletsch pelo estímulo em continuar essa jornada até o final e pelos ensinamentos, ao meu coorientador professor Dr. Anderson Coldebella pela disponibilidade em compartilhar seus conhecimentos.

A professora Dr^a. Marcela Boroski por todo o ensinamento, paciência, incentivo, pela confiança que depositou em mim nesses anos de parceria dentro e fora do laboratório, grande parte de tudo isso é sua responsabilidade.

Aos professores do programa PPGTAMB pelas disciplinas maravilhosas e pelo conhecimento transmitido, acrescentou muito na minha vida pessoal e profissional as disciplinas cursadas.

A banca avaliadora, ao Dr. Ismael Laurindo Costa Junior e ao Dr. Arcangelo Augusto Signor pela disponibilidade em agregar valor ao trabalho. A Dr^a. Priscila Ferri Coldebella auxiliando no tratamento dos dados dos peixes.

Aos parceiros da Itaipu Binacional MSc. Andre Luiz Watanabe, MSc. Simone Frederigi Benassi, Celso Carlos Buglione Neto, Jussara Elias de Souza e Cristiane Fiorentin D Veiga pela confiança essa empreitada, ao pessoal da terceirizada pelo empenho durante o período do projeto na alimentação dos peixes e em todo o suporte realizado.

Aos meus colegas e parceiros de serviço Dr^a. Bianca do Amaral e MSc. Diego Alberto Tavares pelo apoio no laboratório, pelas dicas muito importantes e por aguentarem o cheiro de comida que ficava no laboratório durante a secagem das amostras. A minha ex gerente Nara Gazzola Nami por me disponibilizar tempo para

desenvolver esse trabalho. A minha colega Jessica Froes de Brito Wendt por me ajudar a resolver alguns problemas durante o projeto no laboratório, salvou minha vida e aos demais colegas do programa pela paciência e os momentos compartilhados.

Ao pessoal da UNILA, principalmente a Dr^a Gilcéila Cordeiro e técnica Paula Regina dos Santos a quem sempre me deu forças para continuar a me especializar e jamais desistir.

Ao PTI, Itaipu Binacional e IFPR por me permitir desenvolver esse trabalho tão bonito. A UNILA por me permitir utilizar seus equipamentos.

E a todos que estiveram presentes de maneira direta ou indireta que contribuíram com a realização deste trabalho.

RESUMO

TOYAMA, Natalie Pereira. **Miniaturização de método de extração de lipídios em peixes e incorporação do ácido docosahexaenóico em *Piaractus mesopotamicus***. 2021. 92 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais), Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Medianeira, 2021.

Neste trabalho foi realizado o desenvolvimento e validação interna da metodologia de extração miniaturizada de lipídios em carne mecanicamente separada (CMS) do peixe pacu *Piaractus mesopotamicus*, seguido da análise cromatográfica utilizando um cromatógrafo em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) e utilizando o tricosanoato de metila (C23:0) como padrão interno para quantificação do ácido docosahexaenóico (DHA). Amostras de CMS foram submetidas a estudos prévios, avaliando-se o teor de lipídios das amostras *in natura*, liofilizadas e após secagem em estufa a peso constante. Os lipídios foram extraídos empregando-se o método de referência Bligh e Dyer, foi realizado, a título de comparação das informações obtidas entre métodos, foi observado que em ambos os casos a CMS preparada a 105°C por 24h com peso constante obtiveram os melhores resultados de lipídios extraídos, sendo o miniaturizado de 19,44% ± 0,88 e a quantidade de DHA obtido de 0,042 mg/100g. Testes com porções de solventes diferentes também foram analisados e foi observado que a melhor porção encontrada foi com a mistura diclorometano:metanol (2:1, v/v). O método miniaturizado foi aplicado a matriz Doehlert com as variáveis de massa de amostra e tempo de homogeneização obtendo resultados de um modelo linear com a variável explicável de 96,08%. Após essa etapa, o método de validação para a determinação do DHA foi realizado e os resultados apresentaram excelente desempenho com limites baixos (LOD, LOQ, de 0,0039 mg/100g e 0,0129 mg/100, respectivamente), boa acurácia (entre 90,95%, 96,24% e 102,44%) e precisão (para repetibilidade e precisão intermediária na média de 2,1% e 3,4%, respectivamente), também sendo observada boa seletividade e linearidade. O método miniaturizado foi aplicado a amostra da CMS peixe *Piaractus mesopotamicus* alimentados com 4 níveis diferentes de microalga *Schizochytrium* sp. incorporados a ração e um controle sem a microalga com 550 espécimes distribuídas entres os tanques rede por um período de 60 dias. As coletas dos peixes foram a cada 15 dias e analisada a CMS. O método miniaturizado se apresentou como excelente alternativa para a redução dos reagentes de extração e o tempo de análise em comparação com o método de referência Bligh e Dyer para a CMS do *Piaractus mesopotamicus*. Os resultados obtidos da incorporação da microalga a ração trouxeram que as maiores concentrações de DHA da CMS de *Piaractus mesopotamicus* foi obtido após 45 dias de alimentação nas concentrações de 3 e 4% de inclusão da microalga *Schizochytrium* sp.

Palavra-chave: método de extração; validação; *Piaractus mesopotamicus*; lipídios; ácido docosahexaenóico – DHA.

ABSTRACT

TOYAMA, Natalie Pereira. **Miniaturization of lipid extraction method in fish and incorporation of docosahexaenoic acid in *Piaractus mesopotamicus***. 2021. 92 f. Dissertation (Postgraduate Program in Environmental Technologies), Federal University of Technology – Paraná. Medianeira, 2021.

In this work, the development and internal validation of the methodology of miniaturized extraction of lipids in mechanically separated meat (CMS) of pacu fish *Piaractus mesopotamicus* was carried out, followed by chromatographic analysis using a gas chromatograph with flame ionization detector (GC-FID) and using methyl tricosanoate (C23:0) as an internal standard for quantification of docosahexaenoic acid (DHA). CMS samples were subjected to previous studies, evaluating the lipid content of the samples *in natura*, lyophilized and after drying in an oven at constant weight. The lipids were extracted using the Bligh and Dyer reference method, as a comparison of the information obtained between methods, it was observed that in both cases the CMS prepared at 105°C for 24h with constant weight obtained the best results. results of extracted lipids, being the miniaturized of 19.44% ± 0.88 and the amount of DHA obtained of 0.042 mg/100g. Tests with different solvent portions were also analyzed and it was observed that the best portion found was with the dichloromethane:methanol (2:1, v/v) mixture. The miniaturized method was applied to the Doehlert matrix with the variables of sample mass and homogenization time, obtaining results from a linear model with the explainable variable of 96.08%. After this step, the validation method for the determination of DHA was performed and the results showed excellent performance with low limits (LOD, LOQ, 0.0039 mg/100g and 0.0129 mg/100, respectively), good accuracy (between 90.95%, 96.24% and 102.44%) and precision (for repeatability and intermediate precision averaging 2.1% and 3.4%, respectively), also being observed good selectivity and linearity. The miniaturized method was applied to a sample of CMS fish *Piaractus mesopotamicus* fed with 4 different levels of microalgae *Schizochytrium* sp. incorporated into the feed and a control without the microalgae with 550 specimens distributed among the net tanks for a period of 60 days. Fish were collected every 15 days and analyzed for CMS. The miniaturized method proved to be an excellent alternative for reducing extraction reagents and analysis time compared to the Bligh and Dyer reference method for *Piaractus mesopotamicus* CMS. The results obtained from the incorporation of the microalgae into the feed showed that the highest concentrations of DHA of the CMS of *Piaractus mesopotamicus* were obtained after 45 days of feeding at concentrations of 3 and 4% of inclusion of the microalgae *Schizochytrium* sp.

Keywords: extraction method; validation; *Piaractus mesopotamicus*; lipids; docosahexaenoic acid – DHA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplo de estruturas moleculares de ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA).....	18
Figura 2 - Estrutura molecular dos ácidos graxos alfa-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA).....	19
Figura 3 - Localização geográfica dos tanques-rede.....	51
Figura 4 - Procedimento de extração da matriz in natura no método miniaturizado.....	56
Figura 5 - Superfície de resposta para otimização Matriz Doehlert com duas variáveis, massa de peixe (g), tempo de homogeneização (s) com resposta da concentração de DHA em mg/100g de peixe.....	61
Figura 6 - Cromatogramas da amostra extraídos do GC-FID: (1) sem adição de padrão; (2) com adição dos padrões de C23:0 e do DHA nas concentrações de 0,40 mg L ⁻¹ e 0,02 mg ⁻¹ , respectivamente a amostra.....	64
Figura 7 - Diagrama de pareto para cada nível de incorporação de DHA utilizada na alimentação dos peixes e obtida na CMS após extração.....	68
Figura 8 - Diagrama de pareto para determinar o tempo de alimentação dos peixes com a ração aditivada com DHA, análise da CMS.....	68
Figura 9 - Gráfico dos tratamentos com 4 níveis de tratamento com a incorporação de DHA pelo tempo.....	69
Figura 10 - Resumo das etapas de síntese de ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), a partir do ácido alfa-linolênico (ALA).....	83
Figura 11 - Procedimento na dessossadeira mecânica HT da empresa HighTech®.....	85
Figura 12 - Preparo da amostra de peixe. (a) Amostra in natura congelada; (b) amostra liofilizada; (c) amostra seca a 105°C com peso constante.....	85
Figura 13 - Fluxograma do método miniaturizado proposto para a extração de lipídios.....	85
Figura 14 - Planilha referente ao planejamento Doehlert do modelo linear para o analito DHA.....	86
Figura 15 - Fluxograma do procedimento de esterificação segundo Santos et al., 2014.....	87
Figura 16 - Distribuição dos peixes e tratamentos nos tanques-rede.....	87
Figura 17 - Procedimento de extração da matriz liofilizada.....	89
Figura 18 - Procedimento de extração da matriz seca a 105°C por 24 h.....	89
Figura 19 - Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo linear para o DHA.....	89
Figura 20 - Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo linear para o DHA.....	90
Figura 21 - Cromatograma e espectro de massas do tricosanoato de metila (C23:0) obtido no GC-MS.....	90
Figura 22 - Confirmação na biblioteca NIST 2.2 do composto C23:0.....	91
Figura 23 - Cromatograma e espectro de massas do DHA obtido no GC-MS.....	91
Figura 24 - Confirmação na biblioteca NIST 2.2 do composto DHA.....	92

Figura 25 - Gráfico da curva analítica de 3,37 mg L ⁻¹ a 67,68 mg L ⁻¹ para DHA em solvente (isooctano).....	94
Figura 26 - Cromatogramas obtidos do tratamento controle do peixe.....	97
Figura 27 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do controle.....	98
Figura 28 - Cromatogramas obtidos no nível de 1% de aditivo.....	99
Figura 29 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 1% de aditivo.....	100
Figura 30 - Cromatogramas obtidos no nível de 2% de aditivo.....	101
Figura 31 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 2% de aditivo.....	102
Figura 32 - Cromatogramas obtidos no nível de 3% de aditivo.....	103
Figura 33 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 3% de aditivo.....	104
Figura 34 - Cromatogramas obtidos no nível de 4% de aditivo.....	105
Figura 35 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 4% de aditivo.....	106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos clássicos para extração de lipídios.....	22
Tabela 2 - Técnicas cromatográfica para determinação de lipídios em diversas matrizes.....	29
Tabela 3 - Níveis selecionado para otimização do método miniaturizado empregando Planejamento Experimental Doehlert.....	44
Tabela 4 - Ingredientes e composição proximal da ração.....	52
Tabela 5 - Delineamento Experimental Fatorial 5 ²	53
Tabela 6 - Resultados da extração do método miniaturizado comparando o Bligh e Dyer para a determinação do rendimento dos lipídios totais e quantificação do DHA.....	57
Tabela 7 - Teste de Tukey para determinar qual a melhor matriz de extração.....	58
Tabela 8 - Resultados da extração do método miniaturizado com diferentes misturas de solvente para a determinação do rendimento dos lipídios totais e quantificação do DHA.....	59
Tabela 9 - Níveis das variável selecionada e respostas associadas ao planejamento Doehlert.....	59
Tabela 10 - Análise da variância (ANOVA) para a avaliação do DHA aplicando o planejamento Doehlert no modelo linear.....	60
Tabela 11 - Identificação de FAMES no GC-MS para confirmação dos ácido graxos.....	62
Tabela 12 - Parâmetros de linearidade para o DHA.....	65
Tabela 13 - Recuperação (%) em três níveis de concentração de DHA adicionada a amostra de peixe.....	66
Tabela 14 - Avaliação da repetibilidade para o DHA na amostra de peixe.....	66
Tabela 15 - Valores obtidos do ensaio de precisão intermediária para três níveis de concentrações em dias diferentes por analistas diferentes.....	67
Tabela 16 - Análise da ração utilizada na alimentação dos peixes.....	67
Tabela 17 - Teste de Tukey para determinar o valor de DHA na CMS de <i>Piaractus mesopotamicus</i> alimentados com a incorporação de DHA a ração em diferentes tempos.....	69
Tabela 18 - Peso médio dos tratamentos nos dias 45 e 60 com a alimentação controle e com a incorporação de DHA a ração.....	71
Tabela 19 - Planejamento Doehlert de duas variáveis.....	83
Tabela 20 - Valores da curva analítica para o DHA.....	87
Tabela 21 - Análise de variância ANOVA foi realizada com 5% de nível de significância (p-valor ≤ 0,05).....	94
Tabela 22 - Dados do planejamento com as variáveis resposta das 25 análises.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-METHF	2-metiltetrahidrofurano
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACN	Acetonitrila
ALA	Ácido alfa-linolênico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BUME	Butanol:metanol
C23:0	Tricosanoato de metila
CEUA	Comitê de Ética no Uso de animais
CH ₃ OH	Metanol
CMS	Carne Mecanicamente Separada
CPME	Éter ciclopentilmetil
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DP	Desvio Padrão
DCVT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DPR	Desvio padrão relativo
EPA	Ácido Eicosapentaenóico
FAME	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura
FID	Detector de ionização de chama
GC	Cromatógrafo em fase gasosa
GC-FID	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa equipada com detector de chama
H ₂	Gás hidrogênio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IFFO	Organização de Ingredientes Marinhos
IFPR	Instituto Federal do Paraná
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LC	Cromatógrafo em fase líquida
LC-MS	Cromatografia em fase líquida equipada com detector de chama
LOD	Limite de Detecção

LNA	Ácido linoléico
LOQ	Limite de Quantificação
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
MA	Massa da amostra
MeOH	Metanol
MS/MS	Espectrometria de Massas em Série
MUFA	Ácidos Graxos Monoinsaturados
<i>m/z</i>	massa/carga
N ₂	Gás nitrogênio
P.A.	Para análise
PTI	Parque Tecnológico Itaipu
PUFA	Ácidos Graxos Poliinsaturados
SFA	Ácidos Graxos Saturados
S/N	Sinal/ruído
TH	Tempo de Homogeneização
TPB	Teoria do Comportamento Planejado
UNILA	Universidade Federal da Integração Latino-Americana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1	LIPÍDIOS, ÁCIDOS GRÁXOS E DHA	18
2.2	EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS	19
2.3	ESTERIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS	25
2.4	PLANEJAMENTO MULTIVARIADO DOEHLERT	26
2.5	MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA	27
2.6	INCORPORAÇÃO DE DHA NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES	31
2.7	PRODUÇÃO E CONSUMO DE PEIXES	33
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL	37
3.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1	DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM CMS	38
4.1.1	Reagentes, padrões analíticos e insumos	38
4.1.2	Processamento da amostra	38
4.1.2.1	Determinação da umidade e demais caracterizações	39
4.1.3	Seleção do tipo de processamento da CMS	40
4.1.4	Miniaturização da extração de lipídios em peixe	41
4.1.5	Extração comparativa pelo método clássico Bligh e Dyer	42
4.1.6	Planejamento experimental e extração pelo método miniaturizado	43
4.1.7	Esterificação dos ácidos graxos	44
4.1.8	Análises cromatográficas	45
4.2	VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO MINIATURIZADA	47
4.2.1	Seletividade e especificidade	47
4.2.2	Linearidade	48
4.2.3	Limite de detecção de limite de quantificação	48
4.2.4	Recuperação	49
4.2.5	Precisão	49

4.3	ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) NA ALIMENTAÇÃO DO PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	50
4.3.1	Local do cultivo dos peixes	50
4.3.2	Cultivo dos Peixes	51
4.4.2	Delineamento para o tratamento dos peixes e análise	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
5.1	DESENVOLVIMENTO DO METODO MINIATURIZADO	54
5.1.1	Determinação da umidade da amostra do desenvolvimento do método miniaturizado	54
5.1.2	Seleção do tipo de processamento da amostra	55
5.1.3	Resultados obtidos com outros solventes de extração	58
5.1.4	Avaliação das variáveis massa de amostra e tempo de homogeneização empregando o planejamento experimental Doehlert	59
5.1.5	Método cromatográfico	62
5.2	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO MINIATURIZADO	63
5.2.1	Seletividade e especificidade	64
5.2.2	Linearidade	64
5.2.3	Limite de detecção e limite de quantificação	65
5.2.4	Recuperação	65
5.2.5	Precisão	66
5.3	APLICAÇÃO DO MÉTODO MINIATURIZADO E AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) NA ALIMENTAÇÃO DO PACU (<i>Piaractus mesopotamicus</i>)	67
6	CONCLUSÕES	72
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXO A - Protocolos do Comitê de Ética no Uso de animais, conforme certificação da CEUA/IFPR	80
	APÊNDICE A – Planejamento Doehlert e etapas de síntese de EPA e DHA	82
	APÊNDICE B – Preparo das amostras, fluxograma das etapas de extração, Planejamento Doehert com os dados, procedimento de esterificação, valores da curva analítica do DHA e distribuição dos tanque-rede	84

APÊNDICE C – Procedimento de extração, gráfico de regressão e distribuição de resíduos, cromatogramas e dados de confirmação dos dados pela biblioteca NIST.....	88
APÊNDICE D – Gráfico da curva analítica e análise de variância	93
APÊNDICE E – Dados do planejamento das 25 análises e cromatogramas as análises dos peixes.....	95

1 INTRODUÇÃO

Considerando a importância da presença de lipídios como os ácidos graxos na alimentação e sua relação com a homeostase do organismo, a avaliação dos teores destas substâncias em matrizes cárneas como aquelas procedentes da atividade pesqueira é de grande relevância. Nesse sentido, as estratégias que buscam melhorar incorporação de compostos como ácido docosahexaenóico (DHA) na dieta de peixes, a fim de aumentar a disponibilidade no produto final são igualmente importantes.

O DHA é um ácido graxo poli-insaturado da família do ômega-3, importante para os seres humanos na prevenção de doenças cardiovasculares, tumores e Alzheimer. O maior problema enfrentado para a obtenção dele é que naturalmente o ser humano é incapaz de produzir, sendo necessário a ingestão de alimentos que o contenha.

A análise de lipídios é um processo que necessita de diversas etapas, como o preparo da amostra para extração, a extração dos lipídios, a conversão de ácidos graxos em ésteres metílicos, e sua posterior identificação e quantificação. Com o propósito de inovar e aperfeiçoar as metodologias de extração de lipídios e determinação de ácidos graxos no pacu (*Piaractus mesopotamicus*), os métodos miniaturizados são excelentes alternativas para atingir os objetivos de redução de custos, resíduos e tempo de análise, além de apresentarem resultados similares aos obtidos nos métodos clássicos. Além disso, tais práticas estão alinhadas aos princípios da química verde e aos pressupostos de sustentabilidade. Desta forma, como objetivo principal neste trabalho foi desenvolvida uma metodologia miniaturizada, com base no método clássico de extração de lipídios preconizada por Bligh e Dyer (1959).

O segundo objetivo do estudo foi a aplicação dessa metodologia na avaliação da incorporação da microalga *Schizochytrium* sp. (DHA gold™®, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brasil), produto indicado na aquicultura para a alimentação, com o intuito de otimizar o crescimento dos peixes para consumo humano, relacionados principalmente a incorporação do ácido docosahexaenóico (DHA). Neste trabalho, essa microalga foi adicionada a ração para alimentação do

Piaractus mesopotamicus, uma espécie nativa da Bacia do Prata, comumente encontrada nas bacias dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai. Esse peixe possui alto potencial para a piscicultura devido a sua fácil adaptabilidade à alimentação artificial, além de produzir uma carne com alto valor comercial. O *Piaractus mesopotamicus* dentro do contexto do estudo é uma espécie se que enquadra bem nos objetivos de desenvolvimento sustentável (ODS), especialmente no objetivo 2 da meta 2 a para o desenvolvimento de tecnologias para o aumento da capacidade de produção. Os peixes foram cultivados em tanques redes localizadas no Lago de Itaipu, numa tentativa de agregar conhecimento técnico-científico a cadeia produtiva da piscicultura na região Oeste do Paraná.

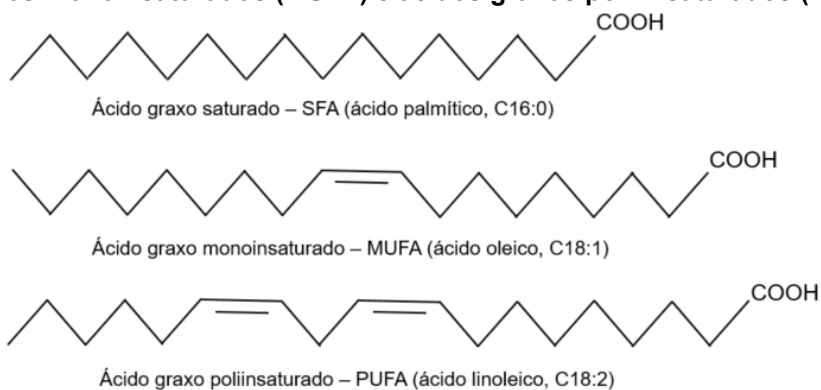
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 LIPÍDIOS, ÁCIDOS GRÁXOS E DHA

Os lipídios são um conjunto de moléculas heterogêneas que contêm ácidos graxos, gorduras, óleos, esteroides e ceras. Por definição, os lipídios são substâncias insolúveis em águas, com capacidade de ser solúvel em solventes orgânicos apolares (PAREYT et al., 2011). São importantes para os seres humanos sendo as principais fontes de armazenamento de energia. Os lipídios são classificados em simples: como óleos e gorduras; compostos: fosfolipídios e ceras; e derivados: ácidos graxos (MURRAY et al., 2014. p. 140; NELSON e COX, 2014. p. 357).

Os ácidos graxos são estruturas derivadas de hidrocarbonetos e podem ser encontrados na forma de ésteres de óleos e gorduras. São moléculas lipídicas, classificadas como neutras, polares e apolares, de acordo com os números de carbonos na cadeia de hidrocarboneto e grupos funcionais presentes em sua estrutura. Os ácidos graxos são separados em: ácidos graxos saturados (SFA) que são aqueles que não contêm na sua estrutura ligações duplas; ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) que possuem uma dupla ligação e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) que contêm duas ou mais ligação dupla (PAREYT et al., 2011; HALIM et al., 2012; MURRAY et al., 2014. p. 141; NELSON e COX, 2014. p. 357; OZOGUL et al., 2018). Alguns exemplos de estruturas moleculares dos ácidos graxos saturado, monoinsaturados e poli-insaturados estão ilustrados na Figura 1.

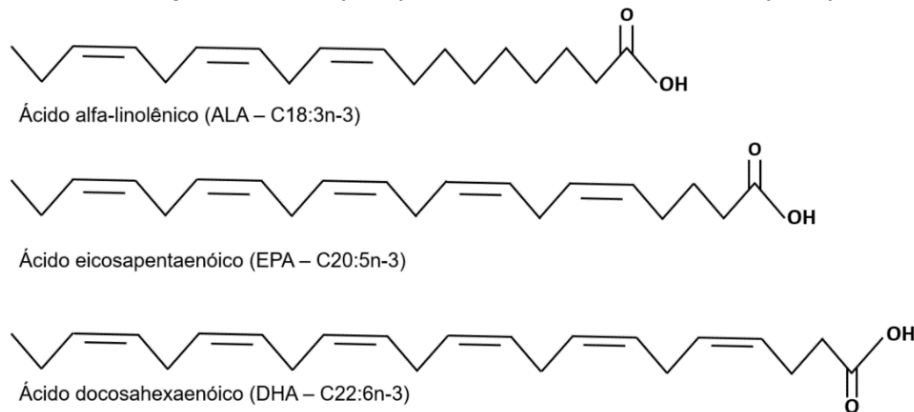
Figura 1 - Exemplo de estruturas moleculares de ácidos graxos saturados (SFA), ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e ácidos graxos poli-insaturados (PUFA)



Fonte: Adaptado de Murray et al., 2014, p. 141.

O ser humano é capaz de produzir praticamente todos os ácidos graxos, com exceção do ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3n-3) o qual é responsável pela produção do ácido eicosapentaenóico (EPA, C20:5n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA, C22:6n-3) representados na Figura 2 (MARTIN et al., 2006; ALMEIDA e BUENO FRANCO, 2006). Estudos realizados por Swanson e colaboradores (2021) indicam que parte do ácido alfa-linolênico (ALA), sendo cerca de 2 a 10% é convertido em EPA e DHA, dado importante pois o ALA é o precursor do EPA e DHA que são mais benéficos a saúde que o próprio ALA.

Figura 2 - Estrutura molecular dos ácidos graxos alfa-linolênico (ALA), ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA)



Fonte: Adaptado de Nelson e Cox, 2014. p. 357.

O DHA tem como função no organismo humano manter o funcionamento das células nervosas e da retina, possui ação anti-inflamatória, além ser considerado promissor na prevenção de Alzheimer (WALL et al., 2010; SWANSON et al., 2012; SUBBAIAH et al., 2016), aterosclerose, doenças de Parkinson e síndromes metabólicas (LI et. al., 2015). Estudos realizados por Swanson e colaboradores (2012) indicam que o consumo do DHA e EPA por mulheres grávidas dever ser realizado para proteger o feto de diversas doenças, sendo recomendado um valor de 2,7 g por dia de PUFA.

2.2 EXTRAÇÃO DE LIPÍDIOS

O procedimento de extração é uma das etapas mais importantes no processo de análise de ácidos graxos, visto que nela acontece a separação dos analitos de interesse dos demais componentes da matriz. Para a extração de ácidos graxos, os analitos classificados como interferentes são as proteínas e carboidratos (LÖFGREN et al., 2016).

A extração de lipídios para a obtenção dos ácidos graxos é tradicionalmente realizada utilizando grandes volumes da mistura de solventes orgânicos, tais como o éter etílico ou éter de petróleo, n-hexano, clorofórmio, diclorometano e metanol. A maioria dos solventes orgânicos usados no processo são perigosos para o ser humano e para o meio ambiente, devido ao seu alto grau de toxicidade, volatilidade e inflamabilidade (HABIBI et al., 2013; LÖFGREN et al., 2016). Durante o processo de extração, o solvente orgânico juntamente com algum processo que pode ser físico, químico ou uma combinação de físico/químico, promove a extração da fração lipídica da matriz. A segunda etapa do processo é a retirada do solvente orgânico juntamente com o ácido graxo e possíveis interferentes, como lecitinas, ceras, carotenoides, clorofila e outros pigmentos, além dos esteróis, fosfatídios, vitaminas A e D e óleos essenciais, dependendo da matriz extraída (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008, p. 117).

Diversos são os métodos de extração descritos na literatura (Tabela 1), que tem seu uso definido em função da natureza e volume dos solventes utilizados, e principalmente, as características das amostras.

O método de extração via Soxhlet é um dos métodos mais antigos já descritos de extração de lipídios. Foi desenvolvido por Franz Von Soxhlet no ano de 1879 (ARAUJO et al., 2013). Trata-se de um método consolidado como referência nacional e internacional (AOAC *Official Method* 991.36; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008, p. 117-121), ainda muito presente em diversos laboratórios. O método tem como característica o emprego de grandes volumes dos solventes como éter de petróleo, éter etílico, diclorometano, n-hexano, metanol, necessitando de um equipamento específico de Soxhlet, composto por um balão de fundo chato com gargalo e uma corneta onde fica a amostra. Para conexão é anexado um condensador tipo bola para recirculação do solvente no sistema, o qual funciona por refluxo do solvente (HALIM et al., 2012). O método traz vários inconvenientes como a utilização de grandes porções de reagentes, tempo elevado em todo o processo

para que o solvente percole a amostra em ciclos e é necessário um equipamento específico para o processo, além da utilização de aquecimento no sistema, fator que pode levar a degradação de ácidos graxos.

O método Bligh e Dyer (1959) é um método muito utilizado, o qual baseia-se na extração a frio, e utiliza como solução extratora porções de solventes na proporção de 2:2:1,8 de metanol: clorofórmio: água v/v/v, respectivamente, formando um sistema ternário, já que a clorofórmio e a água são imiscíveis e o metanol é miscível com os dois solventes. Na introdução do método original, os autores citam que o método é utilizado para determinação de lipídios totais em peixes, com o objetivo de minimizar a decomposição oxidativa (BLIGH e DYER, 1959). A aplicabilidade do método estendeu-se para o processo de extração de lipídios das células de mamíferos (ARCHANAA et al., 2012). A maior desvantagem associada ao método é a utilização de grandes porções de clorofórmio que é altamente tóxico.

No método de Folch e colaboradores (1957) é utilizado solventes orgânicos como metanol e clorofórmio em quantidades superiores, assim como a massa de amostra utilizada também é elevada. No lugar de se acrescentar água (OTERO et al., 2019) uma solução salina com cloreto de sódio (TANAMATI et al., 2005) ou potássio (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008. p. 646) ou ainda ácido acético (LÖFGREN et al., 2016) pode ser adicionada.

