



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS (UFG)
INSTITUTO DE QUÍMICA (IQ)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA (PPGQ)

INGRYD CRISTINA DE OLIVEIRA

**Estudo da utilização do óleo de peixe visando à produção
de nutracêuticos e biodiesel**

GOIÂNIA
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese Outro*: _____

*No caso de mestrado/doutorado profissional, indique o formato do Trabalho de Conclusão de Curso, permitido no documento de área, correspondente ao programa de pós-graduação, orientado pela legislação vigente da CAPES.

Exemplos: Estudo de caso ou Revisão sistemática ou outros formatos.

2. Nome completo do autor

Ingyrd Cristina de Oliveira

3. Título do trabalho

"Estudo da utilização do óleo de peixe visando a produção de nutracêuticos e biodiesel"

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **INGRYD CRISTINA DE OLIVEIRA, Discente**, em 19/12/2022, às 18:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3395288** e o código CRC **63C0A797**.

INGRYD CRISTINA DE OLIVEIRA

**Estudo da utilização do óleo de peixe visando à produção
de nutracêuticos e biodiesel**

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química, da
Universidade Federal de Goiás (UFG),
como requisito para a obtenção do título
de Mestre em Química.

Orientador: Professor Doutor Nelson
Roberto Antoniosi filho

GOIÂNIA

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Oliveira, Ingrid Cristina de
Estudo da utilização do óleo de peixe visando à produção de nutracêuticos e biodiesel [manuscrito] / Ingrid Cristina de Oliveira. - 2022.
ccxxii, 222 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ), Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 2022.
Bibliografia.
Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, algoritmos, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Óleo de peixe *Clupea harengus*. 2. Ácidos graxos poli-insaturados ômega 3. 3. Biodiesel. 4. Hidrólise química. 5. Cristalização. I. Antoniosi Filho, Nelson Roberto, orient. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE QUÍMICA
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ-IQ)

Ata da defesa de Dissertação de Mestrado de Ingrid Cristina de Oliveira, aluna regularmente matriculada no Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Mestra em Química.

Aos dias 05 (cinco) de junho do ano de 2017 (dois mil e dezessete), com início às 14:00hs (catorze horas) no Instituto de Química da UFG, reuniu-se a Banca Examinadora designada pela Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Química da UFG, composta pelos seguintes doutores: Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho – orientador (UFG), Dra. Carolina Guimarães Souza (Ufscar) e Prof. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (UFG), sob a presidência do primeiro, para julgar a dissertação de INGRID CRISTINA DE OLIVEIRA intitulada: “Estudo da utilização do óleo de peixe visando a produção de nutracêuticos e biodiesel”. O presidente da Banca Examinadora abriu a sessão prestando esclarecimentos sobre os trâmites da avaliação e, em seguida, passou a palavra à candidata para que a mesma fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminada a exposição, a candidata foi arguida pelos membros da Banca Examinadora e, após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a banca, em sessão fechada, procedesse ao julgamento do trabalho. O resultado do julgamento foi o seguinte:

Prof. Dr. Nelson Roberto A. Filho: Aprovada
Dra. Carolina Guimarães de Sousa: Aprovada
Prof. Dra. Gabriela Rodrigues M. Duarte: Aprovada

A seguir, na presença do público e da candidata, o presidente da Banca Examinadora declarou que Ingrid Cristina de Oliveira, candidata ao título de Mestra em Química foi: Aprovada (X); Reprovada (). Este resultado deverá ser homologado pela Coordenadoria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química do IQ/UFG. Nada mais havendo a tratar, o Senhor Presidente cumprimentou a candidata e encerrou os trabalhos. E para constar, eu, Lídia dos Santos Ferreira de Freitas, lavrei a presente ata que segue assinada pelos membros da banca examinadora. Goiânia, 05 de junho de 2017.

Prof. Dr. Nelson Roberto Antoniosi Filho (IQ/UFG)

Dra. Carolina Guimarães de Souza (UFSCAR)

Prof. Dra. Gabriela Rodrigues Mendes Duarte (IQ/UFG)

DEDICATÓRIA

*Dedicado à minha família, pessoas
incríveis que me fizeram acontecer.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela saúde e inteligência que me foram dadas, e ainda pela conclusão deste trabalho mesmo com as provações e dificuldades enfrentadas.