O método de Hara e Radin, desenvolvido em 1978, utiliza como solventes extratores o hexano e o isopropanol, sendo que a maior alteração frente aos demais métodos, é o fato que a fase orgânica com os ácidos graxos fica na parte superior do funil de separação, quando comparando aos métodos Bligh e Dyer e Folch et al. (HARA e RADIN, 1978; TANAMATI et al., 2005). Nesse método o equipamento utilizado é o homogeneizador Polytron® que é um sistema de mistura tipo mixer (HARA e RADIN, 1978).

Outro método desenvolvido foi utilizado por Chen e colaboradores em 1981 para a extração de gorduras de diversas matrizes utilizando como solvente uma mistura de clorofórmio com metanol, ou diclorometano e metanol, empregando outros aparatos físicos como ultrassom para extração de lipídios (CHEN et al., 1981; NEWKIRK et al., 1978).

Tabela 1 - Métodos clássicos para extração de lipídios

Metodologia	Massa da matriz	Reagentes	Procedimento	Tipo de sistema	Referência
Soxhlet	Carne	Éter de petróleo	2 a 5 g de amostra em papel filtro; Estufa a 105°C por 1 h; 40 mL de éter de petróleo em refluxo por 8 h ou 16 h; Retirar o balão e secar na estufa a 105°C por 1 h.	Quente	TANAMATI et al., 2005; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008, p. 117-118.
Soxhlet (modificado)	Microalga seca	Acetona	5 g de amostra; 110 mL de acetona a 120-180°C refluxo de 8 h; Retirar o resto do solvente com evaporador rotativo.	Quente	RAMLUCKAM et al., 2014
Bligh e Dyer	Peixes e célula de mamífero	Metanol e Clorofórmio	100 g de amostra com 80% de água; 100 mL de clorofórmio + 200 mL de metanol (formando um sistema ternário monofásico) Misturador Waring Blendor por 2 min; 100 mL de clorofórmio; Misturador por 30 s; 100 mL de água; Misturador por 30 s; Filtrar em papel quantitativo em funil de büchner; Separado em funil de separação; Coletar a parte inferior; Colocar no evaporador automático a 40-50°C.	Frio	BLIGH E DYER, 1959; TANAMATI et al., 2005; ARCHANNA et al., 2012;
Folch et al.	Pescado	Metanol, Clorofórmio, solução salina	10 g de amostra; 200 mL clorofórmio:metanol (2:1 v/v); Misturador Waring Blendor por 2 min; 100 mL clorofórmio:metanol (2:1 v/v); Filtrar em papel quantitativo em funil de büchner; Transferir para um funil de separação com 50 mL de NaCl 0,9% (m/v); Coletar a parte inferior; Colocar no evaporador automático a 40-50°C.	Frio	TANAMATI et al., 2005; INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008, p. 646-647; LÖFGREN et al., 2016; OTERO et al., 2019.
Hara e Radin	Carnes em geral	Hexano, Isopropanol, Sulfato de sódio (1g para 15mL de água)	1 g de amostra 18 mL de hexano:isopropanol (HIP) (3:2 v/v); Homogeneizador Polytron por 30 s; Filtrar em papel quantitativo em funil de büchner; Lavar 3 vezes com hexano:isopropanol (HIP) (3:2 v/v); Aguardar 2 min; Transferido para um funil de separação com 12 mL de sulfato de sódio; Coletado a parte superior;	Frio	HARA E RADIN, 1978; TANAMATI et al., 2005;

Metodologia	Massa da matriz	Reagentes	Procedimento	Tipo de sistema	Referência
			Colocado no evaporador automático a 40-50°C.		
Chen et al. (Método 1)	Matrizes alimentícias	Clorofórmio; Metanol;	5 g de amostra; 25 mL de metanol; Sonicar por 3 min; 50 mL de clorofórmio; Sonicar por 27 min; Filtrado em papel quantitativo em funil de büchner; Transferir para um funil de separação com 50 mL de NaCl 0,9%; Coletado a parte inferior; Colocado no evaporador automático a 40-50°C.	Frio	NEWKIRK et al. 1978; CHEN et al., 1981; ARAUJO et al., 2013
Chen et al. (Método 2)	Matrizes alimentícias	Diclorometano; Metanol;	1 a 5 g de amostra; Diclorometano e metanol; Sonicar por 3 min; Filtrado em papel quantitativo em funil de büchner; Transferido para um funil de separação com 50 ml de NaCl 0,9%; Coletado a parte inferior; Colocado no evaporador automático a 40-50°C.	Frio	NEWKIRK et al. 1978; CHEN et al., 1981.

Fonte: Autora própria (2020).

Reagentes apolares como hexano e éter dietílico tem uma desvantagem quando comparado ao diclorometano, clorofórmio e metanol, pois apresenta um baixo rendimento na extração dos lipídios em peixes e óleos vegetais (RYCKEBOSCH et al., 2014). Outras misturas como hexano/metanol são relativamente mais eficientes comparado a solução de hexano/isopropanol ou hexano/etanol (RYCKEBOSCH et al., 2014). A mistura de ciclo-hexano/1-butanol, que pode ser ligeiramente melhor que a mistura hexano/isopropano (RYCKEBOSCH et al., 2014). Solventes como a mistura de alcanos/isopropanol apresentam resultados intermediários para a extração de lipídios, podendo ser considerado uma alternativa para a substituição dos solventes mais tradicionais utilizados nos processos (TANAMATI et al., 2005) reduzindo assim a toxicidade.

Alterando o solvente extrator no método de Folch e colaboradores (1957) por uma solução de butanol:metanol (3:1 v/v), chamado a mistura de BUME, houve um aumento no rendimento para a extração de lipídios totais de tecido animal de diversas matrizes (LÖFGREN et al., 2016). Adicionalmente, reduziu-se a contaminação pela fase intermediária ou pela água, durante o processo de extração, além de substituir o solvente clorofórmio que é altamente tóxico (LÖFGREN et al., 2016). A estrutura da cadeia do ácido graxo extraído está diretamente ligada ao solvente usado para a extração, quanto maior for a cadeia do ácido graxo, menor a solubilidade em solventes polares (OTERO et al., 2019).

O desenvolvimento de métodos para extração é constante, e a utilização de ultrassom para extração pode ser uma alternativa, permitindo a inclusão de solventes menos tóxico, visto que é um processo de ultrassom rompe as paredes celulares para a retirada do conteúdo lipídico (NETO et al., 2013; FIGUEIREDO et al., 2019). O sistema de extração líquida pressurizada (PLE) é uma técnica de extração de solvente acelerado para extrair lipídios de microalgas a quente com solventes como acetato de etila e etanol para ácidos graxos poli-insaturados (TANG et al., 2011; OTERO et al., 2019).

Alternativas como o uso de outros equipamentos durante o processo como o agitador tipo vortex, apesar de ser um equipamento simples, é muito eficiente para auxiliar na ruptura da parede celular (NETO et al., 2013), podendo assim ser um adicional para o aumento no rendimento na extração dos lipídios, e diminuir o tempo de extração.

Estudos mais recentes como os realizados por Jafarpour e colaboradores (2020) mostraram a viabilidade de uso de ultra homogeneizadores de amostras tipo mixer, como o Ultra Turrax® o qual foi utilizado para extrair lipídios de amostras de bacalhau. O equipamento tritura a amostra em partículas menores, similar ao liquidificador, com a possibilidade de trabalho em alta rotação chegando a 15000 rpm. O equipamento permite o uso de pequenas quantidades de amostras, sendo compatível com métodos miniaturizado.

A extração de solvente orgânico assistida utilizando equipamentos como micro-ondas para acelerar o processo de ruptura da parede celular e retirar o lipídio, e a extração por fluido supercrítico empregando dióxido de carbono supercrítico (HALIM et al., 2012) são outras técnicas de extração que estão sendo desenvolvidas utilizando equipamentos considerados não convencionais para a obtenção de lipídios (IVANOVSK et al., 2017).

2.3 ESTERIFICAÇÃO DE LIPÍDIOS

Os lipídios derivados extraídos estão na forma de ácidos graxos, os quais não podem ser analisados diretamente em sistemas cromatográficos em fase gasosa. Na reação de esterificação e ou transesterificação, aos ácidos graxos (acilgliceróis) extraídos é adicionado álcool, sendo estes convertidos a ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) e água, processo conhecido como metilação (MILINSK et al., 2008; HALIM et al., 2012; SANTOS JÚNIOR et al., 2014; SINOSAKI et al., 2019). A escolha do catalisador para a esterificação dependerá de que tipo de ácido graxo está presente na amostra. O procedimento de esterificação pode ser realizado de duas maneiras, sendo uma por catálise básica ou por catálise ácida.

Na catalise básica utiliza-se como reagente para a esterificação o hidróxido de sódio, ou o hidróxido de potássio, os quais são misturados ao metanol, sem a necessidade de aquecimento durante a reação. Sua eficácia, porém, é limitada em frações lipídicas contendo ácidos graxos não acilglicerol, como lipídios polares e ácidos graxos livres (HALIM et al., 2012).

Na catalise ácida, geralmente se utiliza reagentes como um ácido inorgânico como por exemplo, o ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, os quais são

misturados ao metanol, esterificando mais comumente acilglicerol como ácidos graxos mais apolares e também os ácidos graxos livres, porém é necessário utilizar calor para a reação (MILINSK et al., 2008; HALIM et al., 2012). Uma alternativa para atender a demanda de investigação para a determinação dos ácidos graxos livres, juntamente com os acilgliceróis e não acilgliceróis é a combinação dos catalizadores alcalinos e ácidos, um processo extremamente eficiente e rápido que traz um maior rendimento do FAME (MILINSK et al., 2008; SANTOS JÚNIOR et al., 2014).

2.4 PLANEJAMENTO MULTIVARIADO DOEHLERT

Em processos laboratoriais, diversas variáveis podem interferir diretamente nos resultados obtidos, como é o caso dos processos de extração de analitos em diversas matrizes as quais interferentes podem influenciar diretamente no processo, gerando resultados diversos. A função de um planejamento experimental é controlar variáveis que podem ser dependentes ou não durante um processo, diminuir etapas e até minimizar custos. O Planejamento Doehlert é uma ferramenta quimiométrica que possibilita a melhora e a otimização de variáveis em diferentes níveis (FERREIRA et al., 2004; ARAUJO e JANAGAP, 2012).

Para o procedimento de extração dos ácidos graxos a escolha do modelo de segunda ordem utilizando o planejamento multivariável Doehlert que analisa a superfície de resposta gerada é bastante útil. Esse modelo possibilita monitorar duas variáveis mais importantes, onde a variável 1 contém 5 níveis, enquanto a variável 2 possui 3 níveis, ficando livre a indicação do que será a variável 1 ou 2. É recomendado que o efeito mais forte seja colocado na variável 1 para a maior parte das respostas obtidas (ARAUJO e JANAGAP, 2012). Os resultados do planejamento exibem um método de superfície de resposta na forma de uma figura regular hexagonal, onde compõe um ponto central e mais seis pontos adicionais para a formação da figura que pode ter deformidade de acordo com a utilização dos valores do experimento (FERREIRA et al., 2004; TEÓFILO E FERREIRA, 2006) (Apêndice A).

A avaliação do planejamento Doehlert proporciona a visualização de todas as variáveis significativas e como resposta temos que, quanto maior a resposta da

variável analisada, maior o número de níveis atribuídos a ela. O planejamento Doehlert foi proposto no ano de 1970 é bastante usada na aplicação de análises cromatográficas na otimização de parâmetros (ARAUJO e JANAGAP, 2012).

2.5 MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA

O estabelecimento do perfil de ácidos graxos e sua quantificação em amostras de peixe tem sido realizada empregando-se cromatografia em fase gasosa acoplada com detector de chama (GC-FID) (BONAFÉ et al., 2017; JESUS, et al., 2019) (Tabela 2). No detector de ionização em chama as moléculas são oxidadas e produzem partículas eletricamente carregadas na forma de íons, sendo considerado um detector universal, tendo a capacidade de detectar praticamente todos os analitos orgânicos, além de apresentar baixos limites de detecção e de não necessitar de manutenção específica e com muita frequência (COLLINS et al., 2006, p. 227; POOLE, 2015). A detecção dos elementos com carbono, oxigênio e hidrogênio pelo detector de ionização em chama, o torna particularmente interessante para a análises dos ésteres metílicos de ácidos graxos, devido à presença majoritária destes elementos na estrutura destes compostos (POOLE, 2015).

Para a realização dos ensaios em cromatografia em fase gasosa, alguns pré-requisitos são necessários. Deve ser avaliado se os analitos de interesse presentes na amostra são voláteis ou semi-voláteis, obrigatoriamente para não ficarem impregnados na coluna cromatográfica ou no sistema cromatográfico em si. Assim, informações sobre o ponto de ebulição, peso molecular e solubilidade também são muito importantes para a escolha dos métodos cromatográficos (COLLINS et al., 2006, p. 203).

Para a confirmação da identidade dos ácidos graxos faz-se uso da técnica de cromatografia em fase gasosa acoplado ao detector de espectrometria de massas (GC-MS) (TANG et al., 2014; SUBBAIAH et al., 2016; FIGUEIREDO et al., 2019; OTERO et al., 2019). Esse detector é considerado um dos mais eficientes, devido ao seu processo de análise pelas características de sensibilidade para detectar baixas concentrações de analitos. O espectrômetro de massas funciona

sob alto vácuo, onde contém uma fonte de íons com um analisador e um detector. A amostra é ionizada na fonte por bombardeamento de elétrons, formando íons moleculares e fragmentos nos analitos que percorrem todo o sistema do analisador que possui um campo magnético, até chegar no detector (HARRIS, 2011. p. 427-428). Nesse detector é possível obter uma separação eficiente, identificação e quantificação dos respectivos ésteres metílicos, além da possibilidade de se realizar uma varredura da massa-carga (m/z) do analito de interesse para a pesquisa em um banco de dados (FIGUEIREDO et al., 2019). Somente os íons com massa-carga com determinado valor podem alcançar o detector, sendo estes valores programados no método.

Tabela 2 - Técnicas cromatográfica para determinação de lipídios em diversas matrizes

Matriz	Técnica cromatográfica	Detector	Coluna	Fase Móvel/Gás de arraste	Referência
Carne de tilápia do Nilo	GC	FID	Coluna capilar de sílica fundida CP - 7420 (100 m × 0,25 mm id × 0,25 µm de cianopropil, SELECT FAME).	H ₂	BONAFÉ et al., 2017
Carne de carpa, tilápia do Nilo e tambacu.	GC	FID	Coluna capilar de sílica fundida Supelco 2560 (100 m x 0,25 mm id x 0,20 µm de filme)	N ₂	CASTRO et al., 2007
Carne de <i>Colossoma macropomum</i>	GC	FID	Coluna capilar de sílica fundida CP - 7420 (100 m × 0,25 mm id × 0,25 µm de cianopropil, SELECT FAME).	N ₂	CORTEGANO et al., 2019
Microalga <i>Nannichloropsis oceânica</i>	GC	MS	Coluna capilar DB-FFAP de 30 m × 0,32 mm id × 0,25 µm (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA)	He	FIGUEIREDO et al., 2019
Biomassa da microalga <i>Chlorella pyrenoidosa</i>	GC	FID	Coluna capilar DB-23 (60 m x 0,25 mm id x 0,25 µm de filme) 50% cianopropil e 50% metilpropilsiloxano	He	JESUS et al., 2019
Microalga <i>Schizochytrium</i> sp.	LC	MS/MS	Não identificada no artigo	A:40% de H ₂ O, 60% de ACN 10 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico. B: 10% de ACN, 90% de MeOH 10 mM de acetato de amônio e 0,1% de ácido fórmico.	JIANG et al., 2019
Peixes como: <i>Perca fluviatilis</i> L., <i>Leuciscus idus</i> L., <i>Cyprinus carpio</i> L., <i>Oncorhynchus mykiss</i> Walk., <i>Platichthys flesus</i> L. e <i>Clupea harengus</i> L.	GC	FID	Coluna capilar (30 m × 0,32 mm id × 0,25 µm) Supelcowax 10	He	ŁUCZYŃSKA et al., 2017
Peixes como: <i>Oncorhynchus tshawytscha</i>, <i>Cyprinus carpio carpio</i>, <i>Catostomus commersonii</i>, <i>Salvelinus namaycush</i>, <i>Sander vitreus</i>	GC	FID	Coluna capilar de sílica fundida Supelco 2560 (100 m x 0,25 mm id x 0,20 µm de filme)	He	NEFF et al., 2014
Microalga <i>Schizochytrium limacinum</i>	GC	MS	Coluna capilar de sílica fundida DB-17MS (30 m × 0,25 µm × 0,25 µm)	He	TANG et al., 2011

Matriz	Técnica cromatográfica	Detector	Coluna	Fase Móvel/Gás de arraste	Referência
	GC	FID	Coluna capilar FTTP (30 m × 0,25 mm × 0,5 µm)	N ₂	
Alga marinha <i>Laminaria ochroleuca</i>	GC	MS-FID	Coluna capilar (Agilent HP-5MS UI 30 m × 0,250 mm × 0,25 µm)	He	OTERO et al., 2019
<i>Mullus barbatus</i>, <i>Upeneus moluccensis</i>, <i>Mullus surmuletus</i>, <i>Anguilla anguilla</i>, <i>Pagellus erythrinus</i>, <i>Saurida undosquamis</i>	GC	FID	Coluna capilar SGE (60 m × 0,32 mm ID BPX70 × 0,25 µm)	Não identificada no artigo	OZOGUL et al., 2018
Semente de girassol, canola e milho	GC	FID	Coluna capilar de sílica fundida CP-7420 (Select FAME, 100 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm de filme em cianopropil).	H ₂	SINOSAKI et al., 2019
Semente de soja, linhaça e dendê	GC	FID	Coluna capilar de sílica fundida CP-Select CB-FAME (100 m x 0,25 mm ID x 0,39 µm de filme em cianopropil)	H ₂	MILINSK et al., 2008
Ratos machos Spragues-Dawley	GC	MS	Coluna capilar Supelco Omegawax (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm de filme)	Não identificada no artigo	SUBBAIAH et al., 2016
Ratos machos Spragues-Dawley (cont.)	LC	MS	Coluna capilar de sílica fundida (Supelco Ascentis Si µM, 100 × 2,1 mM)	A: clorofórmio 80%, metanol 19,5% e água 0,5%. B: clorofórmio 60%, metanol 34,5% e água 5,5%. A e B com 0,1% de ácido fórmico e hidróxido de amônio.	SUBBAIAH et al., 2016
Carne de <i>Piaractus mesopotamicus</i> e <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	GC	FID	Coluna capilar de sílica fundida DB-WAX (30 m x 0.25 mm ID) J&W Scientific, Folsom, CA, USA.	N ₂	TANAMATI et al., 2009

Sendo: GC: cromatógrafo de fase gasosa, FID: detector de chama, H₂: hidrogênio gasoso, N₂: nitrogênio gasoso, LC: cromatógrafo de fase líquida, MS/MS: espectrometria de massas sequencial, ACN: acetonitrila; MeOH: metanol.

Fonte: Autora própria (2020).

2.6 INCORPORAÇÃO DE DHA NA ALIMENTAÇÃO DE PEIXES

A composição dos nutrientes da carne de peixe depende diretamente de fatores como a dieta alimentar, espécie, idade, estação do ano, fatores biológicos e local onde o peixe foi criado (NEFF et al., 2014; BONAFÉ et al., 2017; OZOGUL et al., 2018). Espécies de água doce e marinhas apresentam composição e concentrações diferentes de ácidos graxos. Peixes de água doce apresentam baixos níveis de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa ômega-3 comparado com peixes marinhos (ALMEIDA e BUENO FRANCO, 2006), os quais são considerados como as principais fontes de EPA e DHA (ALMEIDA e BUENO FRANCO, 2006; WALL et al., 2010; EMBRAPA, 2013; ŁUCZYŃSKA et al., 2017).

O mecanismo metabólico de produção dos ácidos graxo que não são sintetizados pelos mamíferos e que acontece com os peixes ocorre por meio do processo enzimático quando o ácido alfa-linolênico (ALA, C18:3n-3) passa por um processo de dessaturação, que corresponde a incorporação de uma ligação dupla a cadeia carbônica na posição Δ^6 , tornando-se o ácido estereadônico (C18:4n-3). Em seguida esse ácido passa por um processo de alongasse, que é o alongamento da cadeia carbônica e se transforma em ácido eicosatetraenóico (C22:4n-3). Novamente o processo de dessaturação acontece com o ácido eicosatetraenóico (C22:4n-3), convertendo-se a ácido eicosapentaenóico (EPA C22:5n-3). O processo continua para a produção do ácido docosahexaenóico (DHA C22:6n-3), para isso o EPA é alongado e forma o ácido docosapentaenóico (22:5n-3), acontece o alongamento novamente e forma o ácido tetracosapentaenóico (C24:5n-3) dessatura na posição Δ^6 formando o ácido tetracosahexaenóico (24:6n-3) e por fim passa por um processo de beta-oxidação formando o ácido docosahexaenóico (DHA C22:6n-3) (WALL et al., 2010; MURRAY et al., 2014. p. 222-223) (Apêndice A).

O óleo de peixe é uma das principais fontes de PUFAs disponíveis para suplementação de rações. De acordo com dados gerados pela Organização de Ingredientes Marinhos (IFFO) repassados a Organização das Ações Unidas para Alimentos e Agricultura (FAO) no ano de 2018, aproximadamente 75% da produção anual de óleo de peixe é utilizada no enriquecimento de rações para utilização na aquicultura (FAO, 2018. p. 50). Adicionalmente, o óleo de peixe pode ser utilizado

em indústrias alimentícias, na agricultura, na indústria farmacêutica e como um aditivo alimentar humano para o enriquecimento com PUFA da série ômega-3 para o desenvolvimento cerebral em diferentes fases do desenvolvimento humano (IVANOVSKY e BLUMBERG, 2017). O óleo de peixe pode ser extraído para a obtenção do EPA e DHA como um produto só por métodos de lipólise enzimática, extração supercrítica de fluídos, destilação molecular, cromatografia em corrente, cristalização em baixa temperatura, porém o maior desafio é a separação do DHA e do EPA no meio reacional (LI et al., 2015). Analisando a quantidade de DHA no óleo de peixe extraído, o rendimento obtido acaba sendo insuficiente para atender a demanda crescente do mercado mundial para a incorporação na ração de alimentação para os peixes (TANG et al., 2011).

Uma alternativa para substituir o uso de óleos de peixe para a incorporação da PUFA da série ômega-3 são as microalgas, fontes abundantes de lipídios, além de serem produzidas em grande escala (TANG et al., 2011; ARCHANAA et al., 2012; ARAUJO et al., 2013; OTERO et al., 2019). A utilização de microalgas na suplementação de rações tem uma grande importância como uma estratégia tecnológica, pois essas microalgas são ricas em PUFA da série ômega-3, que são incorporadas ao óleo do peixe que é a principal fonte comercial do EPA e o DHA. Vantagens na utilização das microalgas é o tipo de cultivo, que podem ser realizadas em condições controladas gerando um impacto ambiental mínimo (FIGUEIREDO et al., 2019; OTERO et al., 2019), com ciclo de crescimento curto, sem restrição de local e estação (TANG et al., 2011).

Outra vantagem na utilização da microalga é verificada durante o processamento junto a ração, e a extrusão é mais eficiente com a microalga em comparação com o uso de óleos de peixe. Em estudos Patil e colaboradores (2007) mencionam que existem casos em que o ômega-3 obtido do peixe é um derivado dentro da cadeia alimentar vinda do zooplâncton que consome a microalga que sintetizou o ômega-3. Essa etapa de ingestão do ômega-3 é importante para o processo de biossíntese para a obtenção do EPA e do DHA. É um processo enzimático capaz de modificar o perfil da dieta, por isso quando o ácido alfa-linolênico (ômega-3) é ingerido pelo peixe ele pode ser convertido em EPA e originar o DHA, dando a possibilidade na aquicultura usar tanto o ômega-3 na ração como os ácidos graxos EPA e DHA. Por isso que, dependendo do caso, a adição direta

do DHA e EPA torna-se uma opção (SUBBAIAH et al., 2016). Por isso, a absorção de DHA na composição do peixe pode ocorrer por meio da adição de óleo de peixe com alta concentração de DHA diretamente na ração ou com a adição de microalgas que apresentem cerca de 35% de DHA (SUBBAIAH et al., 2016).

Um microrganismo fonte de DHA para ser utilizado na alimentação de peixes, visando a incorporação de ácidos graxos é a microalga halofílica heterotrófica *Schizochytrium* sp., chamado de microalga para fins de marketing, as quais são cultivados de maneira semelhante a muitos tipos de algas. Estas são classificadas como protistas fúngicos (TIBBETTS et al., 2020), as quais apresentam elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados na sua composição, principalmente de DHA que pode atingir 50% a 60% em suas cepas purificadas dentro da composição do conteúdo lipídico total (REN et al., 2015; JIANG et al., 2019). Esse microrganismo não necessita de luz e oxigênio para a realização dos processos metabólicos como outras algas utilizadas na incorporação das rações para o tratamento dos peixes, sendo essa espécie de microalga uma escolha alternativa devido a essa característica, o que reduz o custo da produção (CORTEGANO et al., 2019). Estudos realizados utilizando a microalga halofílica heterotrófica *Schizochytrium* sp. mostraram a viabilidade de incorporação do DHA na carne do peixe (CORTEGANO et al., 2019; TIBBETTS et al., 2020).

2.7 PRODUÇÃO E CONSUMO DE PEIXES

A aquicultura é um ramo que vem se desenvolvendo ao longo dos anos no Brasil trazendo soluções aos pequenos, médios e grandes produtores do setor da piscicultura, ajudando-os no desenvolvimento de processos mais eficientes de produção de peixe, e promovendo a igualdade social principalmente para os pequenos produtores. Um dos motivos para o desenvolvimento da aquicultura acontecer aqui Brasil está relacionado ao grande potencial hidrológico, clima propício, matéria prima para produção de rações, possibilitando aos produtores reduzir o custo na produção e repassam aos consumidores um menor preço do produto. Peixes nativos no ano de 2019 representaram 38% da produção total no Brasil (PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2020, p. 16),

com diversas técnicas para a criação de peixes. No Brasil a técnica mais comumente utilizada é a criação intensiva, onde há baixa renovação da água e apresenta dietas artificiais controladas (VALLADÃO et al., 2018). Para um desenvolvimento sustentável as atividades agrícolas incluindo a aquicultura, devem considerar a preservação da terra, água, flora e fauna, utilizando técnicas viáveis economicamente, socialmente desejáveis e de maneira correta (CYRINO et al., 2010).

O pacu *Piaractus mesopotamicus* (HOLMBERG, 1887) (Family Characidae) é uma espécie de peixe onívoro tropical com hábitos alimentares frugívoros e herbívoro, mas podem se alimentar de pequenos insetos (BACCHETTA et al., 2020). Nativo da Bacia do Prata, comumente encontrada nos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, é cultivado na América do Sul e no Brasil nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e principalmente no Pantanal Mato-Grossense, é considerada uma espécie de fácil cultivo por possuir características especiais para criação quando há alterações na água, visto que elas podem se adaptar a uma faixa de temperatura entre 15°C a 35°C (GELMAN et al., 2004). A faixa ideal de temperatura para a criação é em torno de 20°C a 28°C, sendo que a baixas temperaturas aumentam o estresse, gerando distúrbios fisiológicos e aumentando a probabilidade de morte durante o tratamento (BACCHETTA et al., 2020). Esta espécie sobrevive em condições ambientes onde a quantidade de oxigênio dissolvido no seu habitat pode chegar a uma concentração menor que 1 mg L⁻¹ (GELMAN et al., 2004), porém, recomenda-se acima de 3 mg L⁻¹.

Por ser uma espécie versátil, com altas taxas de crescimento podem ser produzidas com alimentação artificial a partir de rações (TANAMATI et al., 2009; PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2019), tornando-se a segunda espécie mais cultivada no Brasil (BORGES et al., 2013). É uma das espécies nativas, juntamente com o tambaqui, pirapitinga, tambacu e tambatinga presente em 76.376 propriedades no Brasil (PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2019). Apesar de toda sua versatilidade, o *Piaractus mesopotamicus* é considerada uma espécie gordurosa pela população da América do Sul que o consome. Esse é um dos motivos pelo qual seu consumo é limitado, além do fato do seu sabor acentuado e o preparo ser mais restrito na forma de assado para evitar o acúmulo de gordura na carne (VALLADÃO et al., 2018).

A inclusão de peixe na dieta se tornou um símbolo de bem-estar e a ingestão equilibrada de nutrientes faz com que o ser humano se previna de doenças não transmissíveis, e tenha uma qualidade de vida adequada (EMBRAPA, 2013). A ingestão de ácidos graxos provenientes dos peixes, como os ácidos graxos poli-insaturados pode trazer benefícios prevenindo e/ou reduzindo algumas doenças tais como: doenças cardiovasculares (DCV) e/ou doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) como a obesidade, diabete, aumento do colesterol e câncer, diminuindo a probabilidade de possíveis inflamações, doença de Alzheimer, Parkinson e síndromes metabólicas (SWANSON et al., 2012; NEFF et al., 2014; LI et al., 2015; IVANOV e BLUMBERGA, 2017; LÖFGREN et al., 2016; ŁUCZYŃSKA et al., 2017; MIYASHITA et al., 2018). Além de ser uma excelente fonte de lipídios, os peixes apresentam elevado valor nutritivo devido a presença de vitaminas lipossolúveis, fósforo, ferro, cobre, selênio, iodo, em espécies de água salgada (ŁUCZYŃSKA et al., 2017; OZOGUL et al., 2018).