Aos meus pais, Divino Alves de Oliveira e Maria Lúcia da Silva Dourado, pela coragem, determinação, e o espírito guerreiro que sempre me demonstraram.

À minha irmã, Dulcilene da Silva Dourado, por ser minha segunda mãe.

Ao meu cunhado, Célio Ribeiro Silva, por ter me incentivado aos estudos.

Ao meu amigo Walison Soares Custódio, por ser meu apoio em tempos difíceis de mestrado.

Aos meus cachorros, pelo carinho em tempos de crise.

Ao meu orientador, Nelson Roberto Antoniosi Filho, pela oportunidade.

À minha amiga durante o mestrado, Yudi Magaly Córdoba Garcés.

À Juliana Cristina Teixeira de Castro, por ser meu ponto de apoio durante a iniciação científica.

Aos colegas do Laboratório de Métodos e Extração (LAMES), Rubia Luchetti Camargo, Ana Júlia Siqueira, Eliéser Viégas Wendt, Aysha Jussara Carrim, Pedro Ivo Brandão e Melo Franco, Julião Pereira, Tatiana de Oliveira Zuppa Neto, Lucas Oliveira Gomes, Marcos Alexandre Abreu e Silva, Aline Terra Soares, Leonardo Alves Carvalho Rodrigues, Gustavo Garcia Noletto, Adrielle Pereira Lourenço, Kelly da Silva Bezerra, Lilian Ribeiro Batista, Emmanuel Bezerra D'Alessandro, Jair Gonzalez Marques, Engy Shokry; por seus auxílios através de opiniões, incentivos, ou ajudas na execução das análises presentes.

Aos colaboradores do LAMES, Marlene, Marcela, Domingos, Romilda, pela organização do laboratório e pelas conversas e saudações de cada dia.

À Prof^a. Maria Inês Gonçalves Leles, por permitir a utilização do laboratório de análises térmicas, e dicas sobre estas.

À Prof^a. Maria Isabel Ribeiro Alves, pelas dicas a respeito da escrita do trabalho, como membro da banca de qualificação.

À Prof^a. Carolina Guimarães de Souza Lima, pelas contribuições de melhoria desta dissertação.

À Prof^a. Gabriela Mendes Duarte, como membro da banca.

À CAPES, pela concessão da bolsa que tornou possível a dedicação ao trabalho.

À FINEP, CNPq, MCTIC e FUNAPE pela concessão e gestão dos recursos que financiaram essa pesquisa.

À Universidade Federal de Goiás (UFG) em nome de todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás (IQ/UFG), pela formação acadêmica.

“Como sabem, pode-se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.”

(Dumbledore)

"O progresso é como andar, consegue-se perdendo e ganhando equilíbrio.

É uma série de erros...

De erro em erro acaba-se descobrindo a verdade.

O falso é às vezes a verdade de cabeça para baixo"

(Sigmund Freud – Além da Alma).

RESUMO

A utilização de resíduos da indústria pesqueira desponta mundialmente como uma alternativa de matéria-prima sustentável e atrativa nos aspectos ambientais, econômicos, e sociais. O óleo de peixe contém ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω 3-PUFA), ingredientes na indústria farmacêutica, na produção de nutracêuticos. Por outro lado, ele também contém ácidos graxos saturados (SFA), utilizáveis na indústria de biodiesel. Diante desse contexto, o objetivo dessa dissertação foi o estudo do óleo de peixe visando seu fracionamento em ácidos graxos saturados e insaturados (UFA). Nesse sentido, a extração e avaliação do óleo de resíduos de *Clupea harengus* (OR) foram feitas através de técnicas físico-químicas, térmicas, e cromatográficas. Seguidas pela otimização da hidrólise química do óleo por meio de planejamento fatorial 2^3 ; e a obtenção de ácidos graxos livres (FFA) utilizando as condições determinadas pelo planejamento. Esses FFA foram caracterizados, e com esses resultados foi proposta uma nova estratégia de concentração de ácidos graxos ω 3-PUFA: a hidrólise química, seguida pela cristalização à baixas temperaturas em duas etapas na ausência de solventes. A pesquisa apontou que OR possui alto teor de UFA (71,81%) e ω 3-PUFA (17,44%). Entretanto, os triacilglicerídeos são de difícil fracionamento. A condição ótima para a hidrólise encontrada é a que o catalisador está em 22% m/m; temperatura de 90 °C; e tempo de reação de 2 h. A hidrólise foi efetiva, com o índice de acidez passando de 7,68 mg KOH/g para 172,22 mg KOH/g, e não afetou significativamente o conteúdo de UFA. A cristalização em duas etapas (10 °C e -10 °C) diminuiu os teores de SFA em 39,90%, mas também houve um decréscimo em ω 3-PUFA de 11,11%. O rendimento global foi de 54% a 60%. O concentrado obtido pode ser considerado uma rica fonte de UFA com uma quantidade total de 83,43%. Dentre esses, 16,17% são de ω 3-PUFA e 11,78% são de EPA + DHA. Dessa forma, os procedimentos de extração do óleo, hidrólise, e caracterização obtiveram sucesso. Entretanto, o procedimento de fracionamento dos ácidos graxos livres à baixas temperaturas necessita de novos estudos.

Palavras-chave: Óleo de peixe; Ácidos graxos poli-insaturados n-3; Biodiesel; Hidrólise química; Cristalização; Aproveitamento de resíduos de peixes.

ABSTRACT

The use of waste from the fishing industry is emerging worldwide as a sustainable and attractive raw material alternative in environmental, economic and social aspects. Fish oil contains omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω 3-PUFA), ingredients in the pharmaceutical industry, in the production of nutraceuticals. On the other hand, it also contains saturated fatty acids (SFA), usable in the biodiesel industry. Given this context, the objective of this dissertation was the study of fish oil aiming its fractionation into saturated and unsaturated fatty acids (UFA). In this sense, the extraction and evaluation of oil from *Clupea harengus* (OR) residues were carried out through physical-chemical, thermal, and chromatographic techniques. Followed by the optimization of the chemical hydrolysis of the oil through 2^3 factorial design; and obtaining free fatty acids (FFA) using the conditions determined by planning. These FFAs were characterized, and with these results a new strategy of concentration of ω 3-PUFA fatty acids was proposed: chemical hydrolysis, followed by crystallization at low temperatures in two steps in the absence of solvents. The research showed that OR has a high content of UFA (71.81%) and ω 3-PUFA (17.44%). However, triacylglycerides are difficult to fractionate. The optimal condition for the hydrolysis found is that the catalyst is at 22% m/m; temperature of 90 °C; and reaction time of 2 h. The hydrolysis was effective, with the acidity index increasing from 7.68 mg KOH/g to 172.22 mg KOH/g, and did not significantly affect the UFA content. Two-step crystallization (10 °C and -10 °C) decreased SFA levels by 39.90%, but there was also a decrease in ω 3-PUFA of 11.11%. The overall yield was 54% to 60%. The obtained concentrate can be considered a rich source of UFA with a total amount of 83.43%. Among these, 16.17% are ω 3-PUFA and 11.78% are EPA + DHA. Thus, the oil extraction, hydrolysis, and characterization procedures were successful. However, the fractionation procedure of free fatty acids at low temperatures needs further studies.