O Brasil é um dos maiores produtores de carne de peixe entre os países da América do Sul, segundo dados da Organização das Ações Unidas para Alimentos e Agricultura – FAO desde o ano de 2014 (FAO, 2018, p. 17-18). Dados de produção no ano de 2019 do cultivo de peixes no Brasil mostram um crescimento de 4,9% quando comparado ao ano anterior, atingindo um total de 758.006 toneladas, um dos maiores índices entre todas as proteínas animais produzidos no país (PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2020, p. 12-13). No ano de 2013 na América do Sul o cultivo de peixes excedeu a de carne bovina que é considerada uma das principais fontes de proteínas do mundo (VALLADÃO et al., 2018). Embora os dados de produção de carne de peixe sejam expressivos, quando considerado o consumo de peixes no Brasil, este valor é inferior a 10 kg/habitante/ano, dependendo de região do estudo. Estes índices são inferiores ao recomendado pela FAO, o recomendado por habitante ao ano é de 12 kg, e a média mundial por habitante ao ano é superior a 20 kg (PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2019, p. 112).

A falta de incentivo do governo para agregar o peixe na dieta alimentar da população brasileira, os valores elevados para aquisição deste alimento e a falta opções de preparo, foram elencados como os principais fatores para o baixo consumo de peixe no Brasil (MITTERER-DALTOÉ et al., 2013). Um outro fator está

associado ao odor desagradável devido a presença da trimetilamina, promovido pela oxidação inicial, sendo um fator para a diminuição do consumo da proteína (MIYASHITA et al., 2018). Quando o peixe é congelado por um determinado período, o surgimento da trimetilamina fica mais evidente, sendo avaliados como um odor amoniacal, rançoso e desagradável. Para avaliar o tempo que o peixe pode ser congelado e posterior consumido, foram avaliados os parâmetros bioquímicos, bacteriológicos juntamente com os sensoriais e a conclusão foi de que o tempo ideal para consumo seria de 11 dias (BORGES et al., 2013).

Para mudar essa realidade de consumo, no ano de 2019 foi implantado o programa “Coma Mais Peixe”. A estratégia tem como objetivo incentivar o consumo de peixes cultivados no Brasil, apresentando pratos bem elaborados com apelos visuais, preparados por chefes conhecidos na mídia, com vídeos disponíveis em plataformas digitais de fácil acesso demonstrando a simplicidade do preparo de um prato com essa proteína, além de mostrar os benefícios que o alimento oferece a sociedade, mudando a opinião da população sobre a qualidade, acessibilidade e pelo seu caráter saudável (PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA, 2020, p. 124-125).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estabelecer um método de rotina miniaturizado para a extração de lipídios, tomando como base o método clássico de Bligh e Dyer, e aplicá-lo em amostras de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetido a alimentação com dieta a base de ácido docosahexaenóico (DHA).

3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Comparar o método miniaturizado com o método original de Bligh e Dyer (1959).
- Desenvolver o método miniaturizado, com a redução do volume de solvente e etapas, na extração de lipídios em pacu (*Piaractus mesopotamicus*), para avaliação dos ácidos graxos e DHA da família ômega-3.
- Validar o método de extração avaliando os parâmetros de seletividade e especificidade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação e precisão.
- Aplicar o método miniaturizado na determinação de ácidos graxos da família ômega 3, em carne mecanicamente separada de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) criados em tanques-rede alimentados com diferentes níveis de DHA das dietas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS EM CMS

4.1.1 Reagentes, padrões analíticos e insumos

Os reagentes utilizados foram: metanol (Honeywell – Riedel-de Haën, cromatográfico de 99,8%), clorofórmio (Vetec, grau cromatográfico de 99,9%), cloreto de sódio (Sigma-Aldrich, grau cromatográfico de 99,8%) água tipo 1 (Deionizador Direct-Q® Water Purification System) cuja resistividade foi monitorada e mantida em 18,2 MΩ.cm, hidróxido de sódio (Scharlab, grau cromatográfico de 98,5%), cloreto de amônio (J.T.Baker, grau cromatográfico de 99,5%), ácido sulfúrico (Honeywell - Riedel-de Haën, grau cromatográfico de 96,3%), isooctano (Scharlau, grau cromatográfico de 99,5%), álcool etílico (Neon, grau de pureza 96,1%), n-hexano (Supelco, grau cromatográfico de 98,0%), diclorometano (Merck, grau cromatográfico de 99,9%).

Os padrões analíticos utilizados foram: ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosaheptaenóico (DHA) (Sigma-Aldrich, grau cromatográfico de 98%),tricosanoato de metila (C23:0) (Sigma-Aldrich, grau cromatográfico de 99,6%), mix F.A.M.E. de C4-C24 (Sigma-Aldrich, grau cromatográfico de 100% cada padrão). Materiais adicionais utilizados como: papel filtro quantitativo faixa preta C41 marca Unifil, com teor de 0,0012 de cinzas, diâmetro de 15 cm. O gás hidrogênio (H₂) grau de pureza 99,999% (5.0) da empresa White Martins, gás nitrogênio (N₂) grau de pureza 99,999% (5.0) da empresa White Martins, gás sintético (mistura de oxigênio e nitrogênio) grau FID com pureza de 99,999% (5.0) da empresa White Martins, gás Hélio (He) grau de pureza 99,999% (5.0) foi fornecido pela empresa White Martins.

4.1.2 Processamento da amostra

Para o desenvolvimento da metodologia e determinação de ácidos graxos das amostras de peixe na forma da CMS (carne mecanicamente separada), foram utilizados peixes criados no tanque-rede alimentados com ração comercial sem adição do aditivo, coletados no mês de maio de 2020, esses foram abatidos por eutanásia conforme os protocolos do Comitê de Ética no Uso de animais, conforme certificação da CEUA/IFPR (Anexo A).

Para a produção do CMS, esses peixes foram levados para o laboratório do canal da piracema da Itaipu Binacional lado brasileiro. Após a pesagem dos peixes, foram retirados a cabeça, vísceras, pele (sem a retirada das escamas) e as nadadeiras para a obtenção do tronco limpo (filé com a presença da coluna vertebral). O tronco limpo foi submetido ao processo de desossa mecânica para pescado modelo Dessossadora HT da empresa HighTech® (Apêndice B) indicada para matéria prima como aves e peixes, a qual separa a carne das espinhas/ossos.

Após o tronco limpo passar pela desossadeira mecânica, obteve-se a CMS a qual contém carne com as gorduras isenta de espinhos. As amostras foram encaminhadas para o Laboratório Ambiental da Itaipu Binacional lado brasileiro para extração dos lípidos e determinação dos ácidos graxos.

4.1.2.1 Determinação da umidade e demais caracterizações

A determinação da umidade da CMS do peixe foi realizada em triplicada, utilizando cápsulas de porcelana previamente secas e pesadas, a temperatura da mufla da empresa Fornitec modelo F2 a $105^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante $24 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$. As cápsulas foram retiradas e colocadas em um dessecador e quando atingiram a temperatura ambiente adicionou-se cerca de $10,00 \pm 0,01 \text{ g}$ da CMS e foram colocadas na estufa a uma temperatura de $105^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante um período de 24 h. Após esse tempo, as cápsulas foram acondicionados novamente em um dessecador e sua massa final foi pesada para a verificação da umidade. O valor foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$U = \frac{m_i - m_f}{m} \times 100 \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

U = umidade da amostra em porcentagem;
m_i = massa da cápsula com amostra em gramas;
m_f = massa da cápsula sem amostra em gramas;
m = massa inicial da amostra em gramas.

Durante esse estudo, a caracterização as amostras como a composição centesimal foram analisados os dados da literatura, já que na proposta do desenvolvimento do trabalho não englobava esses ensaios.

4.1.3 Seleção do tipo de processamento da CMS

Foram realizados testes com a CMS para definir qual a melhor forma de preparo para uma obtenção de um maior rendimento de lipídio extraído e um menor valor do desvio padrão no procedimento de extração. Os testes com o preparo da CMS foram realizados tanto para o método miniaturizado e como para o método Bligh e Dyer (1959) para fins de comparação. A CMS, que agora será denominada como matriz da amostra, foi testada para três preparos distintos na extração de lipídios, sendo:

- I. Matriz *in natura*, as amostras recebidas, pesadas e extraídas de acordo com o procedimento de extração pelos métodos miniaturizado e clássico de Bligh e Dyer (1959);
- II. Matriz liofilizada, para a liofilização a matriz foi congelada até que todo o seu conteúdo estivesse totalmente congelado e colocado em um liofilizador para a retirada de toda água da amostra;
- III. Matriz seca, a matriz foi seca na estufa a uma temperatura de 105°C até se obter um peso constante.

A matriz *in natura* foi pesada nos tubos Falcon de 15,0 mL para extração.

O procedimento de liofilização foi realizado no equipamento Christ Alpha 1-2 LDplus para a retirada total da água presente na amostra, tendo uma duração de cerca de 8 dias, sem considerar o tempo de congelamento da amostra. Um dos motivos do uso para teste das amostras liofilizadas é o fato das amostras conterem um valor quase nulo de umidade para que não haja uma diferença acentuada no

rendimento dos lipídios totais (IVANOVVS e BLUMBERGA, 2017), além dessa matriz ser mais fácil para manipulação comparando com a *in natura*. Após o procedimento de liofilização ela foi pesada em tubo Falcon de 15,0 mL, e o restante foi colocado em saco plástico vedado, armazenado em um dessecador devidamente identificado.

Para a amostra seca a estufa, foi utilizado o equipamento da empresa Sterilifer a uma temperatura de 105°C com circulação de ar forçada para secagem a peso constante, amostras de peixe foram colocadas em uma bandeja de alumínio limpa, colocada em estufa pré-aquecida a 105°C. Após 24 h a temperatura constante, a matriz foi retirada e deixada em dessecador até estabilização a temperatura ambiente. Após a secagem a matriz foi novamente moída/triturada no liquidificador, para um *pool* homogêneo, pesada em tubos Falcon de 15,0 mL e o restante foi armazenado em saco plástico devidamente lacrado e identificado com a data de secagem e tipo de preparo, acondicionado em dessecador vedado (Apêndice B).

4.1.4 Miniaturização da extração de lipídios em peixe

A miniaturização do método de extração de lipídios baseou-se na composição e proporção de solventes do método de Bligh e Dyer (1959). Testes prévios foram realizados com outras proporções e outros solventes diferentes daqueles utilizados no método oficial (como a mistura de n-hexano:etanol (1:1, v/v) e diclorometano:metanol (2:1, v/v)).

Para o procedimento de extração miniaturizado, as amostras de peixe foram pesadas em balança analítica da empresa Marte modelo AY220 em tubo Falcon de 15,0 mL, devidamente identificados, seguindo o planejamento descrito na Tabela 3. Em seguida foram adicionados 1,20 mL de água e 4,50 mL da mistura de solventes, sendo a mistura submetida ao ultra homogeneizador tipo mixer MicroDisTec™ – Homogenizer MDT 125 pelos tempos descritos no planejamento experimental. Em seguida adicionou-se 1,50 mL de solvente que dependendo do teste foi o n-hexano ou clorofórmio e homogeneizou-se por determinado tempo (Tabela 3). Em seguida, adicionou-se 1,50 mL de solução de cloreto de sódio (NaCl) saturada, tampou-se o

tubo Falcon, o qual foi homogeneizado com o agitador tipo vortex da empresa Capp com rotação a 4.500 rpm por 30 s.

A mistura foi transferida para uma seringa hipodérmica de 10 mL contendo papel filtro quantitativo faixa preta C41 marca Unifil, com teor de 0,0012 de cinzas, diâmetro de 15 cm. O papel foi cortado com um diâmetro interno de 0,70 mm e posicionado no interior da seringa. Na parte inferior da seringa foi posicionado outro tubo Falcon de 15 mL previamente pesado para o recolhimento dos líquidos contendo água, metanol, clorofórmio e os lipídios extraídos.

O embolo foi conectado a seringa e pressionado lentamente até que toda a solução fosse transferida para o novo tubo Falcon. Quando esse processo foi finalizado, formaram-se duas fases da solução, sendo a da parte superior aquosa e parte inferior o extrato orgânico contendo os lipídios. Com uma pipeta Pasteur de vidro, foi retirado e descartado o sobrenadante. O extrato do tubo Falcon contendo os lipídios, clorofórmio e metanol, foi evaporado num fluxo de nitrogênio fabricado sob medida a temperatura de 50°C para eliminação do solvente orgânico, de modo que se obtivesse somente os lipídios extraídos. Após essa etapa, foi cálculo o percentual de lipídios extraídos (Equação 2).

$$LT \% = \frac{\text{Tubo com óleo} - \text{tubo sem óleo}}{\text{massa da amostra}} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

LT %= lipídios totais em porcentagem;

Tubo com óleo = valor em gramas;

Tubo sem óleo = valor em gramas;

Massa da amostra = pesada para extração em gramas.

O método no formato de fluxograma da extração está disponível no Apêndice B.

4.1.5 Extração comparativa pelo método clássico Bligh e Dyer

As análises foram realizadas em triplicata pesando-se cerca de 10,00 g em balança analítica da empresa Marte modelo AY220 da amostra previamente

preparada para as matrizes *in natura*, liofilizada e seca a 105°C estufa com circulação de ar forçada para secagem a peso constante. Nesta massa foi adicionada água, de acordo com a proporção do método e na sequência 30,0 mL de solução clorofórmio-metanol (1:2 v/v), sendo a mistura homogeneizada em liquidificador Arno Optimix Plus LN27 de 550 W por 2 min.

A essa mistura foram acrescentados 10,0 mL de clorofórmio e homogeneizado no liquidificador por mais 30 s, seguido pela adição de 18,0 mL de solução salina saturada (considerando a água que foi adicionada inicialmente esse valor foi alterado, seguindo a regra das proporções do método) e homogeneizado mais uma vez no liquidificador durante 30 s. A mistura foi filtrada em funil de Büchner a vácuo com papel de filtro quantitativo faixa preta. A solução resultante foi transferida para um funil de separação ao qual foi necessário aguardar a separação das fases antes de se retirar a parte inferior por um período de mínimo 15 min.

Após esse tempo de separação das fases, os lipídios extraídos foram coletados em um balão de fundo chato previamente seco a 105°C e pesado, o solvente foi evaporado em um evaporador rotativo IKA RV 8 a uma temperatura controlada de 50°C. O balão foi armazenado em um dessecador com sílica até que ele estivesse a temperatura ambiente de 25°C para ser pesado. O teor de lipídios extraídos foi determinado gravimetricamente. Todas as três matrizes foram extraídas e analisadas em triplicata.

O teste de Tukey, foi aplicado para comparar a se a matriz da CMS influencio no processo de extração de lipídios totais e se a quantidade de DHA em mg/100g de peixe sofria variação, considerando 5% de nível de significância (p-valor $\leq 0,05$).

4.1.6 Planejamento experimental e extração pelo método miniaturizado

Com base nos testes realizado com o CMS do peixe, o planejamento experimental foi construído considerando duas variáveis, sendo que as variáveis foram selecionadas com base em trabalhos de Hara e Radin (1978), Castro e colaboradores (2007) e Araújo e colaboradores (2013), sendo estipulada a variável 1 a quantidade de massa de amostra mínima necessária para extrair os lipídios com

cinco níveis nos valores entre 0,050 g e 0,50 g, mantendo-se a proporção de massa de amostra e solventes preconizada pela literatura (TAO et al., 2019; BALDISSERA et al., 2020). E a variável 2 baseada no trabalho de Araújo e colaboradores (2013) que utilizou um maior tempo de equipamento para a extração, com isso foi definido tempo de homogeneização com o ultra homogeneizador do tipo mixer em 3 níveis com valores entre 20 s a 60 s. Essas duas variáveis foram consideradas importantes para o procedimento de extração visando um menor tempo de extração e maior rendimento dos lipídios extraídos.

Para a realização dos cálculos e desenvolvimento do planejamento, as planilhas eletrônicas desenvolvidas em excel por Teófilo e Ferreira (2006) foram utilizadas para a verificação dos níveis a serem usadas no planejamento experimental como mostra a Tabela 3 (Apêndice B).

Tabela 3 - Níveis selecionado para otimização do método miniaturizado empregando Planejamento Experimental Doehlert

Variáveis	Níveis de variáveis 1				
MA ^a	-1	-0,5	0	0,5	1
	0,05	0,1625	0,275	0,3875	0,5
	Níveis de variáveis 2				
TH ^b		-0,866	0	0,866	
		20	40	60	

Legenda: ^aMassa da amostra em gramas (MA), ^bTempo de homogeneização em s. (TH).

Fonte: Autora própria (2020).

Com os resultados obtidos foram analisados de acordo com a estatística descritiva, testada para o modelo linear e as respostas geradas foram submetidas ao teste da ANOVA foi realizada com 5% de nível de significância (p-valor \leq 0,05). Os ajustes do modelos e o grau de significância foram analisados para verificar as respostas obtidas do procedimento de extração miniaturizado.

4.1.7 Esterificação dos ácidos graxos

O processo de esterificação foi realizada para a conversação dos ácidos graxos contidos nos lipídios em esteres metílicos de ácidos graxos (FAME). Eles foram preparados pela transesterificação dos ácidos graxos dos lipídios totais, a qual foi realizada segundo o procedimento de Santos Junior e colaboradores (2014), adaptado de Hartman e Lago (1973). Este método refere-se à preparação de FAME

a partir dos ésteres de ácidos graxos e glicerol de óleos e gorduras, por reação de hidrólise e esterificação utilizando o ultrassom. O método é indicado para ácidos graxos com oito ou mais átomos de carbono, a partir de óleos e gorduras de origem animal ou vegetal, ou inclusive de origem marinha.

Para o procedimento de esterificação foi retirada uma massa de aproximadamente 0,025 g pesada em balança analítica do óleo extraído foi transferido para um tubo Falcon de 15,0 mL. Em seguida foram adicionados 400 µL do padrão interno de tricosanoato de metila (C23:0) em metanol (1 mg mL⁻¹). Na sequência, 4,0 mL de solução de hidróxido de sódio e metanol a 0,50 mol L⁻¹ foram adicionados e o tubo Falcon foi tampado, homogeneizado e levado para o ultrassom Elma E120H por 6 min a temperatura ambiente de 25°C ± 1°C.

Retirado o tubo Falcon do ultrassom, adicionou-se 5,0 mL de solução esterificante contendo cloreto de amônio, metanol e ácido sulfúrico (2 g de NH₄Cl, 60 mL de CH₃OH e 3 mL de H₂SO₄ concentrado). Os tubos foram tampados, homogeneizados e colocados novamente no ultrassom por 5 min para ocorrer a catálise ácida. Em seguida adicionou-se 4,0 mL de solução saturada de cloreto de sódio para a separação das fases, os quais foram homogeneizados em agitador tipo vortex por 30 s. Adicionou-se ao tubo falcon 2,0 mL de isooctano grau cromatográfico, seguido de homogeneização em agitador tipo vortex por 30 s. Os tubos foram mantidos em repouso por 24 h a temperatura de -18°C ± 1°C. Após esse período, as amostras foram colocadas em uma centrífuga a 500 rpm por 6 min para a separação total das fases. O sobrenadante foi retirado e colocado em um vial devidamente identificado para análise cromatográfica. O procedimento de esterificação no formato de fluxograma da extração está disponível no Apêndice B.

4.1.8 Análises cromatográficas

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) extraído dos peixes foram analisados em um cromatógrafo em fase gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID), modelo TRACE GC 1310 (Thermo Scientific) com sistema de injetores, detectores modulares e amostrador automático para identificação e quantificação das amostras.

Os FAMES foram separados em uma coluna capilar de sílica fundida utilizada é a Thermo Scientific™ CG Trace TR-FAME (120 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com fase polar, 70% de cianopropil polissifenileno-siloxano. As condições cromatográficas do GC-FID foram as seguintes: a taxa de fluxo para os gases de transporte (H₂), auxiliar (N₂) e detector de chama (H₂ e ar sintético) foram de 1,1 mL min⁻¹, 40 mL min⁻¹, 30 mL min⁻¹ e 300 mL min⁻¹, respectivamente, todos os gases com alto grau de pureza. A temperatura do detector foi de 225°C e a do injetor foi de 230°C. A programação com temperatura inicial da coluna foi de 180°C por 12 min, programada para aumentar a uma taxa de 5°C min⁻¹ até 190°C por 1 min, aumentando a 1°C min⁻¹ até 210°C por 4 min, aumentando a 15°C min⁻¹ até a temperatura de 240°C, sendo a temperatura mantida durante 10 min. O tempo total de análise foi de 51 min. A razão de *split* de 1:100 e o volume de injeção das amostras de 1 µL.

A identificação dos FAMES baseou-se no tempo de retenção dos analitos encontrados, comparando-se com os do padrão FAME mix C4-C24. A identificação para a confirmação do pico do DHA foi realizada com o padrão do ácido cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico (DHA).

A quantificação dos principais ácidos graxos (mg g⁻¹ de lipídios totais) foram realizadas empregando o padrão interno de tricosanoato de metila (23:0), de acordo com Joseph & Ackman (1992). Os cálculos de quantificação foram realizados, conforme Equação 3.

$$\text{Ácido graxo (mg. g}^{-1} \text{ LT)} = \frac{(A_x)(W_{IS})(TCF_x)}{(A_{IS})(W_X)(1,04)} \times 1000 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

LT = massa dos lipídios totais em mg g⁻¹;

A_x = porcentagem da área do pico dos ácidos graxos analisados;

A_{IS} = área do pico do padrão interno de C23:0;

W_{IS} = massa em mg do padrão interno adicionado na amostra;

W_X = massa da amostra em mg;

TCF_x = fator de correção teórico (do detector de ionização de chama) teórico

1,04 é o fator de conversão para expressa os resultados em mg de ácido graxo.

A Equação 3 fornece informação de quantificação em mg g^{-1} de LT, e com base no teor de lipídios totais nas amostras, o resultado foi expresso em $\text{mg}/100\text{g}$ de peixe (base úmida) de acordo com a literatura (AGUIAR, et al., 2011).

A confirmação da identidade dos FAMES foi realizada empregando um sistema de cromatografia em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (GC-MS), modelo TRACE 1300 *Gas Chromatograph* (Thermo Scientific) com amostrador automático Triplus RSH de injeção de líquidos (Thermo Scientific) acoplado a detector de massas tipo quadrupolo ISQ *Single Quadrupole* (Thermo Scientific) para a confirmação dos picos cromatográficos.

A confirmação da identidade dos FAMES baseou-se nos tempos de retenção, em comparação com o FAME mix C4-C24, e comparados com a biblioteca NIST versão 2019 instalado e no equipamento juntamente com a verificação do CAS Number de cada ácido graxo. As condições cromatográficas foram similares as descritas para a análise em GC-FID. No GC-MS foi utilizado hélio 5,0 como gás de arraste a $1,1 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura de injeção foi de 230°C , temperatura da fonte de íons 200°C e a temperatura da interface de 240°C , sendo que os dados foram adquiridos no modo de varredura completa (SCAN) com faixa de m/z de 50-550 amu para a identificação de uma ampla faixa dos ésteres metílicos de ácidos graxos.

4.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO MINIATURIZADA

O estudo de validação de metodologia para as extrações miniaturizadas dos lipídios foi realizado avaliando-se os parâmetros de: seletividade, especificidade, linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), exatidão e precisão do guia de orientação de método de acordo com INMETRO (2020). O software utilizado para os tratamento dos dados foi o *Microsoft Office Excel 2013*[®] e o software *STATISTICA* versão 8.0 (*StatSoft*, 2007).

4.2.1 Seletividade e especificidade

A seletividade de um método é a capacidade de se analisar um analito, podendo ser em uma matriz complexa ou não sem a interferência de outro analito na mistura. A análise cromatográfica de FAME baseou-se na verificação de 37 picos, assim estudou-se a presença de interferências decorrentes das etapas de preparo de amostra e esterificação.

4.2.2 Linearidade

Apesar do método de quantificação dos ácidos graxos não utilizar propriamente níveis de concentração diferentes para se calcular a concentração do analito, ela foi construída para a comparação dos dados e a verificação do equipamento. As concentrações foram preparadas em seis (6) níveis de concentração em isooctano grau cromatográfico utilizando o padrão de DHA nas concentrações de 3,37 mg L⁻¹, 5,08 mg L⁻¹, 8,45 mg L⁻¹, 16,86 mg L⁻¹, 33,84 mg L⁻¹, 67,68 mg L⁻¹ em iso-octano. Após a obtenção dos resultados das concentrações do DHA, foi construída a curva analítica, considerando o padrão interno de tricosenoato de metila na concentração de 0,40 mg L⁻¹. Avaliou-se o coeficiente de determinação e a análise de variância ANOVA foi realizada com 5% de nível de significância (p-valor ≤ 0,05) (Apêndice B).

4.2.3 Limite de detecção de limite de quantificação

Para o cálculo do limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) utilizou-se a relação sinal/ruído do equipamento. Os valores de LOD e LOQ foram calculados com base no sinal/ruído do equipamento e comparando os sinais analíticos em baixas concentrações de analito até que a concentração conhecida produzisse um sinal equivalente a 3,3 vezes sinal ruído, da região da linha base, próximo ao pico de interesse, determinando assim o LOD. Para a determinação do LOQ, analisou-se um sinal equivalente a 10 vezes o valor do sinal ruído relacionado a região da linha de base, conforme as Equações 4 e 5, respectivamente de acordo com INMETRO (2020).

$$\text{LOD} = 3,3 \times \sigma_{\text{branco}} \quad (\text{Equação 4})$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \sigma_{\text{branco}} \quad (\text{Equação 5})$$

4.2.4 Recuperação

A recuperação do analito DHA foi realizado por meio da adição do padrão de DHA (fortificação) antes da extração miniaturizada. Foram pesadas, aproximadamente 0,275 g amostra de CMS já seca na estufa a 105°C em balança analítica e adicionado 0,100 mL do padrão de DHA em três (3) níveis de concentração, sendo níveis altos, médios e baixos (concentrações de 0,120 mg g⁻¹; 0,060 mg g⁻¹ e 0,020 mg g⁻¹, respectivamente), após a adição do padrão de DHA a cada amostra de CMS, o padrão ficou em repouso durante um período de 24h e a extração ocorreu somente no dia seguinte. Foram realizadas um total de nove (9) determinações, sendo estudados três (3) níveis em três (3) repetições de DHA e calculado de acordo com a Equação 6 do guia de orientações sobre validação do métodos analíticos do INMETRO (2020).

$$\text{Recuperação (\%)} = \left(\frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Sendo:

C₁= concentração do analito na amostra fortificada;

C₂= concentração do analito na amostra não fortificada;

C₃= concentração do analito adicionado à amostra fortificada.

4.2.5 Precisão

Seguindo o procedimento do item 4.2.4, o ensaio de precisão foi realizado para por meio dos ensaio de repetibilidade e precisão intermediária. No estudo de repetibilidade foram realizadas um total de nove (9) determinações, sendo três (3) níveis x três (3) repetições, considerando níveis altos, médios e baixos (concentrações de 0,120 mg g⁻¹; 0,060 mg g⁻¹ e 0,020 mg g⁻¹, respectivamente) por um mesmo analista, nas mesmas condições de operação, com a mesma

instrumentação com uma semana de diferença entre as análises. Na precisão intermediária, estes mesmos intervalos foram estudados, com o auxílio de outro analista. A repetibilidade e a precisão intermediária foram calculadas por meio da Equação 7, avaliando o desvio padrão relativo, de acordo com o guia de orientações sobre validação dos métodos analíticos do INMETRO (2020).

$$DPR = \left(\frac{DP}{CMD} \right) \times 100 \quad (\text{Equação 7})$$

Onde:

DPR: Desvio padrão relativo;

DP: Desvio padrão;

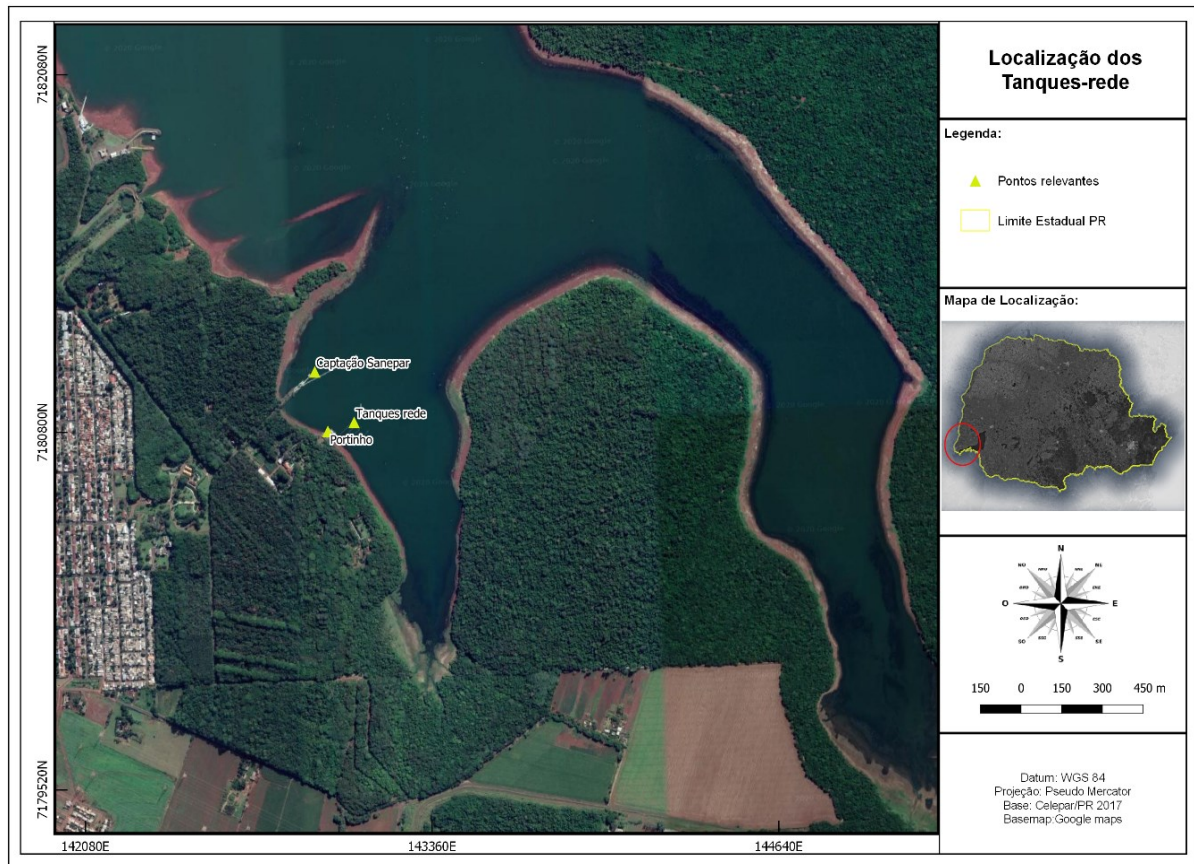
CMD: Concentração média determinada.