Keywords: Fish oil; n-3 polyunsaturated fatty acids; Biodiesel; Chemical hydrolysis; Crystallization; Use of fish waste.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Índice das movimentações financeiras dos pescados de 1990 a 2015.	27
Figura 2.1 – Esquema de um esferulito e detalhe representando o esquema das cadeias dobradas.	46
Figura 2.2 – Imagens digitais dos cristais da amostra de óleo de peixe em função da temperatura.	47
Figura 2.3 – Ácido Linoléico	49
Figura 2.4 – Estrutura dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e suas fontes naturais.	52
Figura 2.5 – Fontes de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa.	54
Figura 2.6 – <i>Clupea harengus</i> ou Arenque do atlântico.	55
Figura 2.7 – Malefícios causados à saúde corpórea pelo excesso no consumo de ácidos graxos ômega-6 e insuficiente ingestão de ômega-3.	60
Figura 2.8 – Efeitos clínicos benéficos causados pelo consumo de ácidos graxos ômega-3 (EPA e DHA) e combinação entre estes.	61
Figura 2.9 – Processamento de peixes para obtenção de óleo e farinha de pescado.	66
Figura 2.10 – Esquema da obtenção de ácidos graxos livres (Free fatty acids, FFA) por Wanasundara e Shahidi.	69
Figura 2.11 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura da complexação com uréia para a concentração de ácidos graxos poli-insaturados.	80
Figura 3.1 – Arenque da espécie <i>Clupea harengus</i> .	104
Figura 3.2 – Peixes <i>Clupea harengus</i> descongelando.	106
Figura 3.3 – Separação do peixe inteiro em partes: resíduos e filé.	107
Figura 3.4 – Separação dos peixes em duas partes: à esquerda, resíduos (vísceras, cabeças, escamas, peles, nadadeiras, espinhas) e à direita, filé.	107
Figura 3.5 – Resíduos secos em estufa (acima) e posteriormente triturados (abaixo).	108
Figura 3.6 – Filé seco em estufa (acima) e posteriormente triturado (abaixo).	108
Figura 3.7 – Extração do óleo de peixe em sistema sohxlet.	109
Figura 3.8 – Óleo de resíduos de peixe.	110

Figura 3.9 – Cromatograma do óleo de filé de peixe (OF).	131
Figura 3.10 – Cromatograma do óleo de filé de peixe (OR).	132
Figura 3.11 – Cromatograma dos triacilgliceróis do óleo de resíduos de peixe.	135
Figura 3.12 – Cromatograma dos triacilgliceróis constituintes do óleo de filé de peixe.	136
Figura 3.13 – Curva de DSC do óleo de resíduos de peixe.	139
Figura 3.14 – Curva de DSC do óleo de filé de peixe	139
Figura 4.1 – Saponificação promovida em sistema de refluxo.	151
Figura 4.2 – Comparação visual entre o óleo proveniente de resíduos de peixe (à esquerda) e os ácidos graxos resultantes do processo de hidrólise do óleo de peixe (à direita).	153
Figura 4.3 – Desenho fatorial 2^3 para a otimização da obtenção de ácidos graxos em relação ao rendimento.	154
Figura 4.4 – Gráfico de efeitos para o planejamento em relação ao rendimento. ...	155
Figura 4.5 – Quadro de interações entre fatores temperatura e catalisador do planejamento em relação ao rendimento.	156
Figura 4.6 – Gráfico dos resíduos.	160
Figura 4.7 – Gráfico dos valores experimentais versus previstos.	160
Figura 4.8 – Superfície de resposta, tendo x2 substituído por -1	162
Figura 4.9 – Superfície de resposta tendo x2 substituído por 1.	162
Figura 4.10 – Cubo dos efeitos para o planejamento em relação ao índice de acidez.	164
Figura 4.11 – Efeitos para o planejamento em relação ao índice de acidez.	165
Figura 4.12 – Quadro de interações entre fatores temperatura e catalisador do planejamento em relação ao índice de acidez.	166
Figura 4.13 – Quadro de interações entre fatores temperatura e tempo do planejamento em relação ao índice de acidez.	166
Figura 4.14 – Quadro de interações entre fatores tempo e catalisador em relação ao índice de acidez.	167
Figura 4.15 – Gráfico dos resíduos no planejamento do índice de acidez.	170
Figura 4.16 – Gráfico de valores experimentais versus previstos.	171

Figura 4.17 – Superfície de resposta para o modelo linear completo, em função do índice de acidez.	172
Figura 4.18 – Superfície de resposta para o modelo linear completo, em função do índice de acidez.	172
Figura 5.1 – Saponificação do óleo de peixe em reator MARCONI®.....	181
Figura 5.2 – Produtos de Saponificação.	182
Figura 5.3 – Aspecto após a acidificação do sabão.	183
Figura 5.4 – Lavagem da fase de ácidos graxos com água quente para retirada dos fostatatos residuais.	184
Figura 5.5 – Teste para fosfatos na água de lavagem dos ácidos graxos livres.	185
Figura 5.6 – Filtração simples com sulfato de sódio anidro.....	185
Figura 5.7 – Aspecto visual dos óleos de resíduos e filé de peixe, e ácidos graxos obtidos através da hidrólise desses óleos.....	189
Figura 5.8 – Cromatograma dos FFAR	193
Figura 5.9 – Cromatograma dos FFAF.....	194
Figura 5.10 – Curva DSC dos ácidos graxos livres obtidos do óleo de resíduos de peixe.....	197
Figura 5.11 – Curva DSC de ácidos graxos livres obtidos do óleo de filé de peixe.	198
Figura 6.1 – Amostras nos frascos de headspace submetidas ao resfriamento.	206
Figura 6.2 – Início da cristalização, formação de cristais.	207
Figura 6.3 – Separação entre a fração líquida, e a fração contendo cristais, após centrifugação.....	208
Figura 6.4 – Gráfico da porcentagem média de recuperação mássica da fração líquida.....	210
Figura 6.5 – Gráfico comparativo entre a amostra de ácidos graxos livres a partir de óleo de resíduos de peixe, e as frações resultantes do fracionamento após cristalização em diferentes temperaturas.....	212

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Ranking dos países com maior produção aquícola em 2012.	28
Tabela 2.1 – Ponto de fusão (°C) de alguns ácidos graxos, ésteres, e triacilgliceróis formados a partir desses ácidos graxos (saturados e insaturados).	41
Tabela 2.2 – Principais ácidos graxos insaturados precursores e derivados.	50
Tabela 2.3 – Conteúdo de ácidos graxos ômega-3 em várias espécies de peixes e outras fontes.....	53
Tabela 2.4 – Composição de arenques inteiros da espécie <i>Clupea harengus</i> (Determinada por Nova West Laboratory).....	56
Tabela 2.5 – Valores recomendados para a razão entre os ácidos graxos ω -6 e ω -3	58
Tabela 2.6 – Sugestões de ingestão diária recomendada de EPA e DHA para adultos de várias agências e órgãos de pesquisa.....	59
Tabela 2.7 – Exemplos de variáveis experimentais relatadas em trabalhos que utilizam a técnica de complexação com uréia.	81
Tabela 2.8 – Fracionamento de PUFA (%) em óleo de gordura de foca por cristalização à baixas temperaturas em diferentes solventes.....	83
Tabela 3.1 – Condições experimentais cromatográficas utilizadas na análise de composição de ácidos graxos na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos.	124
Tabela 3.2 – Condições cromatográficas para análise de triacilgliceróis por HT-CGC.	125
Tabela 3.3 – Resultados das análises físico-químicas para os óleos de resíduos e de filé de peixe <i>Clupea harengus</i>	127
Tabela 3.4 – Composição em ácidos graxos dos óleos de resíduos de peixe (OR) e do óleo de filé de peixe (OF) da espécie <i>Clupea harengus</i>	133
Tabela 3.5 – Composição percentual em área normalizada de ácidos graxos para óleos de resíduos de peixe (OR) e de filé de peixe (OF).	134
Tabela 3.6 – Composição em triacilgliceróis constituintes do óleo de resíduos de peixe (OR) e óleo de filé (OF).	137
Tabela 4.1 – Níveis e fatores do planejamento 2^3	150
Tabela 4.2 – Matriz de planejamento.	154
Tabela 4.3 – Tabela dos efeitos do planejamento em relação ao rendimento.	155