4.3 ESTUDO DE INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) NA ALIMENTAÇÃO DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

4.3.1 Local do cultivo dos peixes

Os ensaios do cultivo de peixes foram realizados na Estação de Pesquisa em Piscicultura e Ecologia de Espécies Nativas, no Reservatório da Itaipu Binacional, localizado junto ao Portinho do Refúgio Biológico de Bella Vista na cidade de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil (-25.447012, -54.548659 WGS84) (Figura 3). A dieta com a incorporação do DHA na ração dos peixes cultivados em tanques-rede teve início no final do mês de setembro de 2020 e seu término no início de dezembro de 2020, essas datas foram selecionadas por ser início da primavera, esse período é recomendado a peixes tropicais, pois a média de temperatura não ficou abaixo de 18°C ou superior a 32°C (Climate, 2021).

Figura 3 - Localização geográfica dos tanques-rede



Fonte: Autora própria (2020).

4.3.2 Cultivo dos Peixes

A adição da microalga *Schizochytrium* sp. (DHA gold™®, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brasil) para a produção das rações foi realizada no Instituto Federal do Paraná, campus de Foz do Iguaçu, Paraná (IFPR) no mês de setembro de 2020. Utilizando um moinho de martelo, com peneira de 0,8 mm para moagem dos ingredientes (farelo de soja, milho, farelo de trigo, farinha de penas e farinha de tilápia) de acordo com os níveis pré-estabelecidos na Tabela 4. Ao material moído foi misturado outros ingredientes, e submetido a extrusão, processo onde se adiciona os ingredientes finamente moídos juntamente com água ou vapor d'água sob alta pressão e temperatura, passam por um cozimento na extrusora (modelo EX MICRO® modelo EX 30) com matriz de 3 mm formando uma ração com espessura aproximada de 4 a 5 mm.

Tabela 4 - Ingredientes e composição proximal da ração

Ingredientes (%)	Tratamento ^a				
	A	B	C	D	E
<i>Schizochytrium</i> sp. (DHA gold™)	0,00	1,00	2,00	3,00	4,00
Farelo de trigo	32,93	31,93	30,93	29,93	28,93
Milho	25,00	25,00	25,00	25,00	25,00
Farelo de soja	23,42	23,42	23,42	23,42	23,42
Farinha de tilápia	9,13	9,13	9,13	9,13	9,13
Farinha de penas	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Óleo de soja	2,41	2,41	2,41	2,41	2,41
Sal comum	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Suplemento mineral e vitamínico*	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Lisina	0,44	0,44	0,44	0,44	0,44
Metionina	0,12	0,12	0,12	0,12	0,12
Treonina	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Cloreto de colina	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Vitamina C	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Antiungico	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
Antioxidante	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tratamento^a: A (0,00%), B (1,00%), C (2,00%), D (3,00%), e E (4,00%) completando 32,93% do valor de farelo de trigo e aditivo. Valores nutricionais calculados: Amido: 28,00%; Arginina: 1,96%; Cálcio: 0,84%; Colina: 6000,00 mg kg⁻¹; Energia d. redondos: 3123,00 kcal kg⁻¹; Proteína bruta: 25,00%; Fenilalanina total: 1,25%; Fibra bruta: 4,80%; Fósforo disponível: 0,37%; Fósforo total: 0,80%.

Fonte: Autora própria (2020).

As rações foram analisadas pelo método miniaturizado para confirmar a incorporação da microalga *Schizochytrium* sp. (DHA gold™®, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brasil) em todos os níveis de inclusão do DHA.

No estudo de incorporação foram utilizados 550 pacus saudáveis da espécie *Piaractus mesopotamicus* entre machos e fêmeas adultos, com peso médio entre 700 ± 100 gramas de peso vivo, distribuídos em cinco (5) grupos experimentais independentes, contendo 110 peixes em cada tanque-rede. Os peixes permaneceram por 30 dias nos tanques-rede sendo alimentados com ração comercial para dar início ao procedimento experimental.

No tanque A, foram adicionados os peixes que receberam a ração controle sem adição da microalga, já nos demais quatro (4) tanques foram adicionados porcentagens diferentes de inclusão da microalga *Schizochytrium* sp (DHA gold™®, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brasil) a ração, conforme descrito na Tabela 4. A porcentagem de farelo de trigo foi reduzida de acordo com a adição da microalga *Schizochytrium* sp. a sua composição, para manter o percentual de ingredientes adicionados para a produção da ração.

Os tanques-redes denominados B, C, D e E tiveram a adição na ração no teor de 1%, 2%, 3% e 4% (m/m), respectivamente (Apêndice B). Os grupos foram

submetidos a alimentação duas vezes ao dia no período da manhã às 09:00 h e no período da tarde as 16:00 h totalizando 60 dias de tratamento.

As amostras foram coletadas nos intervalos de tempo 0, 15, 30, 45 e 60 dias, iniciado no mês de outubro de 2020 e finalizado no mês de dezembro de 2020 foram coletados cinco peixes por amostragem entre machos e fêmeas adultos de cada tanque-rede e em cada intervalo de tempo, distribuídos em 5 grupos experimentais independentes. Os abates dos peixes foram realizados pela equipe de técnicos da Itaipu Binacional, juntamente com os pesquisadores do Instituto Federal do Paraná, seguindo os protocolos do Comitê de Ética no Uso de animais, conforme certificação da CEUA/IFPR (Anexo A).

4.4.2 Delineamento para o tratamento dos peixes e análise

Para avaliar se o efeito dos níveis de incorporação de DHA na ração em relação ao tempo de tratamento do peixe foram significativos na incorporação do DHA na CMS do peixe, foi utilizado um Delineamento Experimental Fatorial 5² (Tabela 5) sendo testados vinte cinco (25) tratamentos com três (3) repetições cada. A análise do diagrama de pareto para os níveis de incorporação de DHA a CMS do peixe e o tempo de tratamento foram construído para auxiliar na escolha das melhores variáveis, considerando maior absorção do DHA e menor tempo. O teste de Tukey também foi realizada, com 5% de nível de significância (p-valor ≤ 0,05) para os dados de acúmulo de DHA no peixe utilizando o software *STATISTICA* versão 8.0 (*StatSoft, 2007*).

Tabela 5 - Delineamento Experimental Fatorial 5²

Fatores	Níveis				
	(-2)	(-1)	0	(+1)	(+2)
Níveis de incorporação de DHA (%)	0	1	2	3	4
Tempo de tratamento (dias)	0	15	30	45	60

Fonte: Autora própria (2021).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 DESENVOLVIMENTO DO METODO MINIATURIZADO

5.1.1 Determinação da umidade da amostra do desenvolvimento do método miniaturizado

A análise da umidade das amostras foi realizada com a CMS do peixe coletados no mês de maio de 2020, antes da separação das aliquotas para o preparo da matriz liofilizada e seca a 105°C com peso constante. O valor obtido da umidade foi de 71,86% \pm 0,62%, valor muito próximo ao obtido por Castro e colaboradores (2007) sendo de 72,33%. Essas variações acontecem por vários fatores, entre eles pode ser destacado o tipo de alimentação as quais o peixe tenha passado e características ambientais (NEFF et al., 2014; BONAFÉ et al., 2017; OZOGUL et al., 2018).

O teor de umidade é uma variável importante no estudo de extração quando usado as proporções de solventes definidas por Bligh e Dyer (1959) pois é considerada a quantidade de água presente na matriz para a que a proporção de reagentes seja adequada para a extração.

As outras caracterizações da composição centesimal não foram analisadas e os resultados utilizados foram baseados nos trabalhos de Borges e colaboradores (2013) e Pinto e colaboradores (2020).

Outras caracterizações como da composição centesimal do pacu *Piaractus mesopotamicus* foi realizada por Borges e colaboradores (2013) que avaliaram a umidade, proteínas, cinzas e lipídios em peixes coletados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os valores obtidos podem variar entre 75,51 g 100g⁻¹ a 70,04 g 100g⁻¹ de umidade, 20,58 g.100g⁻¹ a 25,08 g.100g⁻¹ de proteína, 2,42 g 100g⁻¹ a 1,91 g 100g⁻¹ de cinzas e 1,89 g 100g⁻¹ a 3,04 g 100g⁻¹ de lipídios totais (BORGES et al., 2013), esses valores foram muito próximos encontrados também por Pinto e colaboradores (2020). Fatores que alteram essas características como o teor de

umidade do músculo pacu diminui ao longo de sua vida útil, os teores de proteínas e lipídios aumentam e o teor de cinzas permanece constante (BORGES et al., 2013).

5.1.2 Seleção do tipo de processamento da amostra

A etapa da escolha da matriz do trabalho do peixe foi uma etapa importante para garantir em qual deles seria obtido a maior porcentagem dos lipídios obtidos, tempo de preparo e tempo de extração. Estudos como de Ozogul e colaboradores (2018) trabalharam com amostras *in natura* para extrair o conteúdo lipídico de diversas espécies de peixes do Nordeste do Mediterrâneo (OZOGUL et al., 2018). Para a matriz liofilizada Neff e colaboradores (2014) realizaram o processo de extração dos lipídios para a determinação do perfil de ácidos graxos de peixes de água doce (NEFF et al., 2014). Para a matriz seca a 105°C por 24 h a peso constante Jafarpour e colaboradores (2014) utilizaram essa matriz para a extração lipídica, determinação do teor de óleo no bacalhau e o perfil dos ácidos graxos (JAFARPOUR et al., 2020).

A matriz *in natura*, matriz liofilizada e matriz seca a peso constante foram submetidas ao procedimento de extração de lipídios de *Piaractus mesopotamicus*, empregando-se o método miniaturizado com os níveis definidos das variáveis do planejamento Doehlert. As amostras utilizadas foram as coletadas para o desenvolvimento do método no mês de maio de 2020, antes das coletas dos peixes com a inclusão da ração com DHA. Foram avaliados nessas matrizes o maior rendimento dos lipídios extraído e o menor valor do desvio padrão para a resposta obtida das análises cromatográficas de quantificação do DHA. A extração pelo método Bligh e Dyer também foi utilizada para fins de comparação (Tabela 6).

A matriz *in natura* apresentou problemas durante o procedimento de extração, pois absorvia todo solvente, aparentando a formação de emulsão logo na primeira adição e dificultando a verificação dos solvente adicionado e homogeneização com o ultra homogeneizador tipo mixer. Durante a extração com o ultra homogeneizador de amostras tipo mixer as fibras do peixe travavam as hastes do equipamento, aumentando o tempo de extração em até 3 min a mais por amostra (Figura 4).

Figura 4 - Procedimento de extração da matriz *in natura* no método miniaturizado



Fonte: Autora própria (2020).

Durante a filtração por seringa também ocorreram problemas, pois o embolo ficava rígido provavelmente porque o solvente interagiu com a borracha do êmbolo, dificultando assim a filtração. Essa rigidez, porém, foi observada somente na amostra *in natura*, sendo outra possibilidade levantada que houvesse algum tipo de interação da amostra com o solvente. Quando comparando com o método Bligh e Dyer o rendimento foi abaixo do esperado (Tabela 6).

Quando analisada a matriz liofilizada no método miniaturizado, a absorção do solvente foi muito mais evidente que na matriz *in natura*, quando analisado visualmente o aspecto da amostra com solvente, sua apresentação era uma massa uniforme, dificultando a observação da adição do solvente (Apêndice C). Isso pode ser um indício para justificar os resultados obtidos para o desvio padrão da extração tanto para os lipídios totais como para a quantificação do DHA terem sido elevados, indicando assim que os valores estavam mais dispersos do conjunto avaliado.

Os valores superiores de extração de lipídios e de DHA foram obtidos na extração utilizando a matriz seca na estufa a 105°C por 24 h (Tabela 6) (Apêndice C). Analisando o desvio padrão das matrizes no método miniaturizado para os lipídios totais extraídos, a matriz que obteve os menores valores de desvio padrão médio foram para as matrizes *in natura* e seca a peso constante. O valor obtido dos lipídios totais extraído foi de 8,1% ± 0,8%, inferior aos obtidos por Tanamati e colaboradores (2009), de 12,2% ± 0,4%, para o *Piaractus mesopotamicus* cultivado. Ramos Filho e colaboradores (2008) obtiveram um valor de 19,83% ± 0,12% de lipídios do *Piaractus mesopotamicus* capturado no rio Miranda no estado do Mato

Grosso do Sul, similar aos valores obtidos neste estudo para a matriz seca a 105°C por 24 h.

Para a quantificação do DHA, a matriz que obteve o maior rendimento comparando com o método Bligh e Dyer (1959) foi também a matriz seca a peso constante, além dos valores do desvio padrão serem os menores tanto para o método miniaturizado como para o método de referência. Quando considerado o tempo total de análise, esta foi de 30 min para análise da matriz seca a peso constante e de 3 h para o método Bligh e Dyer (1959).

Tabela 6 - Resultados da extração do método miniaturizado comparando o Bligh e Dyer para a determinação do rendimento dos lipídios totais e quantificação do DHA

Matriz do peixe	Lipídio total extraído (%) ^a	Média (%)	Quantificação do DHA (mg/100g de peixe)	Média (mg/100g de peixe)
<i>In natura</i> Miniaturizado	8,60	8,10 ± 0,80	0,0127	0,0118 ± 0,0044
	8,61		0,0157	
	7,10		0,0071	
<i>In natura</i> Bligh e Dyer	4,61	5,39 ± 0,97	0,0111	0,0102 ± 0,0014
	5,08		0,0086	
	6,48		0,0108	
Liofilizado Miniaturizado	11,53	13,56 ± 5,34	0,0168	0,0141 ± 0,0095
	9,28		0,0027	
	19,88		0,0227	
Liofilizado Bligh e Dyer	17,20	19,90 ± 2,72	0,0325	0,0282 ± 0,0102
	19,88		0,0355	
	22,63		0,0166	
Seco a 105°C Miniaturizado	20,33	19,44 ± 0,88	0,0409	0,0412 ± 0,0009
	19,43		0,0422	
	18,57		0,0405	
Seco a 105°C Bligh e Dyer	18,49	18,49 ± 0,36	0,0381	0,0380 ± 0,0001
	18,13		0,0379	
	18,85		0,0381	

Legenda: Valores da média ± desvio padrão de três replicatas.

Fonte: Autora própria (2020).

Após a interpretação dos resultados obtidos da quantidade de DHA extraída pelo método miniaturizado e pelo método comparativo Bligh e Dyer, a ANOVA e o teste de Tukey foram analisados para verificar qual a melhor matriz de trabalho avaliando estatisticamente, e de acordo com resultado do lineamento inteiramente ao acaso para as variáveis dependentes de lipídios totais extraído e a quantidade de DHA em mg/100g de peixe. Os resultados obtidos pela ANOVA mostraram que pelo menos um dos tratamentos é significativo, indicando diferença no processo de preparo da matriz p-valor <0,05 e extração comparando com as demais matrizes p-valor <0,05. A partir dessa informação, o teste de Tukey apresentou os seguintes resultados conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Teste de Tukey para determinar qual a melhor matriz de extração

	<i>In natura</i> Miniaturizada	<i>In natura</i> Bligh e Dyer	Liofilizada Miniaturizada	Liofilizada Bligh e Dyer	Seca a 105°C Miniaturizada	Seca a 105°C Bligh e Dyer
Lipídios extraídos	8,10 ± 0,80 ^{bc}	5,39 ± 0,97 ^b	13,56 ± 5,34 ^{ac}	19,90 ± 2,72 ^a	19,44 ± 0,88 ^a	18,49 ± 0,36 ^a
DHA obtido	0,0118 ± 0,0044 ^{de}	0,0102 ± 0,0014 ^d	0,0141 ± 0,0095 ^{de}	0,0282 ± 0,0102 ^{ef}	0,0380 ± 0,0009 ^f	0,0412 ± 0,0001 ^f

*valores expressos pela média ± desvio padrão.

Letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo Teste Tukey à 95% de nível de confiança (p-valor<0,05).

Fonte: Autora própria (2021).

Observando os resultados gerados no teste de Tukey, foi confirmado que as extrações utilizando a matriz da CMS seca a 105°C com peso constante diferem tanto para a extração de lipídios totais como para a quantificação de DHA em mg/100g de peixe, além de apresentarem os maiores valores de extração lipídica, quantificação de DHA e menores desvios padrão, como verificado na Tabelas 6 e 7.

5.1.3 Resultados obtidos com outros solventes de extração

Testes prévios foram realizados com outras proporções antes da construção do planejamento experimental para avaliar a eficiência de outros solventes, como a mistura de n-hexano:etanol (1:1, v/v) e diclorometano:metanol (2:1, v/v), a proporção clorofórmio:metanol (1:2, v/v) foi testado juntamente. Os resultados obtidos não atingiram valores esperados, como mostra a Tabela 8, para a mistura de n-hexano:etanol (1:1 v/v) o valor de lipídios totais extraído em porcentagem foi de 3,49% ± 0,93%, muito inferior ao encontrado no método de Bligh e Dyer (1959). Para a mistura de diclorometano:metanol (2:1, v/v), o valor de lipídios totais extraído em porcentagem foi de 89,09% ± 36,14%, muito superior comparado aos métodos de Bligh e Dyer (1959), Folch e colaboradores (1957). Com relação a quantificação de DHA em mg/100g de peixe, os valores obtidos também foram discrepantes comparando com os obtidos na literatura e com os solventes utilizados por Bligh e Dyer e comparando com o método Bligh e Dyer realizado para comparação, como mostra a Tabela 8. Como pode ser observado, os resultados obtidos pela mistura de solventes n-hexano:etanol (1:1 v/v), o valor de DHA obtido foi de 19 vezes menos que pela proporção de solventes do método Bligh e Dyer. Já com relação a mistura diclorometano:metanol (2:1, v/v), o valor obtido foi o dobro comparada ao solvente

do método Bligh e Dyer, uma possibilidade é que durante o procedimento de extração não somente os lipídios estejam sendo extraídos, mas outros compostos de mesma polaridade do solvente.

Tabela 8 - Resultados da extração do método miniaturizado com diferentes misturas de solvente para a determinação do rendimento dos lipídios totais e quantificação do DHA

Solvente de extração	Lipídio total extraído (%) ^a	Média (%)	Quantificação do DHA (mg/100g de peixe)	Média (mg/100g de peixe)
n-hexano:etanol (1:1, v/v)	2,80	3,49 ± 0,93	0,0042	0,0025 ± 0,0020
	4,55		0,0029	
	3,12		0,0003	
diclorometano:metanol (2:1, v/v)	68,00	89,09 ± 36,14	0,0127	0,0684 ± 0,0756
	68,44		0,0380	
	130,82		0,1545	
clorofórmio: metanol (1:2, v/v)	18,49	18,49 ± 0,36	0,0381	0,0380 ± 0,0001
	18,13		0,0379	
	18,85		0,0381	

Legenda: Valores da média ± desvio padrão de três replicatas.

Fonte: Autora própria (2021).

Com base nos resultados obtidos, foi estabelecido que a natureza dos solventes de extração foram os mesmos do método de Bligh e Dyer (1959) seguindo as mesmas proporções.

5.1.4 Avaliação das variáveis massa de amostra e tempo de homogeneização empregando o planejamento experimental Doehlert.

As variáveis massa da amostra (MA) em 5 níveis no intervalo de 0,05 g a 0,5 g e o tempo de homogeneização (TH) em 3 níveis no intervalo de 20 a 60 s foram avaliadas pelo Delineamento Doehlert. A resposta analítica foi a concentração de DHA em mg/100g da CMS de peixe obtidas por meio da equação de Joseph & Ackman (1992) (Tabela 9).

Tabela 9 - Níveis das variável selecionada e respostas associadas ao planejamento Doehlert

Ensaio	Variáveis		Resposta
	Massa de amostra (g)	Tempo de homogeneização (s)	Concentração de DHA em mg/100g de CMS de peixe
1	0,500	40	0,0419
2	0,387	60	0,0376
3	0,050	40	0,0314
4	0,162	20	0,0333
5	0,387	20	0,0383

6	0,162	60	0,0342
7	0,275	40	0,0361
8	0,275	40	0,0358
9	0,275	40	0,0367
10	0,275	40	0,0364
11	0,275	40	0,0356
12	0,275	40	0,0360
13	0,275	40	0,0369

Fonte: Autora própria (2020).

A matriz Doehlert foi testada para o modelo linear com base nos resultados obtidos na Tabela 9. A resposta gerada para ajuste no modelo linear foi avaliada pela ANOVA de regressão e considerou a regressão significativa e a falta de ajuste não significativo para o modelo a nível de significância de 5% e o teste F para a avaliação do DHA (Tabela 10).

Tabela 10 - Análise da variância (ANOVA) para a avaliação do DHA aplicando o planejamento Doehlert no modelo linear

FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	Ftab.	p
Regressão	$7,3 \cdot 10^{-05}$	3	$2,4 \cdot 10^{-05}$	73,47	8,74	$1,19 \cdot 10^{-06}$
Resíduos	$3,0 \cdot 10^{-06}$	9	$3,3 \cdot 10^{-07}$			
Falta de Ajuste	$1,6 \cdot 10^{-06}$	3	$5,4 \cdot 10^{-07}$	2,40	8,74	0,16
Erro Puro	$1,3 \cdot 10^{-06}$	6	$2,2 \cdot 10^{-07}$			
Total	$7,6 \cdot 10^{-05}$	12				
% Variável Explicativa				96,08		
% Máxima variação explicável				98,22		

Onde: FV = fonte de variação; SQ = soma quadrática; nGL = número de graus de liberdade; MQ = média quadrática; Fcal = valor de F calculado; Ftab = valor de F tabelado a nível de 5% de probabilidade, p = nível de significância; SG = valor significativo.

Fonte: Autora própria (2020).

Como os valores obtidos da ANOVA para o modelo linear apresentou resultado satisfatório para a regressão e para a falta de ajuste, o modelo pode ser considerado adequado, pois o valor de F calculado da regressão maior que o valor de F tabela (73,47 e 8,74, respectivamente) indicando que o modelo de regressão é satisfatório. A falta de ajuste apresentou que o valor tabelado é maior que o valor calculado (8,74 e 2,40, respectivamente) indicando homocedasticidade na dispersão dos resíduos em torno da média, sendo que esses foram constantes.

Para considerar um modelo aceitável o valor da porcentagem de variação explicativa e porcentagem máxima da variação explicável precisam estar acima de 95%. Informação do gráfico de regressão do valor estimado x observado e a distribuição dos resíduos estão disponíveis no Apêndice C.

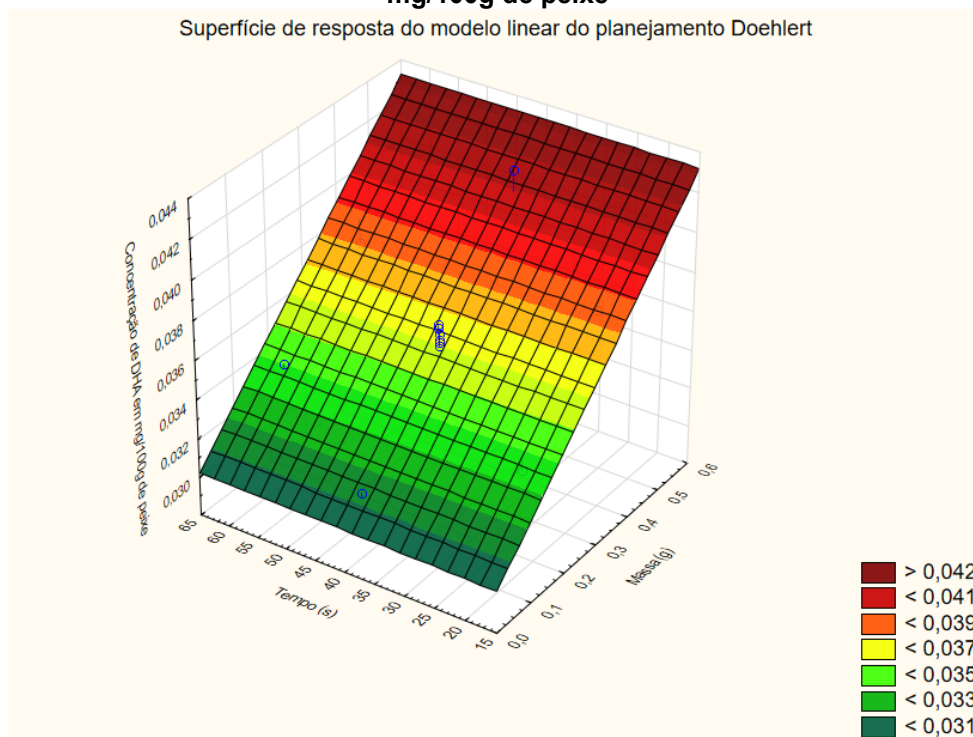
Foram extraídos os dados para gerar a superfície de resposta representada pelas Equações 8 do modelo linear e a Figura 5 a superfície de respostas para o modelo.

$$y = 1,742 + 0,235x_1 + 0,003x_2 \quad (\text{Equação 8})$$

Onde: y é a intensidade do sinal, x₁ é a quantidade de amostra e x₂ é o tempo de extração com o homogeneizador.

A variação máxima explicável do modelo linear foi de 98%, demonstrando que o modelo apresenta um ótimo ajuste.

Figura 5 - Superfície de resposta para otimização Matriz Doehlert com duas variáveis, massa de peixe (g), tempo de homogeneização (s) com resposta da concentração de DHA em mg/100g de peixe



Sendo: quando mais interação a variável tiver, mais ela irá tender para a coloração vermelha.

Fonte: Autora própria (2020).

Pela tendência do gráfico, a situação ótima para a extração do DHA seria com a quantidade máxima de massa em gramas de CMS do peixe seco e o tempo de extração não influenciou no resultado. Como as respostas com a massa do ponto central obtiveram resultados satisfatórios com valores de 0,275 g, optou-se em trabalhar com essa massa e para a utilização do ultra homogeneizador tipo mixer

com um tempo mínimo de 20 s, sendo tempo suficiente para extrair o analito de maneira eficiente. Sendo assim, os valores numéricos das variáveis foram fixados.

5.1.5 Método cromatográfico

No desenvolvimento do método cromatográfico procedeu-se a confirmação da identidade dos ésteres metílicos de ácidos graxos no padrão FAME mix C4-C24, MiX e nas amostras. A Tabela 11 apresenta os FAMES com os tempos de retenção, CAS number e a razão *m/z*. As condições cromatográficas em operação no GC-FID e no GC-MS foram equivalentes. Os valores do tempo de retenção dos equipamentos tiveram pequenas variações dentro do aceitável na cromatografia, tendo uma janela de $\pm 5\%$, sem prejudicar na avaliação de cada ácido graxo.