Tabela 4.4 – Tabela ANOVA de análise de variância para o planejamento em relação ao rendimento.....	158
Tabela 4.5 – Tabela ANOVA detalhada para planejamento em relação ao rendimento.	159
Tabela 4.6 – Tabela ANOVA para modelo linear em relação ao rendimento.	161
Tabela 4.7 – Matriz de planejamento.	163
Tabela 4.8 – Tabela dos efeitos do planejamento em relação ao índice de acidez.	164
Tabela 4.9 – Tabela ANOVA de análise de variância para o planejamento em relação ao índice de acidez.	168
Tabela 4.10 – Tabela ANOVA detalhada para planejamento em relação ao índice de acidez.	169
Tabela 4.11 – Tabela ANOVA para modelo linear em relação ao índice de acidez.	171
Tabela 5.1 – Resultados das análises físico-químicas.	190
Tabela 5.2 – Teores de elementos químicos.	191
Tabela 5.3 – Composição em ácidos graxos dos ácidos graxos livres de resíduos de peixe (FFAR) e dos ácidos graxos livres de filé de peixe (FFAF) da espécie <i>Clupea harengus</i> e seus respectivos óleos (OR e OF).	195
Tabela 5.4 – Composição percentual em área normalizada por tipo de classes lipídicas de ácidos graxos.	196
Tabela 6.1 – Teores de ácidos graxos livres após a hidrólise (FFAR) e após cada tratamento de resfriamento/cristalização.	209
Tabela 6.2 – Composição em ácidos graxos dos ácidos graxos livres de resíduos de peixe (FFAR), e das frações obtidas para a cristalização em duas etapas.	211
Tabela 6.3 – Resultados da concentração de ω 3-PUFA encontrados na literatura, expressos em acréscimos percentuais de ω 3-PUFA e de somatório das quantidades de EPA e DHA, e o percentual de recuperação da fração insaturada.	214

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 2.1 – Hidrólise de triacilgliceróis em meio ácido, liberando ácidos graxos.	39
Equação 2.2 – Reação de transesterificação alcalina.....	63
Equação 2.3 – Reação de hidrólise de triacilgliceróis em óleos gerando ácidos graxos livres como produto final de interesse..	70
Equação 3.1 – Cálculo do rendimento percentual da extração de óleo.	110
Equação 3.2 – Cálculo do teor de água presente na matéria seca inicial (massa que vai ao Soxhlet antes da extração).....	111
Equação 3.3 – Fórmula para cálculo da massa molecular média do óleo.	111
Equação 3.4 – Reação geral de padronização do HCl com o bórax.	111
Equação 3.5 – Cálculo para obter a concentração da solução de HCl.	112
Equação 3.6 – Reação de titulação entre HCl e KOH.....	112
Equação 3.7 – Cálculo do índice de saponificação.....	112
Equação 3.8 – Padronização da solução de KOH com o biftalato de potássio.	114
Equação 3.9 – Cálculo para encontrar a concentração real da solução de KOH....	115
Equação 3.10 – Cálculo do índice de acidez.....	115
Equação 3.11 – Cálculo do índice de iodo.	117
Equação 4.1 – Cálculo de rendimento.	152
Equação 4.2 – Modelo de regressão linear completo	159
Equação 4.3 – Modelo ajustado em relação aos resultados do rendimento.	159
Equação 4.4 – Modelo ajustado em relação aos resultados do índice de acidez. ..	170

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviatura ou sigla	Correspondência em português
AA	Ácido Araquidônico
ABIAD	Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para Fins Especiais e Congêneres
ALA	Ácido α -linolênico
ANP	Agência Nacional do Petróleo
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde
AO ou O	Ácido Oléico
AOAC	Associação Oficial de Química Analítica
AOCS	Sociedade Americana de Químicos de Óleo
BHT	Hidroxitolueno Butilado
C	Catalisador
CH	Interação entre Catalisador e Tempo
d	Densidade
DAG	Diacilgliceróis
DUFA	Ácidos Graxos Di-insaturados
DHA	Ácido Docosahexaenóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
EDF	Fundo de Defesa Ambiental
EN	Normas Europeias mantidas pelo Comité Europeu de Normalização
EPA	Ácido eicosapentaenóico
FA	Ácidos Graxos
FAME	Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FFA	Ácidos Graxos Livres
FFAF	Ácidos Graxos Livres Provenientes de Filé de Peixe
FFAR	Ácidos Graxos Livres Provenientes de Resíduos de Peixe
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FISHDB	Fisch Data Base