Tabela 11 - Identificação de FAMES no GC-MS para confirmação dos ácido graxos

No. Picos	No. FAME	Peak Name	RT FAME	Área	Área %	CAS Number	<i>m/z</i>
1	1	C4:0	8,20	0,086	1	623-42-7	74, 87
2	2	C6:0	8,43	0,143	2	106-70-7	74, 87
3	3	C8:0	8,84	0,176	3	111-11-5	74, 87
4	4	C10:0	9,60	0,202	3	110-42-9	74, 87
5	5	C11:0	10,19	0,106	2	1731-86-8	74, 87
6	6	C12:0	10,98	0,232	4	111-82-0	74, 87
7	7	C13:0	12,05	0,119	2	1731-88-0	74, 87
8	8	C14:0	13,41	0,253	4	124-10-7	74, 87, 55
9	9	C14:1	14,41	0,123	2	56219-06-8	55, 74, 87
10	10	C15:0	15,05	0,129	2	7132-64-1	74, 55, 87
11	11	C15:1	16,30	0,126	2	90176-52-6	55, 74, 96
12	12	C16:0	17,08	0,399	7	112-39-0	74, 87
13	13	C16:1	18,27	0,129	2	1120-25-8	55, 69, 74
14	14	C17:0	19,51	0,127	2	1731-92-6	74, 87
15	15	C17:1	20,92	0,129	2	75190-82-8	55, 69, 74
16	16	C18:0	22,36	0,261	4	112-61-8	74, 87
17	17	C18:1n-9t	23,16	0,129	2	1937-62-8	55, 69, 83
18	18	C18:1	23,71	0,263	4	112-62-9	55, 69, 74
19	19	C18:2n-6t	24,61	0,129	2	2566-97-4	67, 81, 95
20	20	C18:2n-6c	25,99	0,131	2	112-63-0	67, 81, 95
21	22	C18:3n-6 (LNA)	27,60	0,128	2	16326-32-2	79, 67, 80
22	24	C18:3n-3 (ALA)	28,91	0,128	2	301-00-8	74, 87
23	21	C20:0	29,21	0,256	4	1120-28-1	55, 87
24	23	C20:1	30,86	0,128	2	2390-09-2	55, 69, 83
25	25	C21:0	33,11	0,125	2	6064-90-0	74, 87
26	26	C20:2	33,63	0,127	2	2463-02-7	67, 81, 95
27	28	C20:3n-6c	35,51	0,112	2	21061-10-9	79,80 95
28	30	C20:4n-3c	36,86	0,122	2	2566-89-4	67,91
29	32	C20:3n-3	37,09	0,124	2	55682-88-7	67, 79, 91
30	27	C22:0	37,35	0,253	4	929-77-1	55,87
31	29	C22:1n-9	39,39	0,123	2	1120-34-9	55, 69, 80
32	35	C20:5n-3 (EPA)	40,43	0,120	2	2734-47-6	67, 79, 91

No. Picos	No. FAME	Peak Name	RT FAME	Área	Área %	CAS Number	m/z
33	31	C23:0	41,17	0,133	2	2433-97-8	74, 87
34	33	C22:2	41,57	0,128	2	61012-47-3	81, 67, 95
35	34	C24:0	43,86	0,258	4	2442-49-1	74, 87
36	36	C24:1	45,14	0,128	2	2733-88-2	55, 69, 83
37	37	C22:6n-3 (DHA)	47,23	0,106	2	2566-90-7	79, 91, 67
Total				5,889	100		

Legenda: Na primeira coluna consta a ordem das posições dos ácidos graxos esterificados obtidos no GC-MS, na segunda coluna consta a posição dos picos de acordo com a referência do padrão FAME.

Fonte: Autora própria (2020).

Foram observados que as ordens de alguns picos mudaram de posição, comparação realizada com o certificado do padrão FAME e os resultados obtidos (Tabela 11). A partir do pico 21 a posição dos ácidos graxos, considerando o pico do certificado (coluna 2) mudaram de posição conforme o tempo e a temperatura foram aumentando.

Acredita-se que essa mudança na posição dos picos cromatográficos tenha ocorrido devido alguns fatores, como a diferença das colunas cromatográficas neste estudo e a coluna de teste do padrão comercial que não possuem as mesmas características, além das condições cromatográficas. A coluna usada pelo fornecedor do padrão foi uma coluna capilar de sílica fundida Supelco SP2560 (100m x 0,25 mm x 0.2 µm) com alta polaridade, 88% de cianpropil arilpolisiloxano, nas condições cromatográficas de temperatura inicial da coluna de 100°C por 5 min, programada para aumentar para a uma taxa de 4°C min⁻¹ até 240°C sendo mantida durante 15 min. A razão de *split* será de 1:50 e o volume de injeção das amostras de 1 µL, condições bem diferentes do método desenvolvido. Já a coluna usada para o desenvolvimento do método é uma coluna capilar da Thermo Scientific™ CG Trace TR-FAME.

5.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO MINIATURIZADO

A validação da metodologia para esse trabalho foi em relação ao processo de extração pelo método miniaturizado para a detecção dos lipídios totais do *Piaractus mesopotamicus*, identificação por GC-FID e quantificação do DHA. Foram avaliados e validados os parâmetros de seletividade, linearidade, limite de detecção

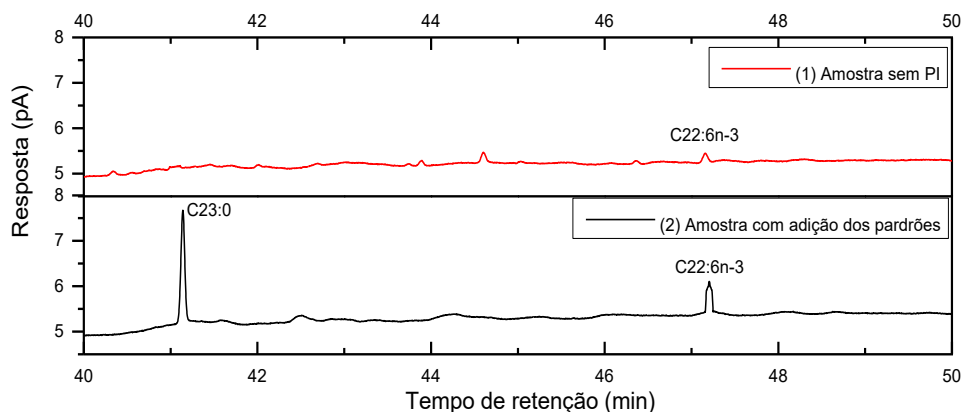
(LOD), limite de quantificação (LOQ), recuperação, repetibilidade e precisão intermediária. Os cálculos foram realizados utilizando a planilha desenvolvida por Ribeiro e Ferreira (2008).

5.2.1 Seletividade e especificidade

A seletividade foi realizada utilizando os reagentes de extração e esterificação na amostra com e sem adição do padrão interno e DHA, porém a matriz do *Piaractus mesopotamicus* contém naturalmente o DHA como é mostrado na Figura 6.

A especificidade do método pode ser verificada na Figura 6, onde é possível garantir que o sinal medido é referente ao analito de interesse, no caso o C23:0 e o DHA. Ele é específico pois estamos caracterizando somente os analitos alvos da validação do método de extração.

Figura 6 - Cromatogramas da amostra extraídos do GC-FID: (1) sem adição de padrão; (2) com adição dos padrões de C23:0 e do DHA nas concentrações de 0,40 mg L⁻¹ e 0,02 mg⁻¹, respectivamente a amostra



Fonte: Autora própria (2021).

No Apêndice C está disponível o espectro de massas dos padrões de tricosenoato de metila e o do DHA, confirmando no GC-MS e a tabela da biblioteca NIST 2.2 com a probabilidade dos compostos.

5.2.2 Linearidade

Os valores da equação da reta e o coeficiente de determinação (R^2) para uma curva de DHA foram avaliados, destacando que essa curva analítica não foi utilizada para determinar a concentração do analito, porém esse foi um passo importante dentro dos procedimentos de validação como um dos itens estipulados do guia de orientação de método do INMETRO (2020), além da verificação da capacidade do equipamento em obter determinada resposta analítica. Os dados obtidos dos parâmetros de regressão foram realizados para uma faixa de linearidade entre $3,37 \text{ mg L}^{-1}$ a $67,69 \text{ mg L}^{-1}$, obtendo-se a equação da reta e o valor de R. Na validação de linearidade, foram analisadas a regressão do F calculado e p-valor, e a falta de ajuste com F calculado e p-valor, conforme mostrado na Tabela 12. Gráfico da curva analítica e ANOVA no Apêndice E.

Tabela 12 - Parâmetros de linearidade para o DHA

Padrão de DHA em solvente						
Parâmetros de Regressão			Validação Linearidade			
Equação		R^2	Regressão		Falta de ajuste	
DHA	$y = 0,0259x - 0,0163$	0,998	$F_{\text{calculado}}$	p-valor	$F_{\text{calculado}}$	p-valor
			8919,05	$\leq 0,05$	1482,24	$\leq 0,05$

Fonte: Autora própria (2021).

Como o p-valor foi menor de 0,05, explicou-se que 99,8% a variação da concentração do DHA na curva analítica.

5.2.3 Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram identificados pelo método utilizando a relação sinal/ruído (S/N) do equipamento. Os valores de LOD foram obtidos plotando a taxa do sinal/ruído contra a concentração da solução com relação a área, para o DHA foi de $0,0039 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$. O valor de LOQ com relação a área para o DHA foi de $0,0129 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$.

5.2.4 Recuperação

Na análise de recuperação avaliando os três (3) níveis de concentração para o DHA, realizadas em triplicata, os valores obtidos ficaram na faixa de concentração de 0,020 mg g⁻¹ (nível 1) e 0,060 mg g⁻¹ (nível 2) correspondendo a um intervalo de 90 a 107% e para 0,120 mg g⁻¹ (nível 3) um intervalo de 95 a 105%. Os valores obtidos da recuperação (Tabela 13) estão dentro dos critérios sugeridos AOAC trazidos pelo guia de orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO (2020).

Tabela 13 - Recuperação (%) em três níveis de concentração de DHA adicionada a amostra de peixe

Analito	Nível 1 n =3		Nível 2 n =3		Nível 3 n =3	
	Concentração de DHA (mg g ⁻¹)	0,020	DPR	0,060 ¹	DPR	0,120
Recuperação %	90,95	0,14	96,24	0,13	102,44	0,21

Sendo: n: número de extrações realizada para cada nível; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Autora própria (2021).

5.2.5 Precisão

No estudo de precisão foram avaliados a repetibilidade (Tabela 14) e a precisão intermediária (Tabela 15). Os valores que são aceitáveis para o desvio padrão relativo (DPR) para os níveis 1 e 2 são de até 5,3% e para o desvio padrão relativo para o nível 3 de até 3,7% para o nível 3 segundo o de orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO (2020). Com isso, observou-se que todos os valores de DPR obtidos estão dentro da faixa estabelecida.

Tabela 14 - Avaliação da repetibilidade para o DHA na amostra de peixe

Analito	Nível 1 (n =6)			Nível 2 (n =6)			Nível 3 (n =6)		
	C _t	C _p	DPR (%)	C _t	C _p	DPR (%)	C _t	C _p	DPR (%)
DHA	0,1481	0,1276	2,0	0,1793	0,1652	2,1	0,2371	0,2477	2,4

Sendo: n: número de extrações realizada para cada nível; C_t: a concentração teórica em relação a área do DHA; C_p: concentração predita em relação a área do DHA; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Autora própria (2021).

A precisão intermediária nos ensaios realizados foi avaliada em dias diferentes em um espaço de sete (7) dias, diferentes analistas, no mesmo laboratório e os mesmos equipamentos. Observou-se que todos os valores de DPR obtidos estão dentro da faixa estabelecida.

Tabela 15 - Valores obtidos do ensaio de precisão intermediária para três níveis de concentrações em dias diferentes por analistas diferentes

Analito	Nível 1 (n =12)			Nível 2 (n =12)			Nível 3 (n =12)		
	C _t	C _p	DPR (%)	C _t	C _p	DPR (%)	C _t	C _p	DPR (%)
DHA	0,1481	0,1318	5,2	0,1793	0,1588	3,4	0,2371	0,2688	3,4

Sendo: n: número de extrações realizada para cada nível; C_t: a concentração teórica em relação a área do DHA; C_p: concentração predita em relação a área do DHA; DPR: desvio padrão relativo.

Fonte: Autora própria (2020).

5.3 APLICAÇÃO DO MÉTODO MINIATURIZADO E AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO (DHA) NA ALIMENTAÇÃO DO PACU (*Piaractus mesopotamicus*)

A incorporação de DHA com a adição da microalga *Schizochytrium* sp. (DHA gold™®, DSM Nutritional Products, São Paulo, Brasil) foi realizada sob 4 diferentes níveis de concentração e um (1) controle. Foram avaliados primeiramente, os teores de lipídios extraídos pelo método miniaturizado em triplicata para a determinação de DHA na ração, de acordo com a concentração estabelecida utilizada na alimentação dos peixes do experimento (Tabela 16).

Tabela 16 - Análise da ração utilizada na alimentação dos peixes

Nível de incorporação da microalga a ração	Média de lipídios obtida na extração (%)	Média de DHA em mg g ⁻¹
Controle - 0%	23,43 ± 0,60	0,06 ± 0,00
1%	23,99 ± 1,83	9,04 ± 2,16
2%	24,19 ± 0,75	20,60 ± 2,15
3%	25,48 ± 0,23	32,53 ± 6,72
4%	26,08 ± 0,70	45,65 ± 3,42

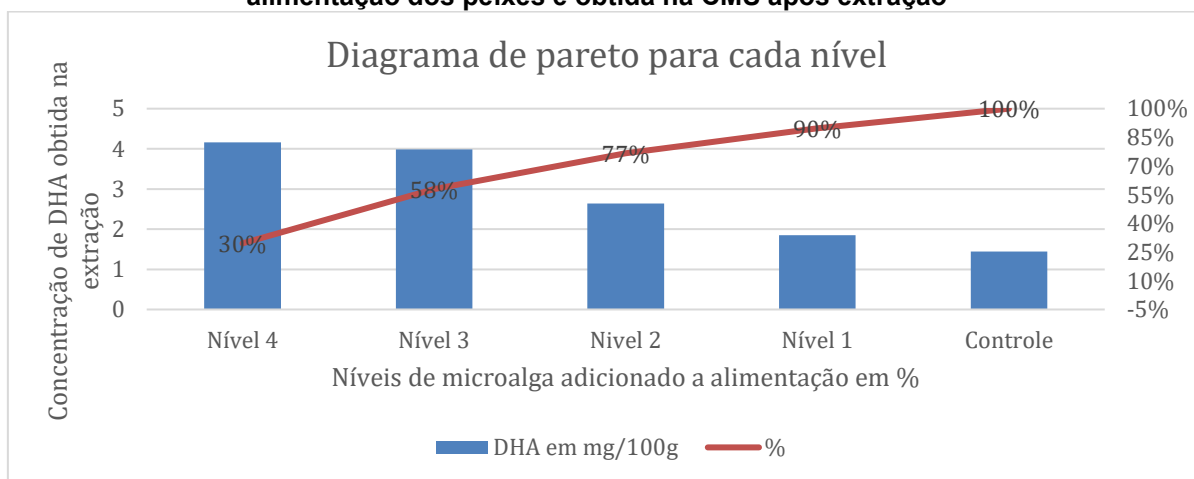
Fonte: Autora própria (2021).

Os valores de correlação dos níveis de incorporação da microalga a ração e os resultados obtidos após o cálculo de quantificação de DHA na ração foi de 0,985.

Na sequência, conforme os peixes eram alimentados, abatidos e produzida a CMS de cada nível de incorporação, as extrações da CMS seca a 105°C com peso constante foram extraídas pelo método miniaturizado, em triplicata, de acordo com o tempo de coleta estabelecido nos materiais e métodos. A Tabela 20 (Apêndice D) com os dados com a matriz do planejamento com as variáveis resposta e os resultados das concentrações de DHA das 25 análises (Apêndice E).

O diagrama de pareto para os níveis de incorporação do DHA (Figura 7), e o outro para o tempo de alimentação dos peixes (Figura 8), foram criados para determinar qual a situação ótima que utiliza a menos quantidade de aditivo a ração que alimentou os peixes e um menor tempo de alimentação com uma maior quantidade de DHA incorporada a CMS do peixe.

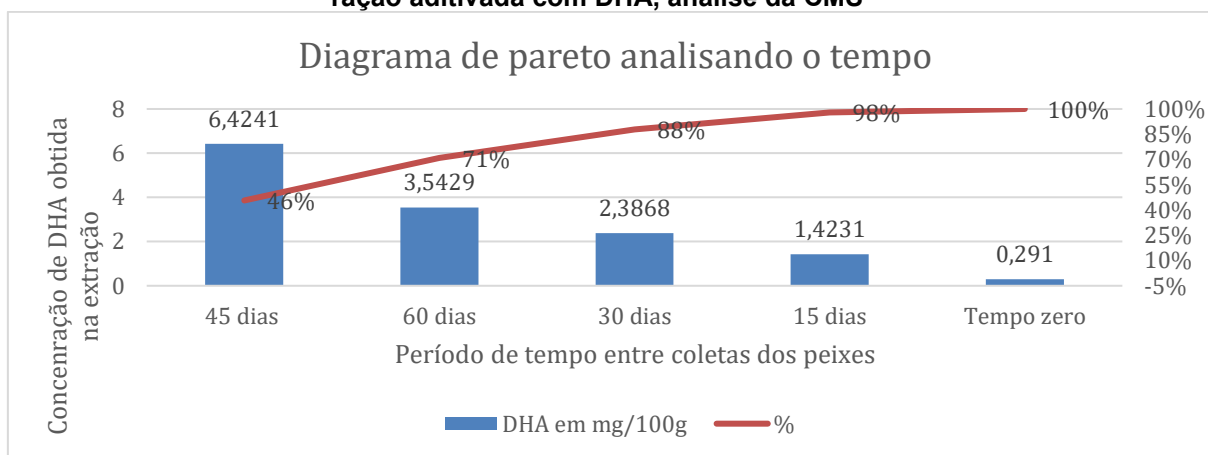
Figura 7 - Diagrama de pareto para cada nível de incorporação de DHA utilizada na alimentação dos peixes e obtida na CMS após extração



Fonte: Autora própria (2021).

Na Figura 7, foi observado que as maiores incorporações de DHA ocorreram com o a adição de 4% e 3% da microalga a ração que alimentou os peixes, esse nível explica 58% da incorporação do DHA no CMS ocorreu nos níveis 3 e 4.

Figura 8 - Diagrama de Pareto para determinar o tempo de alimentação dos peixes com a ração aditivada com DHA, análise da CMS



Fonte: Autora própria (2021).

Com relação ao tempo de tratamento, foi observado que no tempo de 45 dias de alimentação do peixe, houve 46% da incorporação do DHA a CMS do peixe. Foi avaliado que nos níveis de 3% e 4% em um tempo de 45 dias foram as situações ótimas do estudo. Isso também pode ser confirmado pelo teste de Tukey.

O teste de Tukey foi realizado para comparação de médias em mg/100g de DHA na CMS do peixe obtidas de cada incorporação da microalga a ração pelo período de tempo do experimento, foram analisados com nível de significância igual a 5% (Tabela 17) para saber qual o melhor nível de inclusão entre todas as condições estabelecidas.

Tabela 17 - Teste de Tukey para determinar o valor de DHA na CMS de *Piaractus mesopotamicus* alimentados com a incorporação de DHA a ração em diferentes tempos

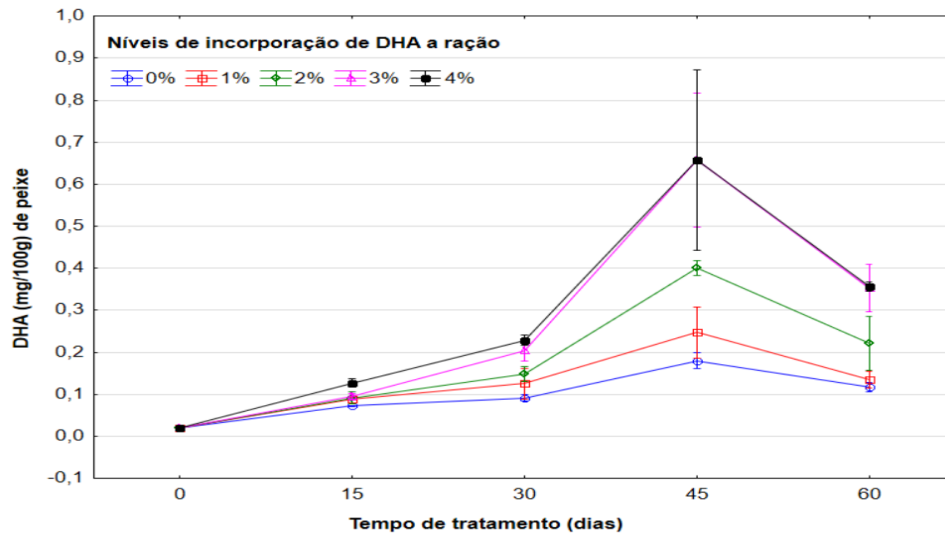
Tempo de tratamento (dias)	Incorporação de DHA				
	0%	1%	2%	3%	4%
0	0,0194±0,0023 ^a	0,0194±0,0023 ^a	0,0194±0,0023 ^a	0,0194±0,0023 ^a	0,0194±0,0023 ^a
15	0,0721±0,0005 ^{ab}	0,0892±0,0016 ^{abc}	0,0914±0,0056 ^{abc}	0,0945±0,0030 ^{bc}	0,1270±0,0039 ^{bcd}
30	0,0910±0,0030 ^{abc}	0,1252±0,0144 ^{bcd}	0,1474±0,0071 ^{cdef}	0,2034±0,0095 ^{efg}	0,2286±0,0052 ^g
45	0,1799±0,0078 ^{defg}	0,2469±0,0242 ^g	0,4004±0,0069 ^h	0,6576±0,0641ⁱ	0,6565±0,0865ⁱ
60	0,1173±0,0043 ^{bcd}	0,1348±0,0083 ^{bcd}	0,2206±0,0256 ^{fg}	0,3524±0,0227 ^h	0,3559±0,0042 ^h

*valores expressos pela média em mg/100g de DHA no peixe ± desvio padrão. As letras minúsculas iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey à 95% de nível de confiança (p-valor<0,05).

Fonte: Autora própria (2021).

Observou-se que durante a análise do teste de Tukey os melhores resultados ocorreram quando o tempo de 45 dias de alimentação com a ração em dois níveis de incorporação de DHA que foram entre 3% e 4% indicando uma maior média de resultados de DHA no CMS do peixe, sendo essas concentrações de DHA com valores de 0,6576 mg/100g de peixe e 0,6565 mg/100mg de peixe, respectivamente (Tabela 17), os resultados da incorporação em 3% e 4% não diferem estatisticamente. Os dados também foram analisados por meio gráfico (Figura 9) para facilitar a visualização dos tratamentos.

Figura 9 - Gráfico dos tratamentos com 4 níveis de tratamento com a incorporação de DHA pelo tempo



Fonte: Autora própria (2021).

As melhores condições observadas ocorreram nos níveis de 3% e 4% de incorporação de DHA por meio da adição da microalga *Schizochytrium* sp. na ração durante o cultivo de 45 dias, demonstrando que não é necessário manter por mais 15 dias o tratamento com a ração para obter resultados com elevada concentração de DHA no tronco limpo do peixe (CMS), isso é um dado positivo pois, no ponto de vista econômico, cerca de 70% do custo durante o tratamento para a produção de peixes para consumo humano é relacionado a alimentação (CYRINO et al., 2010).

O Pacu *Piaractus mepotamicus* é uma espécie que não se tem muita informação sobre sua regulação endócrina relacionada a alimentação (VOLKOFF et al., 2017), porém existem estudos onde é descrito que a taxa de ingestão de alimentos pode variar de acordo com os picos de produção de enzimas digestivas, digestibilidade e a síntese de proteínas para a formação de tecidos musculares (CRESCÊNCIO et al., 2005; CYRINO et al., 2010, PINTO et al., 2020). Outros estudos discutem sobre o metabolismo do *Piaractus mepotamicus* quando esse ingere uma grande quantidade de alimento, sua capacidade glicogênica e lipogênica aumentam, aumentando consequentemente a deposição de lipídios nos seus musculo, mas esse fator não indica uma maior reserva energética para o crescimento da espécie (FAVELO et al., 2017). Fatores que poderiam interferir nos resultados estão relacionados ao tempo dos tratamentos, ligados direta ou indiretamente aos fatores climáticos como o aumento de luz durante o dia, elevação da temperatura da água, mudanças na qualidade e volume de água relacionadas as chuvas e principalmente a alteração metabólica dos peixes devido ao esforço de

migração podem afetar a fisiologia da reprodução dos peixes (CYRINO et al., 2010; PINTO et al., 2020), que no caso deste estudo, a maioria dos fatores climáticos se mostraram dentro do aceitável pela espécie. Quando relacionamos a temperaturas elevadas para a espécie, apesar dela se adaptar facilmente, a atividade enzimática aumenta e induz para a diminuição na proporção de ácidos graxos insaturados. Uma maior quantidade depositada de lipídios não significa que houve uma maior disponibilidade de energia para o crescimento (FAVELO et al., 2017), isso foi observado principalmente nos tempos de 45 dias e 60 dias, pois foi observado que com 45 dias as amostras dos peixes tinham mais DHA adsorvido ao troco limpo na forma de CMS que no tempo de 60 dias. Na tabela 18, podemos observar que tanto na média de peso dos peixes inteiros como no tronco limpo, os valores de massa aumentaram com o tempo em para todos os tratamentos.

Tabela 18 - Peso médio dos tratamentos nos dias 45 e 60 com a alimentação controle e com a incorporação de DHA a ração

DHA	Dias	Média peixe inteiro (gramas)	Média tronco limpo (gramas)	Dias	Média peixe inteiro (gramas)	Média tronco limpo (gramas)
0		1287,5 ± 187,7	704,6 ± 101,8		1402,2 ± 209,5	799,0 ± 108,8
1		1027,5 ± 78,7	634,7 ± 73,4		1323,8 ± 225,6	696,5 ± 134,2
2	45	1208,8 ± 59,3	702,4 ± 75,7	60	1470,9 ± 110,1	770,1 ± 52,4
3		1239,3 ± 192,0	616,9 ± 107,8		1258,0 ± 62,4	691,4 ± 68,4
4		1105,2 ± 129,2	619,3 ± 60,5		1329,3 ± 64,4	720,1 ± 19,5

Fonte: Autora própria (2021).

Uma hipótese levantada durante o estudo foi a possibilidade de a espécie ter armazenado mais lipídios no fígado após os 45 dias, como também foi avaliado nos estudos de Pinto e colaboradores (2020), ao invés do músculo. Como na proposta do trabalho foi o estudo somente na CMS, o fígado não foi avaliado, sendo uma proposta muito interessante para uma próxima pesquisa a ser realizada para confirmar se esses lipídios estavam sendo armazenados no fígado após esse período de 45 dias. Outra hipótese levantada durante as avaliações foi a possibilidade do *Piaractus mesopotamicus* começar a utilizar as energias reservadas contendo os lipídios para a reprodução, devido à idade do peixe e a época do ano em questão (dezembro). Quando a temperatura da água atinge uma situação superior a ideal para o peixe, sendo essa situação quando há um aumento na temperatura da água, os níveis de consumo dos alimentos podem diminuir e os nutrientes de reserva podem ser usados para manutenção metabólica, diminuindo a reserva energética na forma de proteína e lipídios.

6 CONCLUSÕES

A aplicação do método miniaturizado para a extração e determinação de DHA em amostras de pacu *Piaractus mesopotamicus* apresentou dados quantitativos eficientes, com um nível de recuperação dentro do aceitável de acordo com o guia de orientação sobre validação de métodos analíticos do INMETRO (2020), sendo um excelente método alternativo para a redução dos reagentes de extração e o tempo de análise em comparação com o método de referência Bligh e Dyer (1959) para a extração de lipídios.

A metodologia miniaturizada para a extração de lipídios com testes na CMS seca a 105°C por 24 h do pacu *Piaractus mesopotamicus* foi a mais eficiente a nível de quantidade de lipídio extraída e quantificação de DHA, comparando com os outros testes da matriz da CMS de acordo com guia de orientações sobre validação dos métodos analíticos do INMETRO (2020). O solvente mais adequado para a determinação dos lipídios foi a mistura de clorofórmio: metanol (1:2) para quantificação média de DHA por mg 100g⁻¹ de peixe.

Utilizando o planejamento experimental Doehlert, foi possível realizar a otimização da metodologia de extração miniaturizada, quanto a massa de amostra e tempo de homogeneização uma vez que as respostas quantitativas foram estatisticamente aceitáveis, pois nesse tipo de planejamento é possível obter respostas mais rápidas e com uma quantidade menor de experimentos. Com os dados obtidos também foi possível verificar por meio da ANOVA que a regressão foi significativa e a falta de ajuste foi não significativa para o modelo linear. Esse modelo foi considerado adequado visto que a porcentagem de variação explicada foi acima de 98%, sendo que valores acima de 95% são considerados ótimos.

Aplicando o método miniaturizado as amostras reais de pacu *Piaractus mesopotamicus* em 4 níveis de incorporação de DHA por meio da alimentação com ração preparada, foi verificado um aumento crescente relacionado ao uso da ração com a incorporação da microalga *Schizochytrium* sp. (DHA goldTM) em todos os níveis de concentrações de DHA até 45 dias e nos níveis de 3% e 4%, teor e tempo com melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, N. M. de; BUENO FRANCO, M. R. **Influência da dieta alimentar na composição de ácidos graxos em pescado: aspectos nutricionais e benefícios à saúde humana.** Ver. Inst. Adolfo Lutz, v. 65, n. 1, p. 7-14, 2006.
- ARAUJO, G. S.; MATOS, L. J. B. L.; FERNANDES, J. O.; CARTAXO, S. J. M.; GONÇALVES, L. R. B.; FERNANDES, F. A. N.; FARIAS, W. R. L. **Extraction of lipids from microalgae by ultrasound application: Prospection of the optimal extraction method.** Ultrasonics Sonochemistry, v. 20, n. 1, p. 95–98, 2013.
- ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal of Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.
- ARAUJO, P.; JANAGAP, S. **Doehlert uniform shell designs and chromatography.** Journal of Chromatography B, v. 910, p. 14-21, 2012.
- ARCHANAA, S.; MOISE, S.; SURAIISKUMAR, G. K. **Chlorophyll interference in microalgal lipid quantification through the Bligh and Dyer method.** Biomass and Bioenergy, v. 46, p. 805-808, 2012.
- BACCHETTA, C.; ALE, A.; ROSSI, A. S.; KARAKACHOFF, M.; CAZENAVE, J. **Effects of cold stress on juvenile *Piaractus mesopotamicus* and the mitigation by β -carotene.** Journal of Thermal Biology, v. 88, 102497, 2020.
- BALDISSERA, M. D.; SOUZA, C. F.; ZEPPENFELD, C. C.; VELHO, M. C.; KLEIN, B.; ABBAD, L. B.; OURIQUE, A. F.; WAGNER, R.; DA SILVA, A. S.; BALDISSEROTTO, B. **Dietary supplementation with nerolidol nanospheres improves growth, antioxidant status and fillet fatty acid profiles in Nile tilapia: Benefits of nanotechnology for fish health and meat quality.** Aquaculture, v. 516, 734635, 2020.
- 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.
- BONAFÉ, E. G.; FIGUEIREDO, L. C. de; MARTINS, A. F.; MONTEIRO, J. P.; JUNIOR, O. O.; CANESIN, E. A.; MARUYAMA, S. A.; VISENTAINER, J. V. **Incorporation of conjugated fatty acids into Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).** Journal Science Food Agriculture, v. 97, p. 3469-3475, 2017.
- BORGES, A.; CONTE-JUNIOR, C. A.; FRANCO, R. M.; FREITAS, M. Q. **Quality Index Method (QIM) developed for pacu *Piaractus mesopotamicus* and determination of its shelf life.** Food Research International, v. 54, p. 311-317, 2013.
- CASTRO, F. A. F.; SANT'ANA, H. M. P.; CAMPOS, F. M.; COSTA, N. M. B.; SILVA, M. T. C.; SALARO, A. L.; FRANCESCHINI, S. do C. C. **Fatty acid composition of**

three freshwater fishes under different storage and cooking processes. Food Chemistry, v. 103, n. 4, p. 1080-1090, 2007.

CHEN, I. S.; SHEN, C. S. J.; SHEPPARD, A. J. **Comparison of methylene chloride and chloroform for the extraction of fats from food products.** J. Am. Oil Chem. Soc., v. 58, p. 599-601, 1981.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

CORTEGANO, C. A. A.; ALCÂNTARA, A. M. de; SILVA, A. F. da; EPIFÂNIO, C. M. F.; BENTES, S. P. C.; SANTOS, V. J. dos; VISENTAINER, J. V.; GONÇALVES, L. U. **Finishing plant diet supplemented with microalgae meal increases the docosahexaenoic acid content in *Collossoma macropomum* flesh.** Wiley Aquaculture Research, v. 50, p. 1291-1299, 2019.

CRESCÊNCIO, R.; ITUASSÚ, D. R.; ROUBACH, R.; FILHO, M. P.; CAVERO, B. A. S.; GANDRA, A. L. **Influência do período de alimentação no consumo e ganho de peso do pirarucu.** Pesq. Agropec. Bras., v. 40, p. 1217-1222, 2005.

CYRINO, J. E. P.; BICUDO, Á. J. de A.; SADO, R. Y.; BORGHESI, R.; DAIRIKI, J. K. **A piscicultura e o ambiente – o uso de alimentos ambientalmente corretos em piscicultura.** Revista Brasileira de Zootecnia, v. 39, p. 68-87, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. **Influência da Nutrição sobre a Qualidade do Pescado: Especial Referência aos Ácidos Graxos.** 1. ed. Corumbá, 2013. p. 09.

FAVELO, G. C.; GIMBO, R. Y.; MONTOYA, L. N. F.; ZANUZZO, F. S.; URBINATI, E. C. **Fasting and refeeding lead to more efficient growth in lean pacu (*Piaractus mesopotamicus*).** Wiley Aquaculture Research, v. 49, p. 359-366, 2017.

FERREIRA, S. L. C.; dos SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; NETO, B. B.; BOSQUE-SENDRA, J. M. **Doehlert matrix: a chemometric tool for analytical chemistry—review.** Talanta v. 63, p. 1061-1067, 2004.

FIGUEIREDO, A. R. P.; da COSTA, E.; SILVA, J.; ROSÁRIO DOMINGUES, M.; DOMINGUES, P. **The effects of different extraction methods of lipids from *Nannochloropsis oceanica* on the contents of omega-3 fatty acids.** Algal Research, v. 41, p. 101556, 2019.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture: Meeting the sustainable development goals 2018:** Desk Reference. Roma, Itália, 2018. p. 06-114. Disponível em: <http://www.fao.org/3/i9540en/i9540en.pdf>. Acesso em 02 fev. 2018.

FU, H.; SUN, Y.; TENG, H.; ZHANG, D.; XIU, Z. **Salting-out extraction of carboxylic acids.** Separation and Purification Technology, v. 139, p. 36-42, 2015.

GELMAN, A.; DRABKIN, V.; SACHS, O.; CHECHIC, K.; GABAY, I.; GLATMAN, L. **Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a new fish species in Israel aquiculture: Possibility of utilization.** Developments in Food Science, p. 73-83, 2004.

HABIBI, E.; GHANEMI, K.; FALLAH-MEHRJARDI, M.; DADOLAHI-SOHRAB, A. **A novel digestion method based on a choline chloride–oxalic acid deep eutectic solvent for determining Cu, Fe, and Zn in fish samples.** Analytica Chimica Acta, v. 762, p. 61-67, 2013.

HALIM, R.; DANQUAH, M. K.; WEBLEY, P. A. **Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: A review.** Biotechnology Advances, p. 709-732, 2012.

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

HARRIS, D. C. **Explorando a Química Analítica.** 4^a ed. Rio de Janeiro, RJ. 2011. p. 427-428.

INMETRO. **Orientações sobre Validação de Métodos de Analíticos.** DOQ-CGCRE-008, revisão 09, junho 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Instituto Adolfo Lutz, 2008, p. 117.

IVANOV, K.; BLUMBERGA, D. **Extraction of fish oil using green extraction methods: a short review.** Energy Procedia, v. 128, p. 477-483, 2017.

JAFARPOUR, A.; GOMES, R. M.; GREGERSEN, S.; SLOTH, J. J.; JACOBSEN, C.; SØRENSEN, A. M. **Characterization of cod (*Gadus morhua*) frame composition and its valorization by enzymatic hydrolysis.** Journal of Food Composition and Analysis, v. 89, p. 103469, 2020.

JESUS, S. S. de; FERREIRA, G. F.; MOREIRA, L. S.; MACIEL, M. R. W.; FILHO, R. M. **Comparison of several methods for effective lipid extraction from wet microalgae using solvents.** Renewable Energy, v. 143, p. 130-141, 2019.

JIANG, J.; ZHU, S.; ZHANG, Y.; SUN, X.; HU, X.; HUANG, H.; REN, L. **Integration of lipidomic and transcriptomic profiles reveals novel genes and regulatory mechanisms of *Schizochytrium* sp. in response to salt stress.** Bioresource Technology, v. 294, p. 122231, 2019.

LI, M.; BAO, Z.; XING, H.; YANG, Q.; YANG, Y.; REN, Q. **Simulated moving bed chromatography for the separation of ethyl esters of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid under nonlinear conditions.** Journal of Chromatography A, v. 1425, p. 189-197, 2015.

LÖFGREN, L.; FORSBERG, G.; STÅHLMAN, M. **The BUME method: a new rapid and simple chloroform-free method for total lipid extraction of animal tissue.** Scientific Reports, v. 6, n. 1, 2016.

ŁUCZYŃSKA, J.; PASZCZYK, B.; NOWOSAD, J.; ŁUCZYŃSKI, M. J. **Mercury, Fatty Acids Content and Lipid Quality Indexes in Muscles of Freshwater and Marine Fish on the Polish Market. Risk Assessment of Fish Consumption.** International Journal of Environmental Research and Public Health, v. 14, p. 1120, 2017.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V. V. de; RUIZ, M. R.; VISENTAINER, J. E. L.; MATSHUSHITA, M.; SOUZA, N. E. de; VISENTAINER, J. V. **Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos.** Ver. Nutr., Campinas, v. 19, n.6, p. 761-770, 2006.

MILINSK, M. C.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V.; de OLIVEIRA, C. C.; de SOUZA, N. E. **Comparative Analysis of Eight Esterification Methods in the Quantitative Determination of Vegetable Oil Fatty Acid Methyl Esters (FAME).** J. Braz. Chem. Soc., v. 19, n. 8, p. 1475-1483, 2008.

MITTERER-DALTOÉ, M. L.; CARRILLO, E.; QUEIROZ, M. I.; FISZMAN, S.; VARELA, P. **Structural equation modelling and word association as tools for a better understanding of low fish consumption.** Food Research International, v. 52, p. 56-63, 2013.

MIYASHITA, K.; UEMURA, M.; HOSOKAWA, M. **Effective prevention of oxidative deterioration of fish oil: focus on flavor deterioration.** Annu. Rev. Food Sci. Technol., v. 9, p. 209-26, 2018.

MURRAY, R. K.; BENDER, D. A.; BOTHAM, K. M.; KENNELLY, P. J.; RODWELL, V. W.; WEIL, P. A. **Bioquímica ilustrada de Harper.** 29. ed. Porto Alegre, RS, 2014, p. 140.

NEFF, M. R.; BHAVSAR, S. P.; BRAEKEVELT, E.; ARTS, M. T. **Effects of different cooking methods on fatty acid profiles in four freshwater fishes from the Laurentian Great Lakes region.** Food Chemistry, v. 164, p. 544–550, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger.** 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2014, p. 357-359.

NETO, A. M. P.; SOUZA, R. A. S.; LEON-NINO, A. D.; DA COSTA, J. D. A.; TIBURCIO, R. S.; NUNES, T. A.; MELLO, T. C, S.; KANEMOTO, F. T.; SALDANHA-CORRÊA, F. M. P.; GIANESELLA, S. M. F. **Improvement in microalgae lipid extraction using a sonication-assisted method.** Renewable Energy, v. 55, p. 525–531, 2013.

NEWKIRK, D. R.; SHEPPARD, A. J.; HUBBARD, W. D. **Comparison of total fat, fatty acids, cholesterol, and other sterols in mayonnaise and imitation mayonnaise.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 55, n. 7, p. 548–549, 1978.

OTERO, P.; LÓPEZ-MARTINEZ, M. I.; GARCIA-RISCO, M. R. **Application of Pressurized Liquid Extraction (PLE) to obtain bioactive fatty acids and**

phenols from *Laminaria ochroleuca* collected in Galicia (NW Spain). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 164, p. 86-92, 2019.

OZOGUL, Y.; UCAR, Y.; TAKADAŞ, F.; DURMUS, M.; KÖŞKER, A. R.; POLAT, A. **Comparision of green and conventional extraction methods on lipid yield and fatty acid profiles of fish species.** European Journal of Lipid Science and Technology, v. 120, 2018.

PAREYT, B.; FINNIE, S. M.; PUTSEYS, J. A.; DELCOUR, J. A. **Lipids in bread making: Sources, interactions, and impact on bread quality.** Journal of Cereal Science, v. 54, p. 266-279, 2011.

PATILI, V.; KÄLLQVIST, T.; OLSEN, E.; VOGT, G.; GISLERØD, H. R. **Fatty acid composition of 12 microalgae for possible use in aquaculture feed.** Aquaculture Internationa, v.15, p. 1–9, 2007.

PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. **ANUÁRIO Peixe BR da Piscicultura.** 2019, p. 146.

PEIXE BR - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. **ANUÁRIO Peixe BR da Piscicultura.** 2020, p. 12-125.

PINTO, D.; PELLEGIN, L.; NITZ, L. F.; MONSERRAT, J. M.; GARCIA, L. **Influence of temperature on growth, feed consumption and chemical composition in the muscle of Pacu *Piaractus mesopotamicus*.** Aquaculture Research, v. 51, p. 3760-3767, 2020.

POOLE, C. F. **Ionization-based detectors for gas chromatography.** Journal of Chromatography A, v. 1421, p. 137-153, 2015.

RAMOS FILHO, M. M.; RAMOS, M. I. L.; HIANE, P. A.; SOUZA, E. M. T. de. **Perfil lipídico de quatro espécies de peixes de região pantaneira de Mato Grosso do Sul.** Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 28, n. 2, p. 361-365, 2008.

REN, L.; ZHUANG, X.; CHEN, S.; JI, X.; HUANG, H. **Introduction of ω -3 Desaturase Obviously Changed the Fatty Acid Profile and Sterol Content of *Schizochytrium* sp.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 63, p. 9770-9776, 2015.

RIBEIRO, F. A. de L.; FERREIRA, M. M. C. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados.** Quim. Nova, v. 31, n. 1, p. 164-171, 2008.

RYCKEBOSCH, E.; BERMPUDEZ, S. P. C.; TERMOTE-VERHALLE, R.; BRUNEEL, C.; MUYLAERT, K.; PARRA-SALDIVAR, R.; FOUBERT, I. **Influence of extraction solvent system on the extractability of lipid components from the biomass of *Nannochloropsis gaditana*.** Journal of Applied Phycology, v.26, p. 1501-1510, 2014.

SANTOS JUNIOR, O. O.; MONTANHER, P. F.; BONAFÉ, E. G.; do PRADO, I. N.; MARUYAMA, S. A.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V. **A Simple, Fast and Efficient Method for Transesterification of Fatty Acids in Foods Assisted by Ultrasound Energy.** Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 25, p. 1712-1719, 2014.

SINOSAKI, N. B. M.; dos SANTOS, P. D. da S.; GALUCH, M. B.; da SILVEIRA, R.; BONAFÉ, E. G.; VISENTAINER, J. V.; JÚNIOR, O. de O. S. **Analytical method of direct derivatization of fatty acids in seeds.** Springer, v. 73, p. 2399-2407, 2019.

SUBBAIAH, P. V.; DAMMANAHALLI, K. J.; YANG, P.; BI, J.; O'DONNELL, J. M. **Enhanced incorporation of dietary DHA into lymph phospholipids by altering its molecular carrier.** Biochimica et Biophysica Acta, v. 1861, p. 723-729, 2016.

SWANSON, D.; BLOCK, R.; MOIUSA, S. A. **Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life.** American Society for Nutrition. Adv. Nutr., v. 3, p. 1-7, 2012.

TANAMATI, A.; OLIVEIRA, C. C.; VISENTAINER, J. V.; MATSUSHITA, M.; de SOUZA, N. E. **Comparative study of total lipids in beef using chlorinated solvent and low-toxicity solvent methods.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 82, n. 6, p. 393-397, 2005.

TANAMATI, A.; STEVANATO, F. B.; VISENTAINER, J. E.; MATSUSHITA, M.; de SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. **Fatty acid composition in wild and cultivated pacu and pintado fish.** European Journal of Lipid Science, v. 111, p. 183-187, 2009.

TANG, S.; QIN, C.; WANG, H.; LI, S.; TIAN, S. **Study on supercritical extraction of lipids and enrichment of DHA from oil-rich microalgae,** The Journal of Supercritical Fluids, v. 57, n. 1, p. 44-49, 2011.

TAO, L.; ZHANG, Y.; WU, J.; WU, S.; LIU, Y.; ZENG, Y.; LUO, X.; MAI, B. **Biomagnification of PBDEs and alternative brominated flame retardants in a predatory fish: Using fatty acid signature as a primer.** Environment International, v. 127, p. 226-232, 2019.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M.C. **Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial.** Química Nova, v. 29, n. 2, p. 338-350, 2006.

TIBBETTS, S. M.; SCAIFE, M. A.; ARMENTA, R. E. **Apparent digestibility of proximate nutrients, energy and fatty acids in nutritionally-balanced diets with partial or complete replacement of dietary fish oil with microbial oil from a novel *Schizochytrium* sp. (T18) by juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.).** Aquaculture, v. 520, 2020.

VALLADÃO, G. M. R.; GALLANI, S. U.; PILARSKI, F. **South American fish for continental aquaculture.** Reviews in Aquaculture, v. 10, p. 351-369, 2018.

VOLKOFF, H.; SABIONI, R. E.; COUTINHO, L. L.; CYRINO, J. E. P.; **Appetite regulating factors in pacu (*Piaractus mesopotamicus*): Tissue distribution and effects of food quantity and quality on gene expression.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A, v. 203, p. 241-254, 2017.

WALL, R.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G.; F.; STANTON, C. **Fatty acids from fish: the anti-inflammatory potential of long-chain omega-3 fatty acids of long-chain omega-3 fatty acids.** Nutrition Reviews, v. 68, n. 5, p. 280–289, 2010.


**ANEXO A - Protocolos do Comitê de Ética no Uso de animais, conforme
certificação da CEUA/IFPR**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Acúmulo de EPA e DHA na carne de Pacu submetidos a dietas enriquecidas com farinha de microalga *Schizochytrium sp*", registrada com o nº 23411.010199/2019-66, sob a responsabilidade de Anderson Coldebella que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do Instituto Federal do Paraná, em reunião de 27/09/2019.

Finalidade	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/10/2019 a 01/10/2020
Espécie/linhagem/raça	Pacu / <i>Piaractus mesopotamicus</i>
Nº de animais	500
Peso/Idade	700g / 1 ano
Sexo	Indefinido
Origem	Laboratórios certificados em reprodução de peixes

Curitiba, 12 de outubro de 2019.



Arcangelo Augusto Signor
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IFPR
Portaria Nº 1296/2017

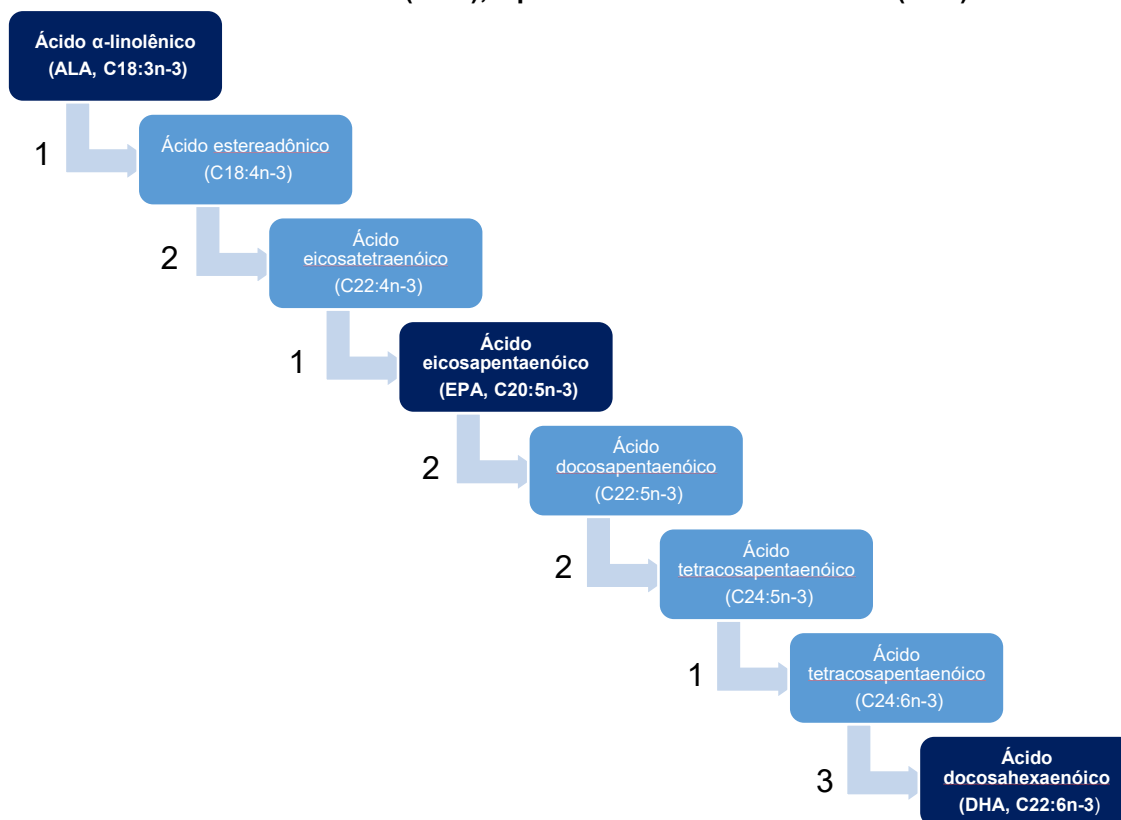
**APÊNDICE A – Planejamento Doehlert e etapas de síntese de EPA e
DHA**

Tabela 19 - Planejamento Doehlert de duas variáveis

Ensaio	Variável 1	Variável 2
1	1	0
2	0,5	0,866
3	-1	0
4	-0,5	-0,866
5	0,5	-0,866
6	-0,5	0,866
7	0	0
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0	0
13	0	0

Fonte: Autora própria (2020).

Figura 10 - Resumo das etapas de síntese de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), a partir do ácido alfa-linolênico (ALA)



Legenda: 1 - Δ^6 dessaturação; 2 – elongase; 3 - β -oxidação.

Fonte: Adaptado de Wall et al., 2010.

**APÊNDICE B – Preparo das amostras, fluxograma das etapas de extração,
Planejamento Doehert com os dados, procedimento de esterificação, valores
da curva analítica do DHA e distribuição dos tanque-rede**

Figura 11 - Procedimento na dessossadeira mecânica HT da empresa HighTech®

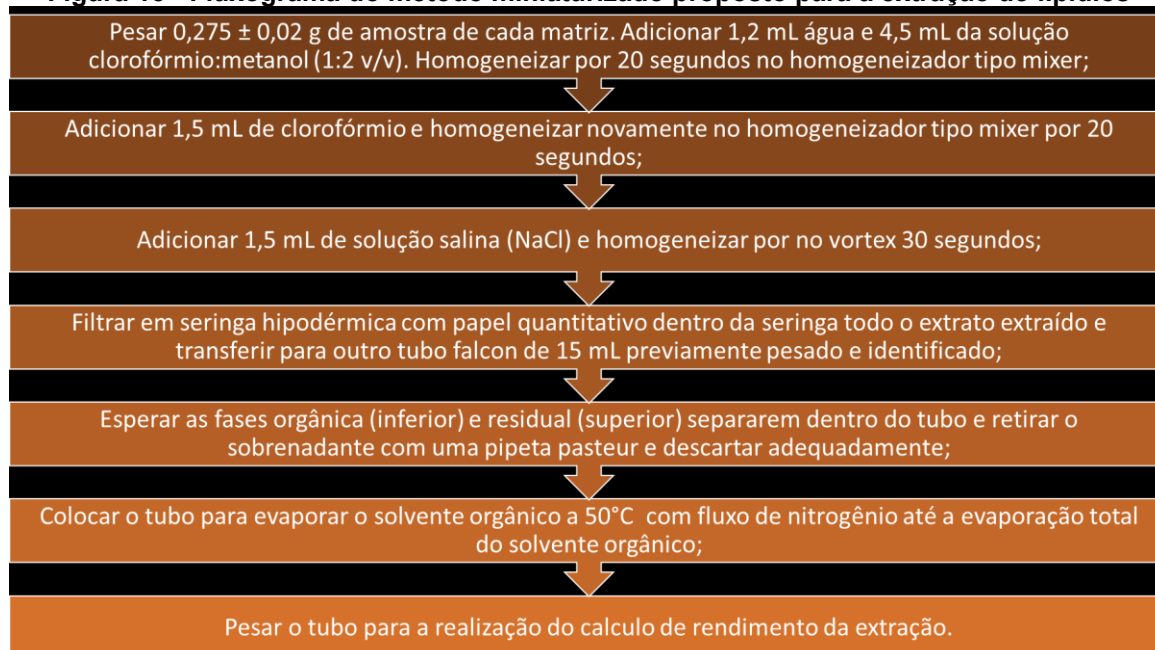


Figura 12 - Preparo da amostra de peixe. (a) Amostra in natura congelada; (b) amostra liofilizada; (c) amostra seca a 105°C com peso constante



Fonte: Autora própria (2020).



Figura 13 - Fluxograma do método miniaturizado proposto para a extração de lipídios



Fonte: Autora própria (2020).



Planejamento Doehlert do modelo quadrático de duas variáveis utilizando as planilhas criadas por Teófilo e Ferreira (2006).

Figura 14 - Planilha referente ao planejamento Doehlert do modelo linear para o analito DHA

Planejamento Doehlert - Modelo Linear

Duas Variáveis

Identificação: _____ Data: 09/05/2021

Variáveis	Níveis da variável 1				
	-1	-0,5	0	0,5	1
Var01	0,05	0,1625	0,275	0,3875	0,5
Níveis da variável 2					
Var02		-0,866	0	0,866	
		20	40	60	

Opções

Decodificado

Soma quadrática dos resíduos

Planejamento			Respostas	Estimadas	Coeficientes	Erro	t (9)	p
Ensaio	Var01	Var02	y	\hat{y}				
1	0,5000	40	2,0131	1,974046	SG b_0	1,739 ± 0,007617149	228,35	3,01E-18
2	0,3875	60	1,8099	1,841546	SG b_1	0,235 ± 0,01585636	14,802	1,27E-07
3	0,0500	40	1,5109	1,504646	b_2	0,003 ± 0,015856825	0,1748	0,865126
4	0,1625	20	1,6032	1,602046	b_{12}	-0,041 ± 0,031713651	1,278	0,233213
5	0,3875	20	1,8402	1,871846	Nível de significância α : 0,05 <input type="button" value="v"/>			
6	0,1625	60	1,6431	1,641946				
7	0,2750	40	1,7359	1,739346				
8	0,2750	40	1,7223	1,739346				
9	0,2750	40	1,7643	1,739346				
10	0,2750	40	1,7506	1,739346				
11	0,2750	40	1,7129	1,739346				
12	0,2750	40	1,7289	1,739346				
13	0,2750	40	1,7762	1,739346				

Análise de Variância - Modelo Linear					
FV	SQ	nGL	MQ	Fcalc.	p
Regressão	0,16651	3	0,0555	73,58407	SG
Resíduos	0,00679	9	0,00075		
F. Ajuste	0,00361	3	0,0012	2,264895	
Erro Puro	0,00318	6	0,00053		
Total	0,1733	12			

% variação explicada	96,08
% máx. de variação explicável	98,16

Fonte: Autora própria (2020).

Figura 15 - Fluxograma do procedimento de esterificação segundo Santos et al., 2014

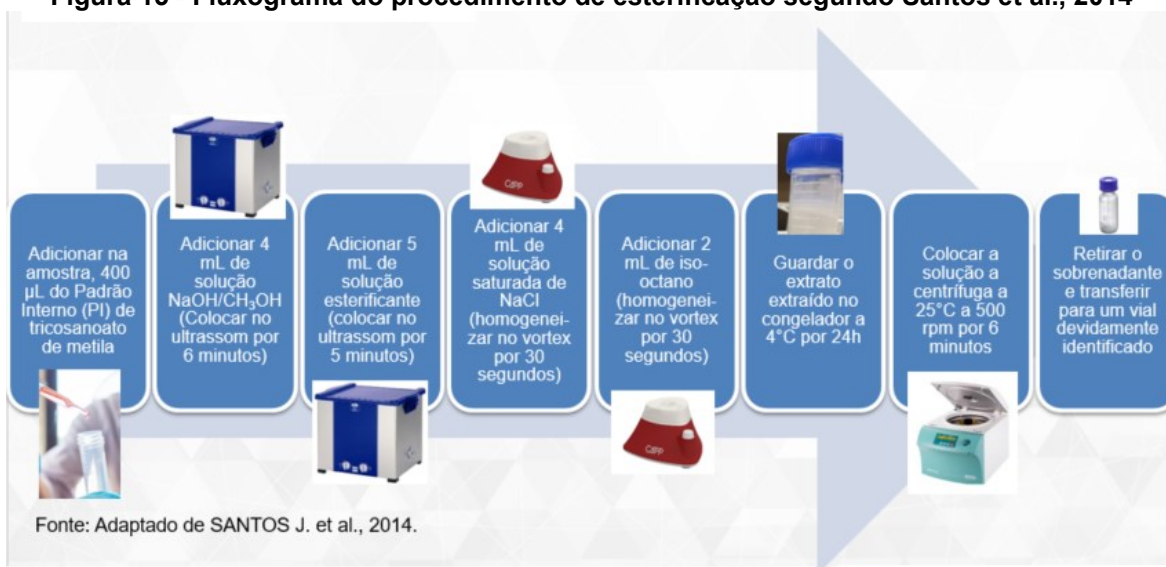


Tabela 20 - Valores da curva analítica para o DHA

Níveis da curva	Concentração do padrão de DHA (mg L ⁻¹)	Valores obtidos (mg g ⁻¹)
1	3,37	0,060
1	3,37	0,075
2	5,08	0,099
2	5,08	0,099
3	8,45	0,259
3	8,45	0,195
4	16,86	0,387
4	16,86	0,409
5	33,84	0,880
5	33,84	0,904
6	67,68	1,713
6	67,68	1,745

Fonte: Autora própria (2020).

Figura 16 - Distribuição dos peixes e tratamentos nos tanques-rede



Fonte: Autora própria (2020).

**APÊNDICE C – Procedimento de extração, gráfico de regressão e
distribuição de resíduos, cromatogramas e dados de confirmação dos dados
pela biblioteca NIST**

Figura 17 - Procedimento de extração da matriz liofilizada

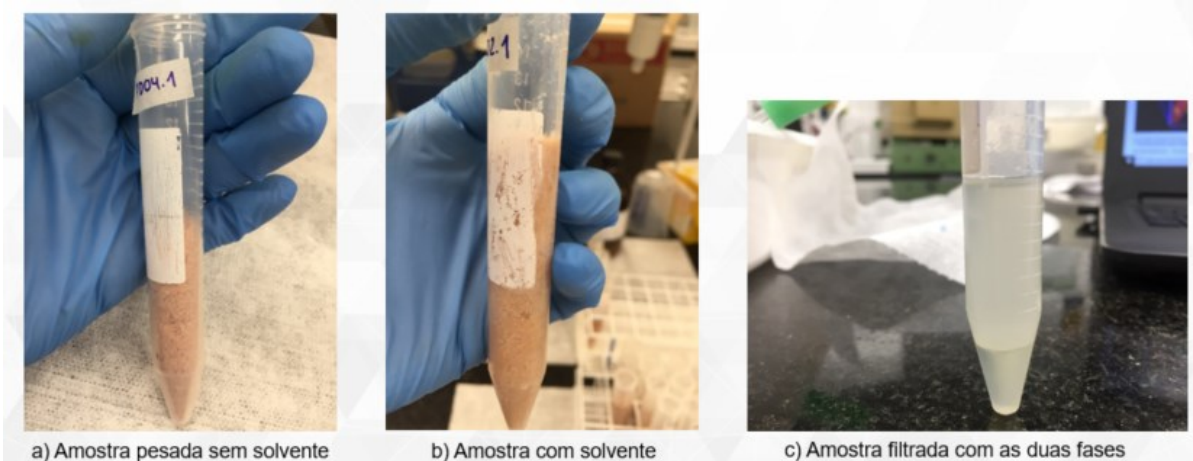


Figura 18 - Procedimento de extração da matriz seca a 105°C por 24 h

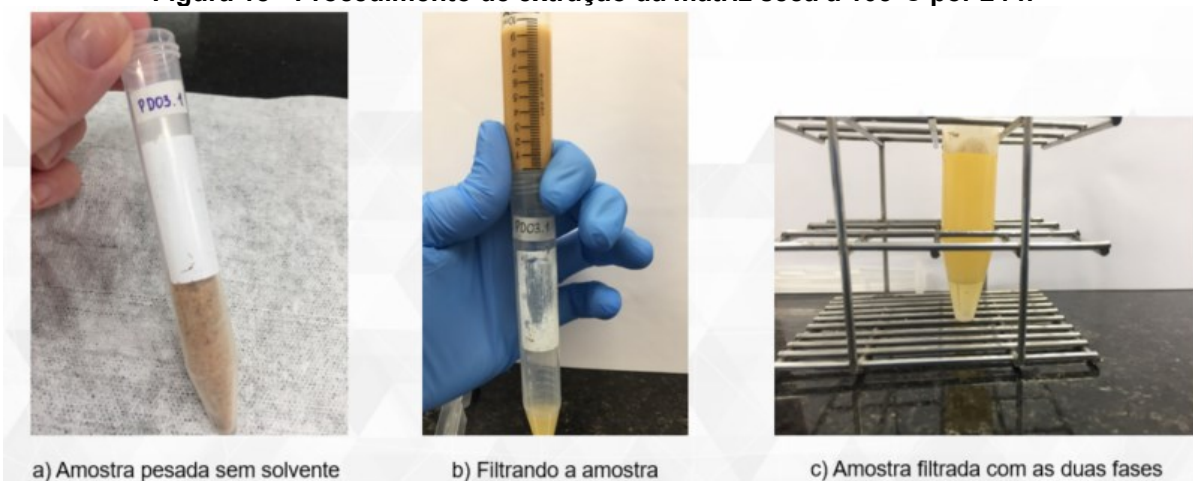
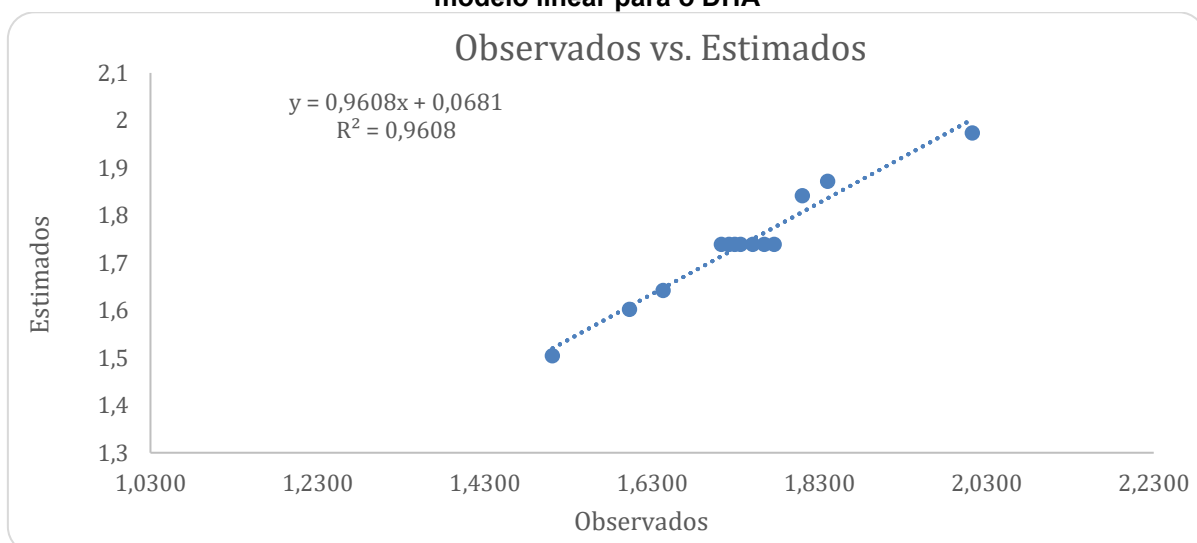
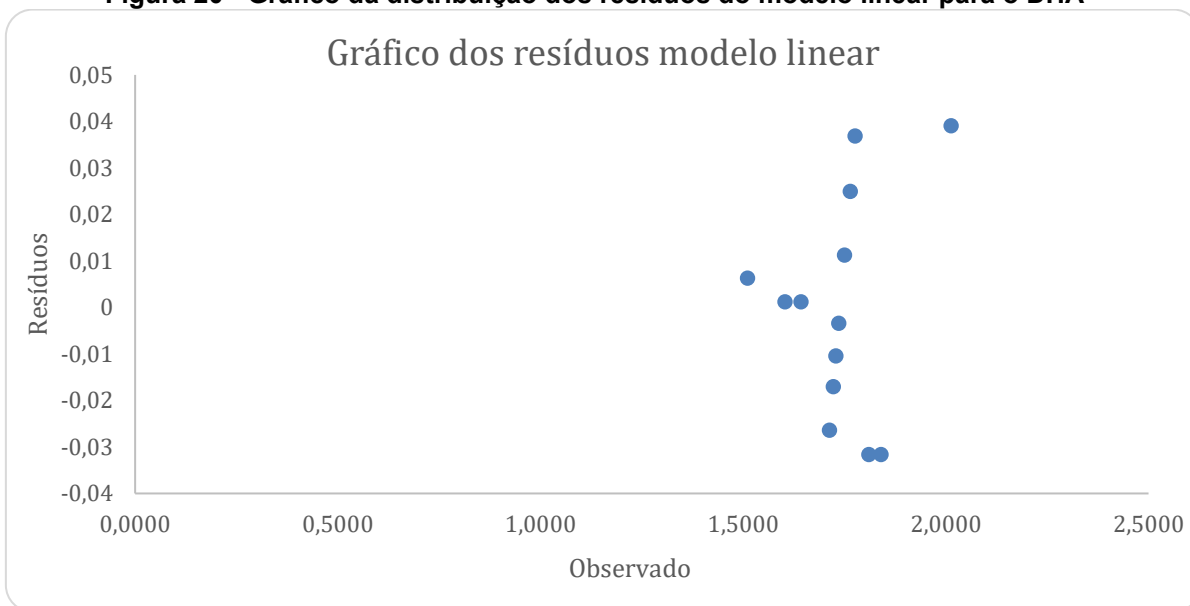


Figura 19 - Gráfico da regressão dos valores estimados pelos valores observados do modelo linear para o DHA



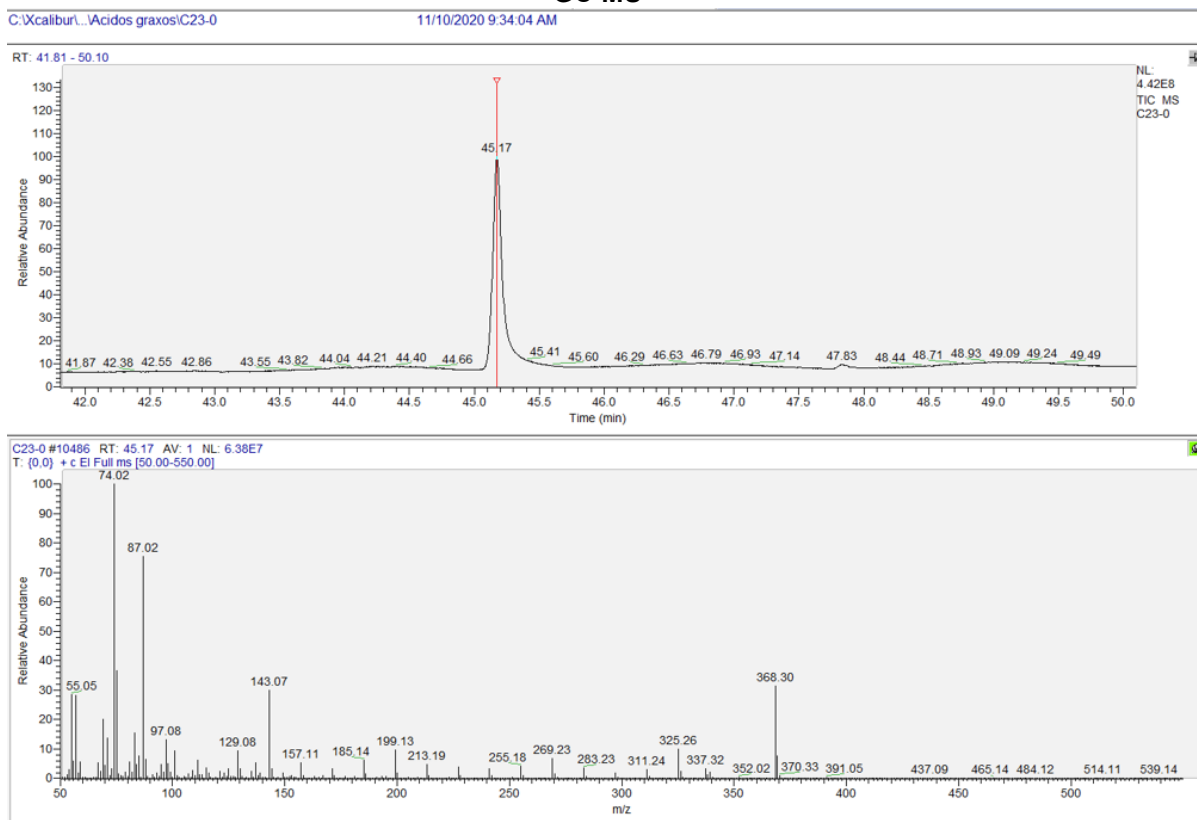
Fonte: Autora própria (2020).

Figura 20 - Gráfico da distribuição dos resíduos do modelo linear para o DHA



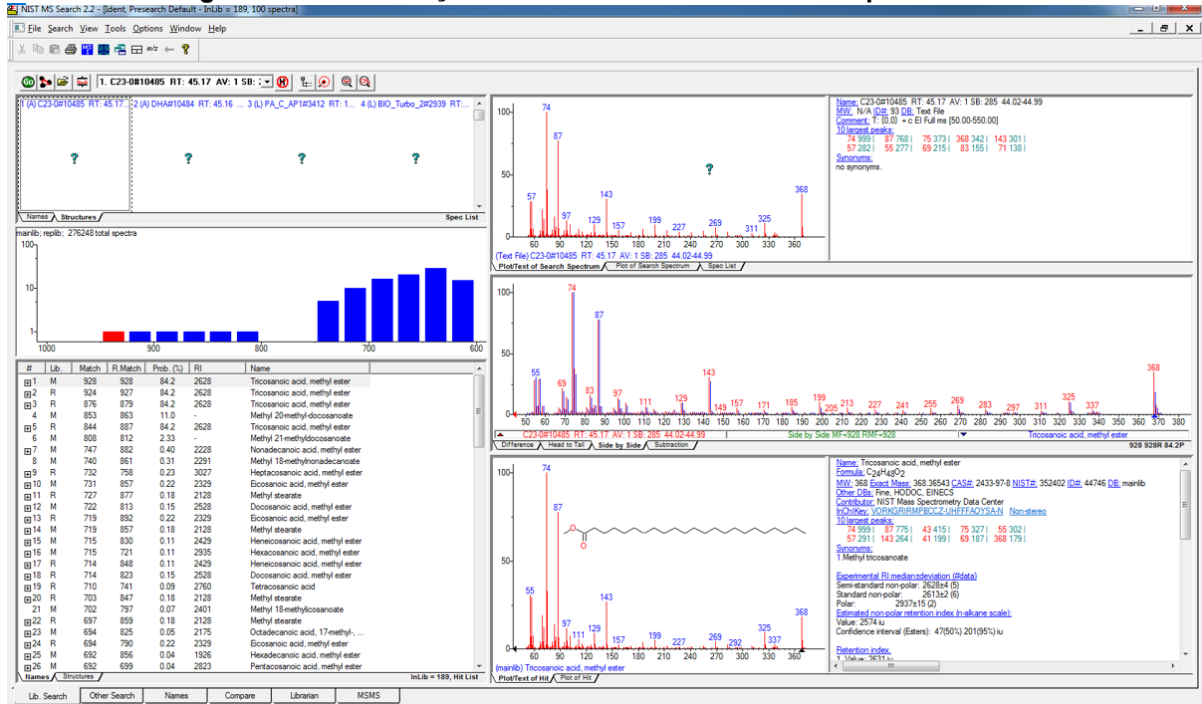
Fonte: Autora própria (2020).

Figura 21 - Cromatograma e espectro de massas do tricosanoato de metila (C23:0) obtido no GC-MS



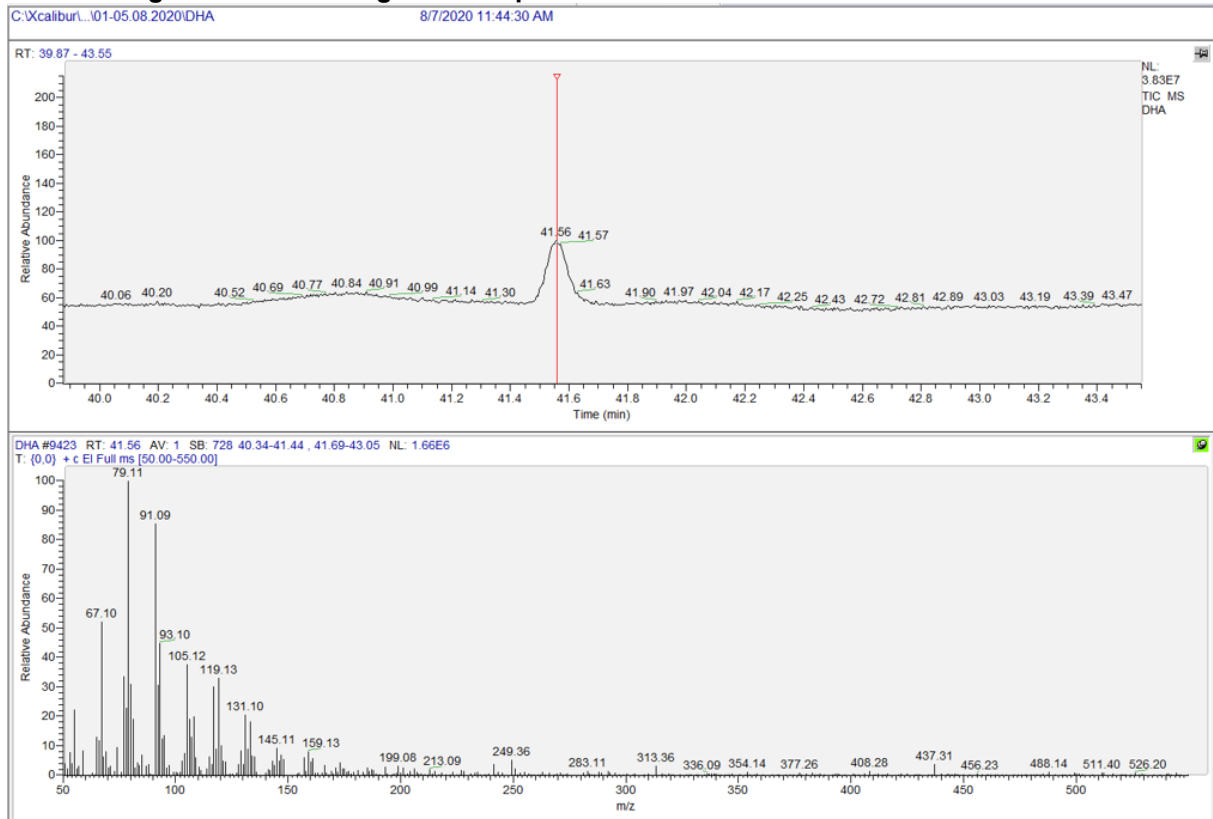
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 22 - Confirmação na biblioteca NIST 2.2 do composto C23:0



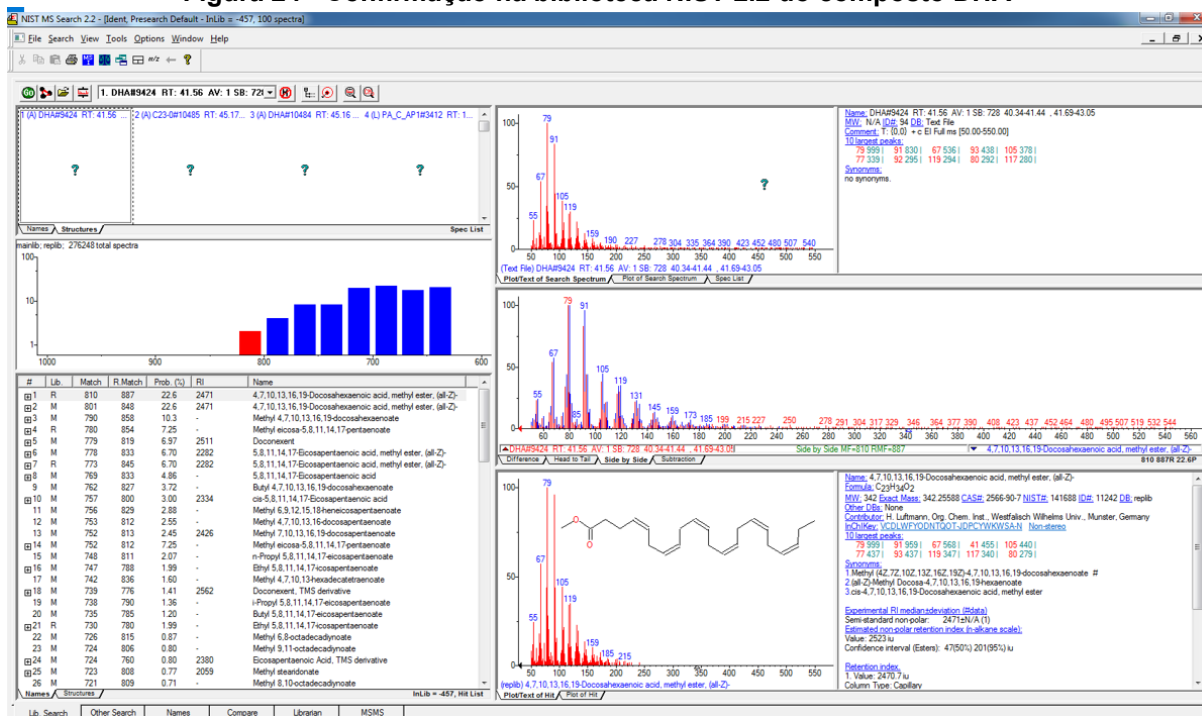
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 23 - Cromatograma e espectro de massas do DHA obtido no GC-MS



Fonte: Autora própria (2021).

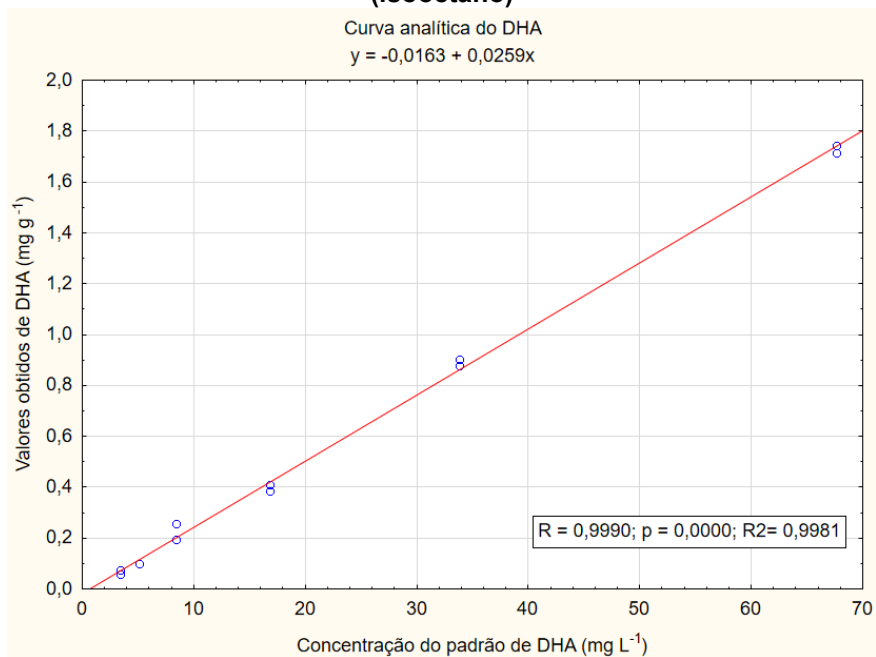
Figura 24 - Confirmação na biblioteca NIST 2.2 do composto DHA



Fonte: Autora própria (2021).

APÊNDICE D – Gráfico da curva analítica e análise de variância

Figura 25 - Gráfico da curva analítica de 3,37 mg L⁻¹ a 67,68 mg L⁻¹ para DHA em solvente (isooctano)



Fonte: Autora própria (2021).

Tabela 21 - Análise de variância ANOVA foi realizada com 5% de nível de significância (p-valor ≤ 0,05)

ANOVA					
	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	2,067	2,0663	3418,049	$5,13 \cdot 10^{-7}$
Resíduo	4	0,002	0,0006		
Total	5	2,069			

Fonte: Autora própria (2021).

APÊNDICE E – Dados do planejamento das 25 análises e cromatogramas as análises dos peixes

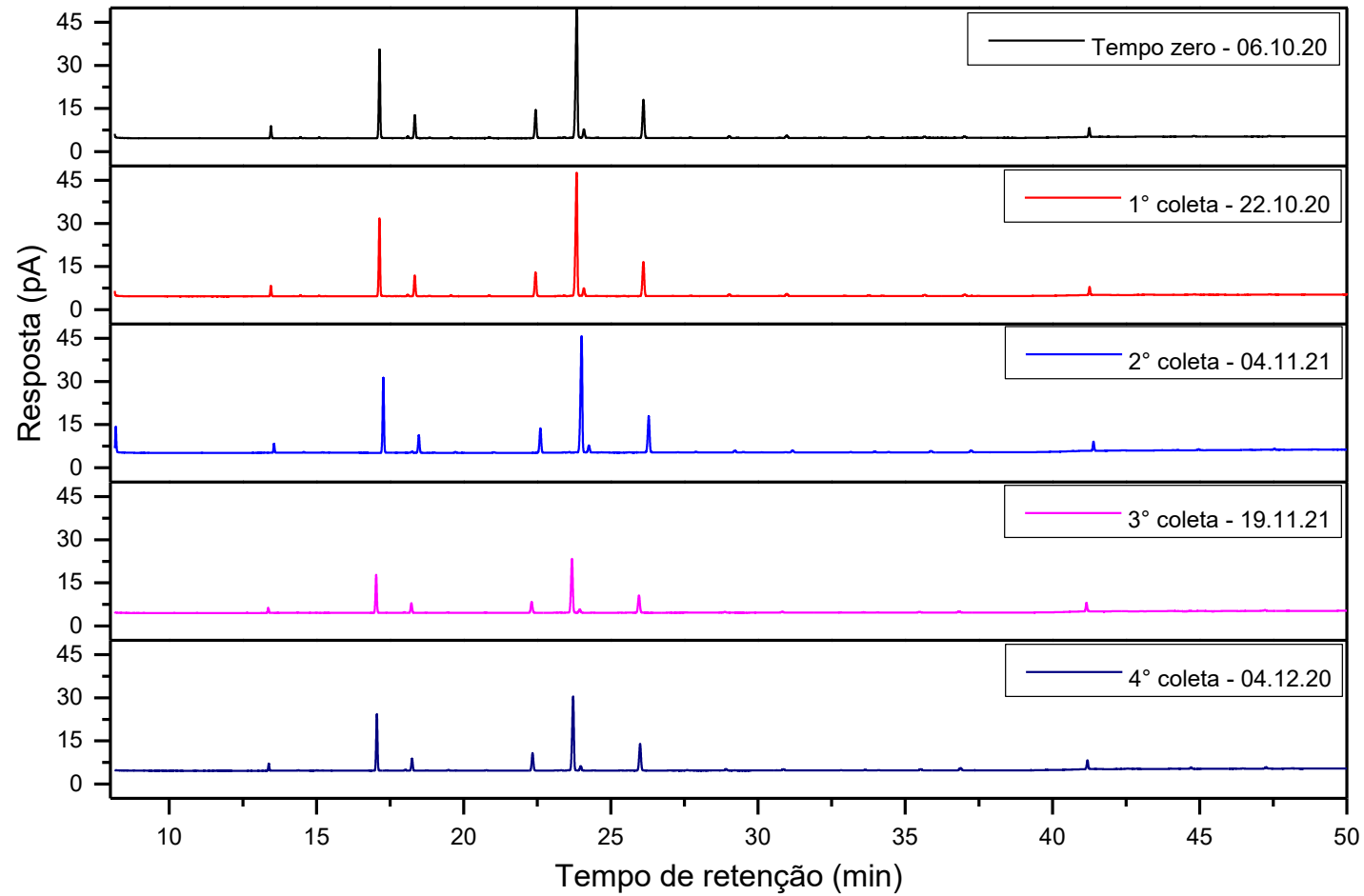
Tabela 22 - Dados do planejamento com as variáveis resposta das 25 análises

	Níveis de incorporação de DHA (%)	Tempo de tratamento (dias)	DHA (mg/100g) de peixe
Tempo zero	0	0	0,0194 ± 0,0023
	1	0	0,0194 ± 0,0023
	2	0	0,0194 ± 0,0023
	3	0	0,0194 ± 0,0023
	4	0	0,0194 ± 0,0023
Adição de 1% de microalga	0	15	0,0721 ± 0,0005
	1	15	0,0892 ± 0,0017
	2	15	0,0914 ± 0,0057
	3	15	0,0946 ± 0,0030
	4	15	0,1271 ± 0,0039
Adição de 2% de microalga	0	30	0,0910 ± 0,0030
	1	30	0,1252 ± 0,0044
	2	30	0,1474 ± 0,0071
	3	30	0,2034 ± 0,0094
	4	30	0,2286 ± 0,0052
Adição de 3% de microalga	0	45	0,1799 ± 0,0077
	1	45	0,2469 ± 0,0243
	2	45	0,4004 ± 0,0069
	3	45	0,6576 ± 0,0064
	4	45	0,6565 ± 0,0086
Adição de 4% de microalga	0	60	0,1173 ± 0,0043
	1	60	0,1349 ± 0,0083
	2	60	0,2206 ± 0,0025
	3	60	0,3524 ± 0,0027
	4	60	0,3559 ± 0,0042

Fonte: Autora própria (2021).

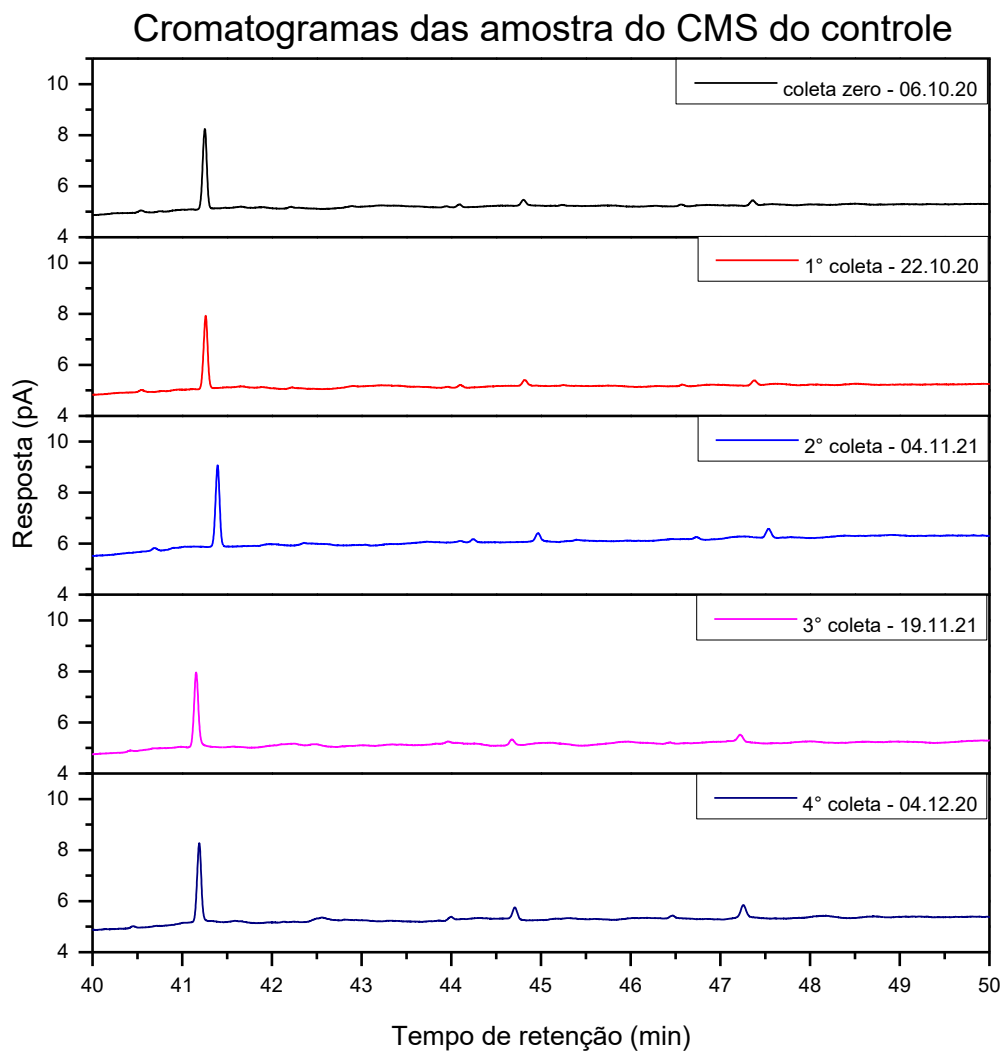
Figura 26 - Cromatogramas obtidos do tratamento controle do peixe

Cromatogramas das amostras do CMS de peixe controle



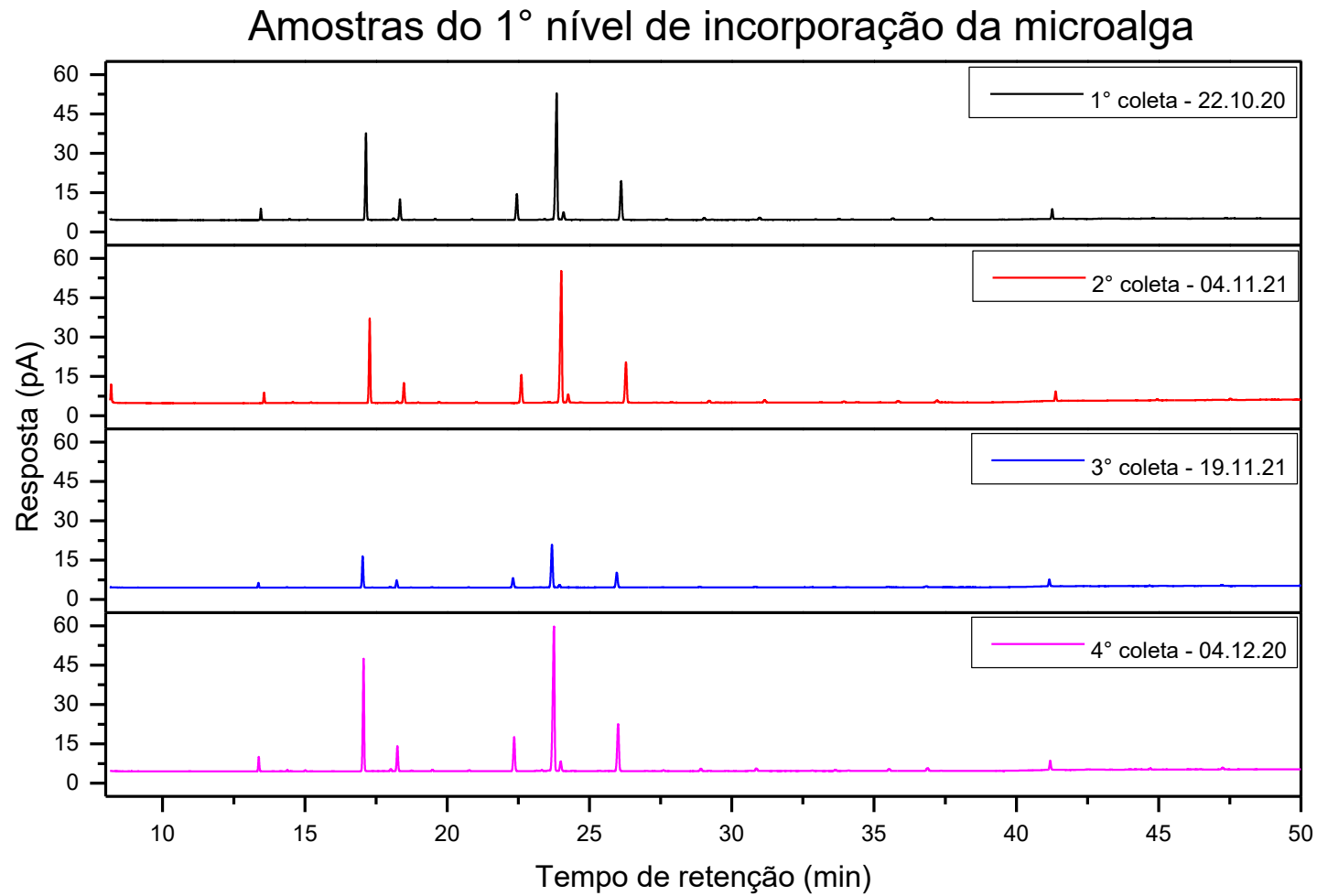
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 27 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do controle



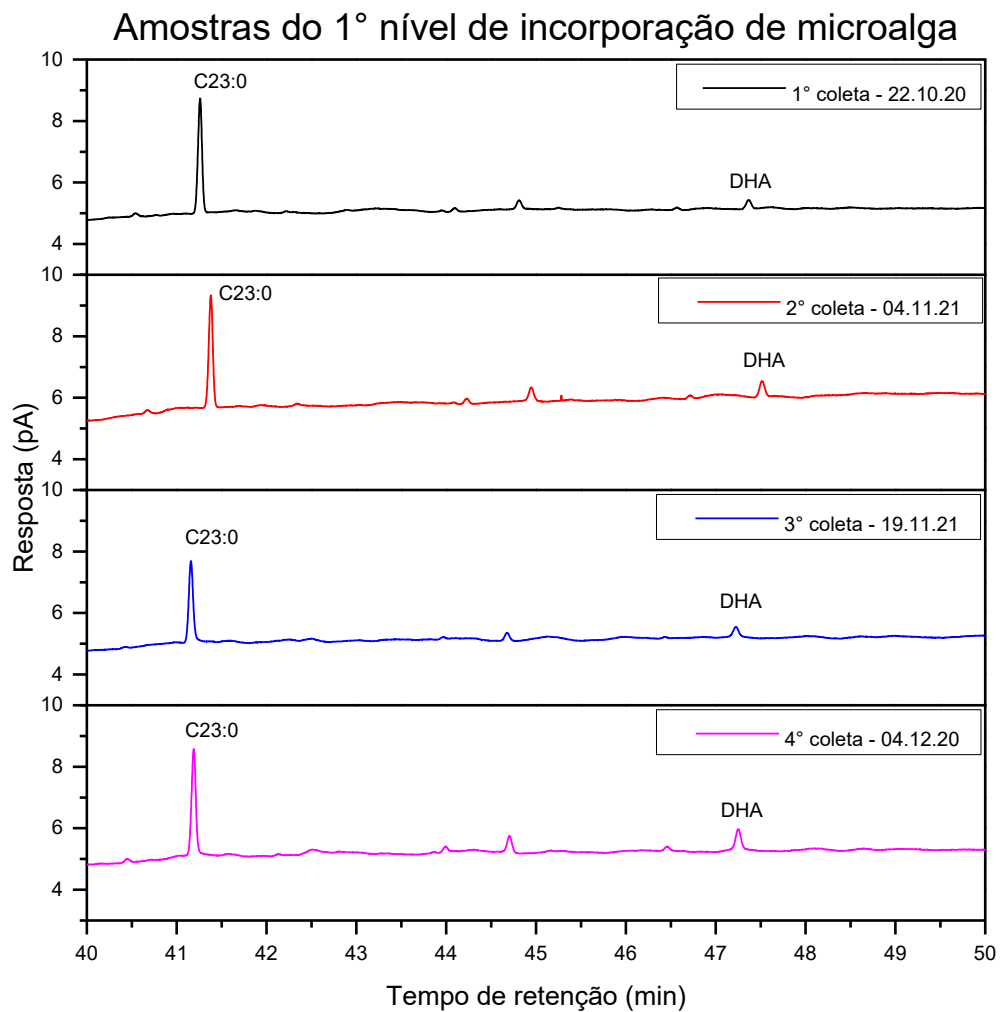
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 28 - Cromatogramas obtidos no nível de 1% de aditivo



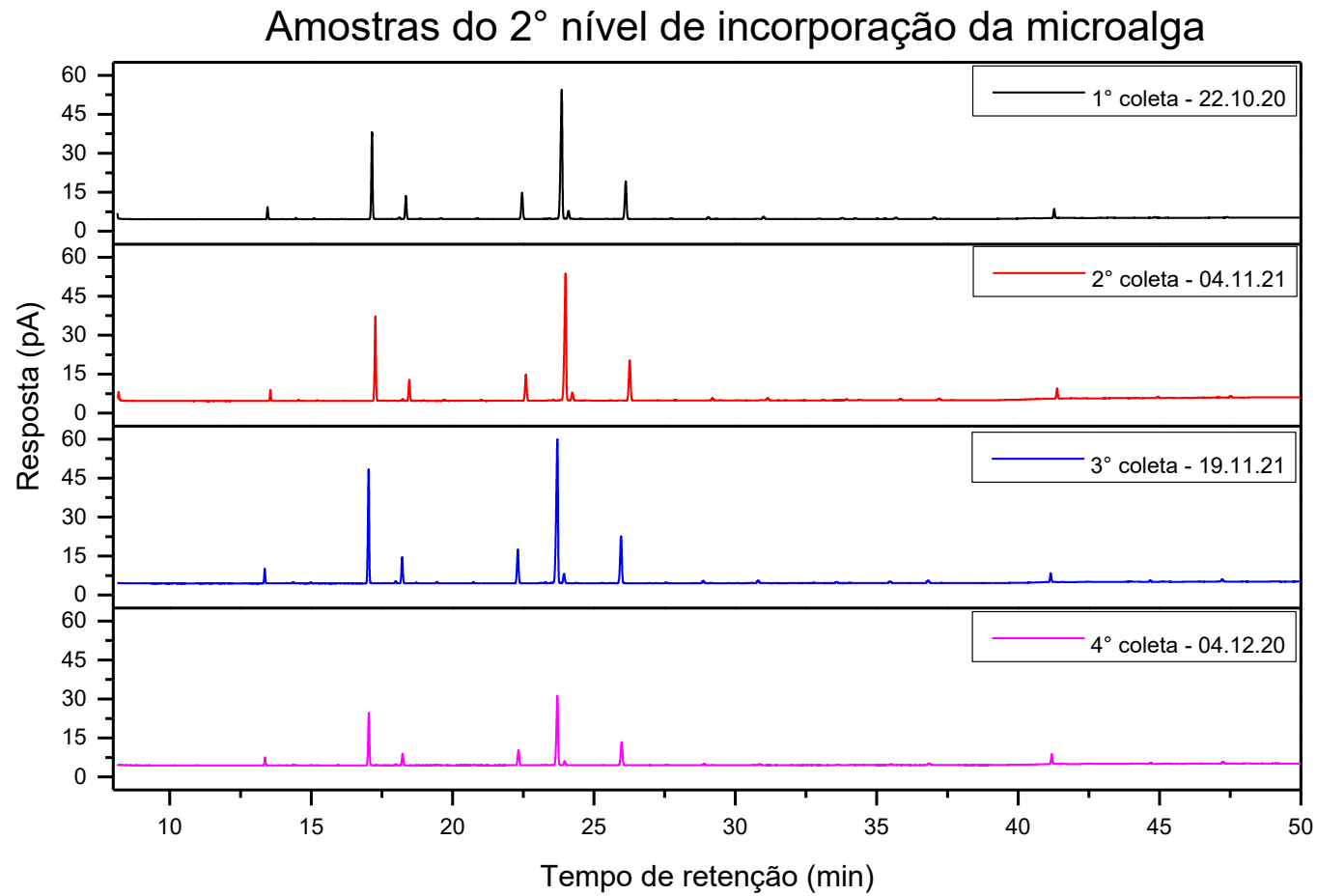
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 29 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 1% de aditivo



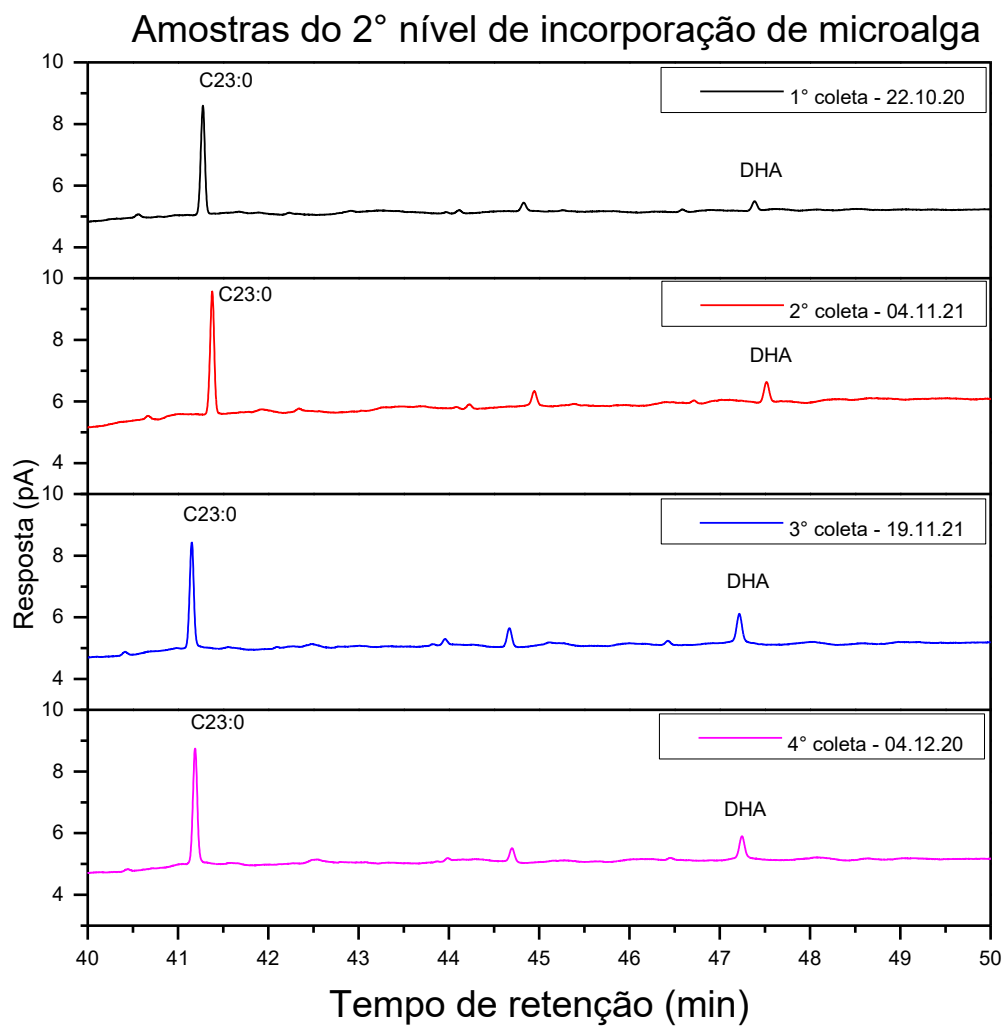
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 30 - Cromatogramas obtidos no nível de 2% de aditivo



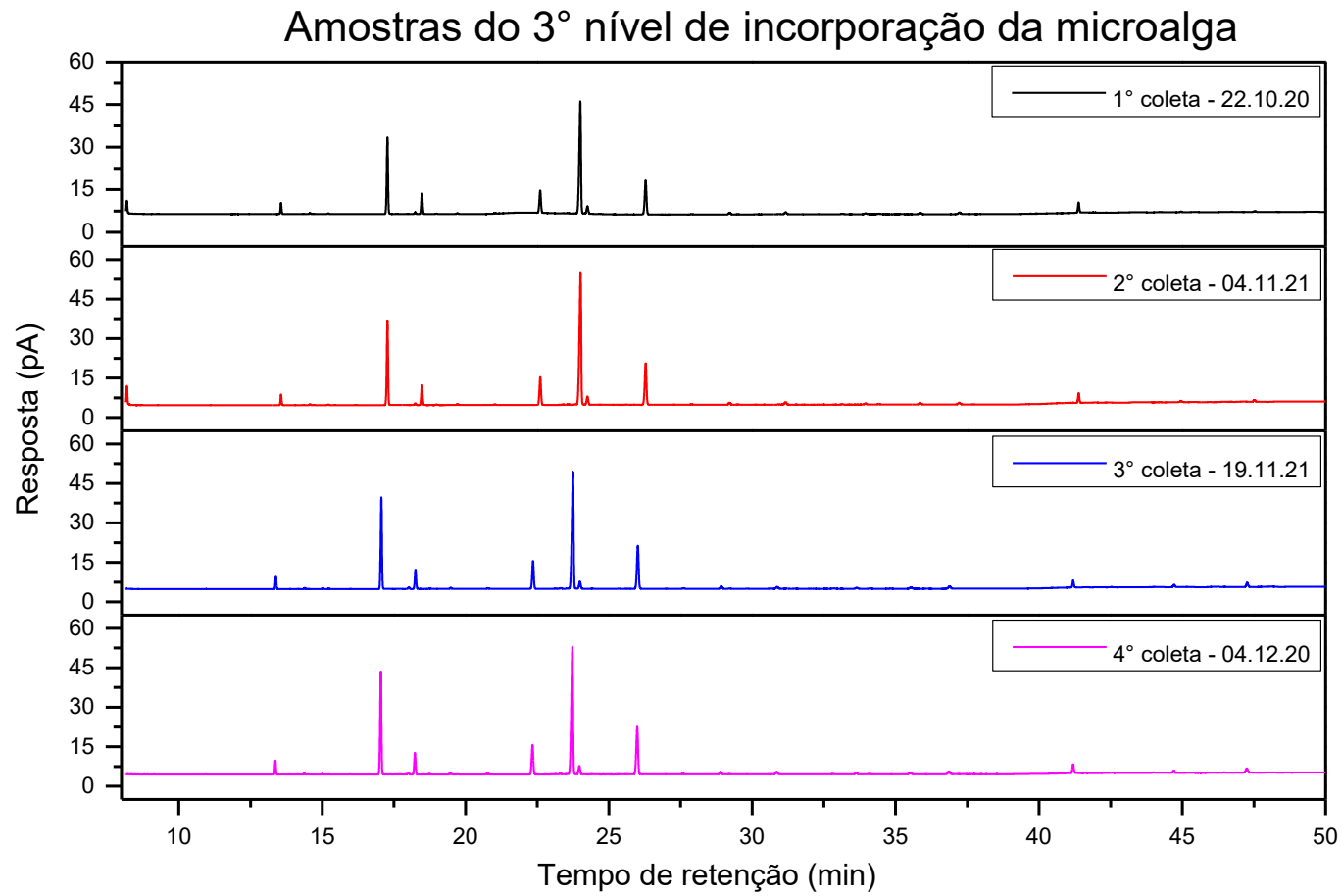
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 31 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 2% de aditivo



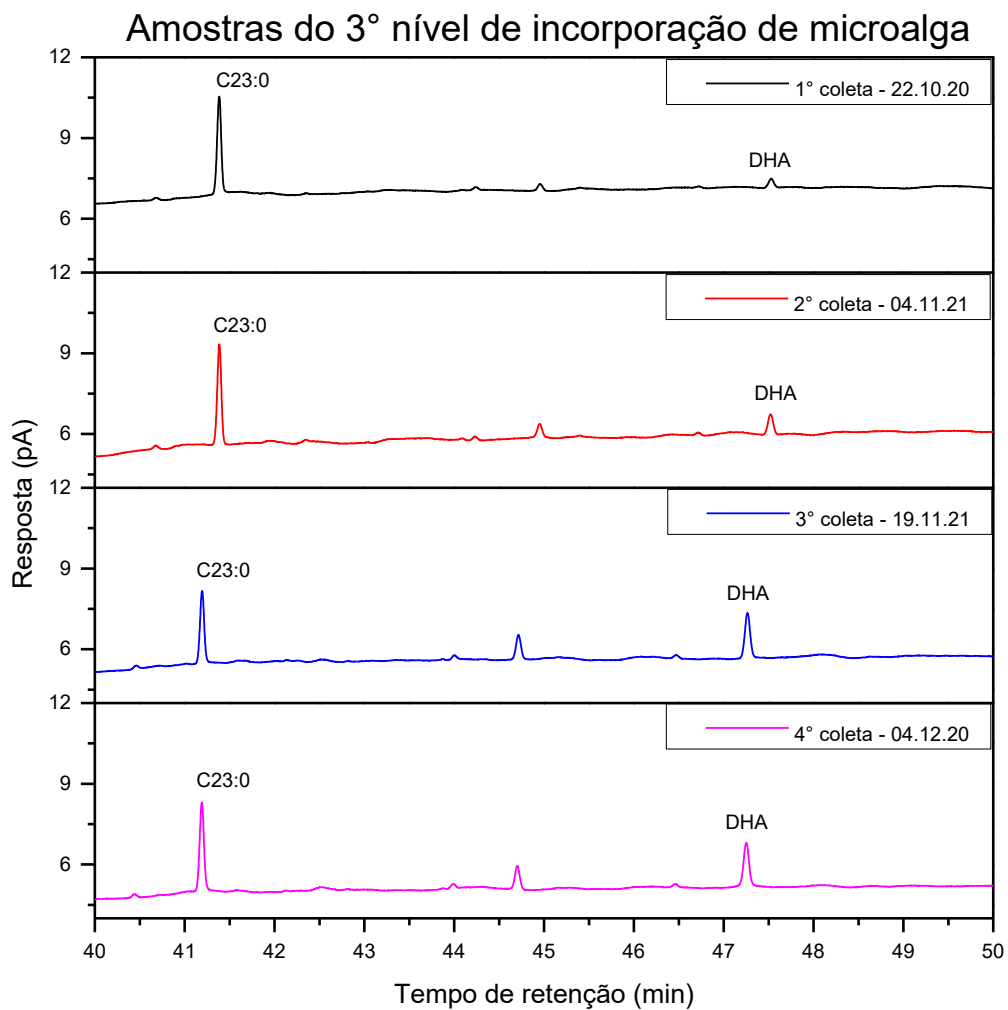
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 32 - Cromatogramas obtidos no nível de 3% de aditivo



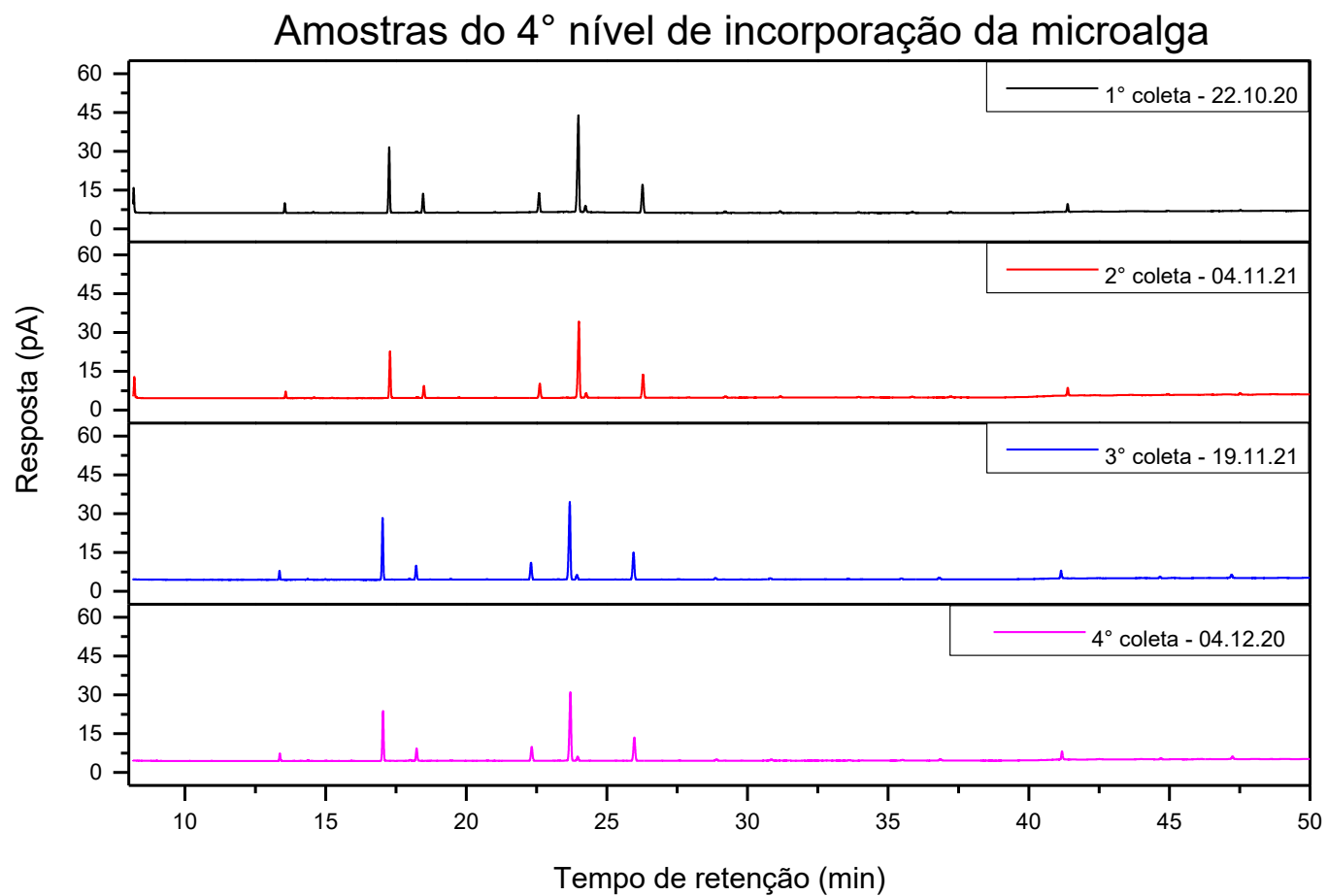
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 33 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 3% de aditivo



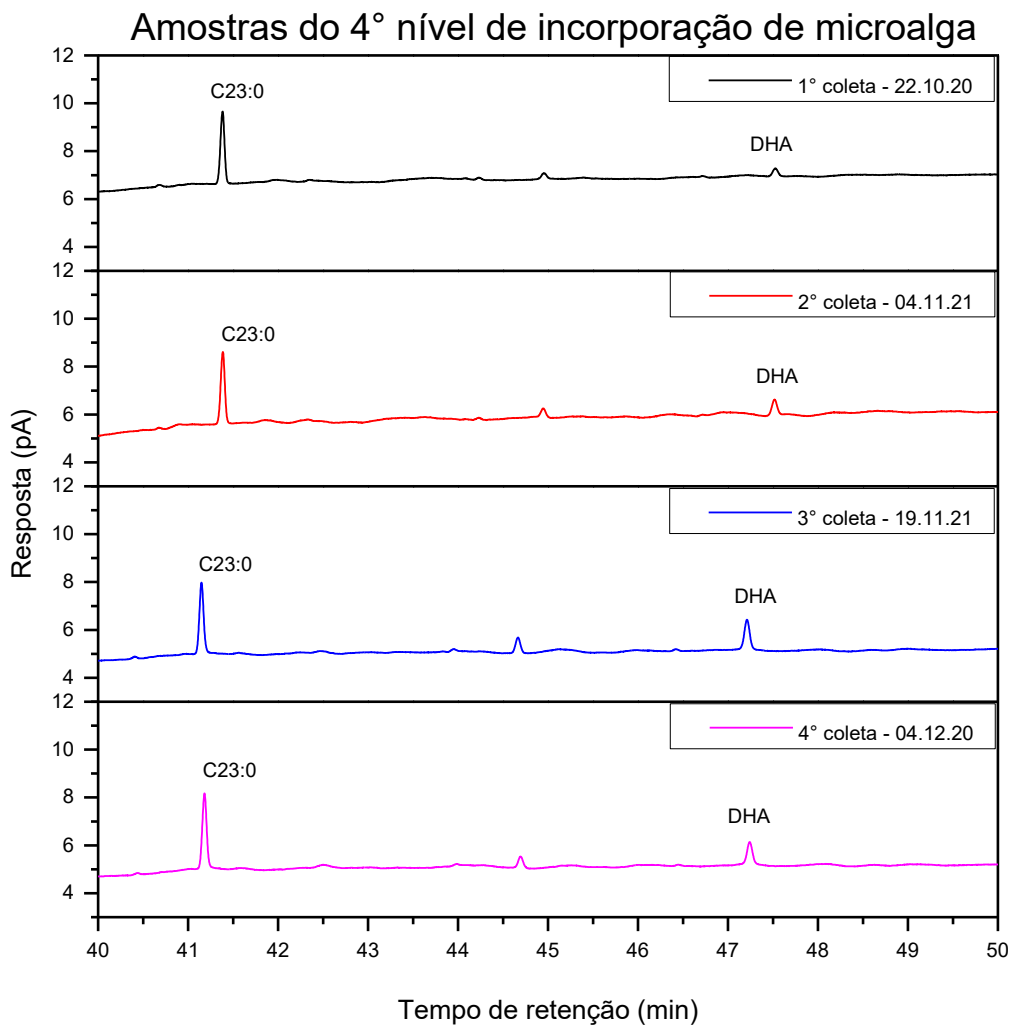
Fonte: Autora própria (2021).

Figura 34 - Cromatogramas obtidos no nível de 4% de aditivo



Fonte: Autora própria (2021).

Figura 35 - Cromatogramas os picos do padrão interno e DHA do nível de 4% de aditivo



Fonte: Autora própria (2021).