Abreviatura ou sigla	Correspondência em português
H	Tempo
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
HT-CGC	Cromatografia Gasosa Capilar a Altas Temperaturas
II	Índice de Iodo
IS	Índice de Saponificação
IFFO	Organização dos Ingredientes Marinhos
ISSFAL	Sociedade Internacional de Estudo dos Ácidos Graxos
L	Ácido Linoléico
LAMES	Laboratório de Métodos de Extração e Separação
Ln	Ácido Linolênico
MAG	Monoacilgliceróis
MPA	Ministério da Pesca e Aquicultura
NBR	Norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas
OF	Óleo de Filé de Peixe
OMS	Organização Mundial de Saúde
OR	Óleo de Resíduos de Peixe
Po	Ácido Palmitoléico
PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados
ω 3-PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-3
ω 6-PUFA	Ácidos Graxos Poli-insaturados Ômega-6
R	Rendimento
SFA	Ácidos Graxos Saturados
SNA	Sociedade Nacional de Agricultura
T	Temperatura
TAG	Triacilgliceróis
TC	Interação entre Temperatura e Catalisador
TH	Interação entre Temperatura e Tempo
TCH	Interação entre Temperatura, Catalisador, e Tempo
TUFA	Ácidos Graxos Tri-insaturados
UFA	Ácidos Graxos Insaturados
VLDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO 1	INTRODUÇÃO GERAL	26
1.1		Peixe: o superalimento da natureza	26
1.2		Objetivos	32
1.2.1		<i>Objetivo Geral</i>	32
1.2.2		<i>Objetivos específicos</i>	32
1.3		Estrutura da dissertação	33
1.4		Referências	34
2	CAPÍTULO 2	Revisão Bibliográfica	36
2.1		Lipídeos e Ácidos graxos	38
2.2		Classificação e Ponto de Fusão dos Ácidos Graxos	40
2.3		Cristalização de Óleos e Gorduras	44
2.4		Ácidos Graxos Poli-insaturados	48
2.5		<i>Clupea harengus</i> (Arenque do Atlântico)	55
2.6		Suplementação	57
2.7		Biodiesel	62
2.8		Óleo de Peixe e Farinha de Pescado	65
2.9		Métodos de Concentração de Ácidos Graxos Poli-insaturados	67

2.9.1	<i>Obtenção de ácidos graxos</i>	67
2.9.2	<i>Hidrólise química</i>	68
2.9.3	<i>Primeiras tentativas históricas de fracionamento de ácidos graxos livres: diferenças de solubilidade dos sais de ácidos graxos</i>	71
2.9.4	<i>Métodos comerciais clássicos de separação</i>	72
2.9.5	<i>Técnicas de fracionamento de ácidos graxos</i>	74
2.9.5.1	<i>Método cromatográfico</i>	74
2.9.5.2	<i>Extração com fluído supercrítico</i>	75
2.9.5.3	<i>Métodos enzimáticos</i>	77
2.9.5.4	<i>Complexação com uréia</i>	79
2.9.5.5	<i>Cristalização à baixas temperaturas com o uso de solventes</i>	82
2.9.5.6	<i>Cristalização à baixas temperaturas na ausência de solventes</i>	85
2.10	Referências	87
3	CAPÍTULO 3 Óleo de Resíduo de Peixe como Potencial Matéria-prima para Produção de Suplementos Alimentares e Biodiesel	100
3.1	Introdução	102
3.2	Parte Experimental	106
3.2.1	<i>Obtenção do óleo de peixe</i>	106
3.2.2	<i>Rendimento</i>	110
3.2.3	<i>Índice de saponificação (IS)</i>	111

3.2.4	<i>Índice de acidez (IA)</i>	114
3.2.5	<i>Índice de iodo (II)</i>	116
3.2.6	<i>Massa específica ou densidade (d)</i>	119
3.2.7	<i>Viscosidade cinemática (v_c)</i>	120
3.2.8	<i>Estabilidade oxidativa e tempo de indução (t_i)</i>	121
3.2.9	<i>Composição em ácidos graxos</i>	122
3.2.10	<i>Análise de triacilgliceróis</i>	125
3.2.11	<i>Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	126
3.3	Resultados	127
3.3.1	<i>Rendimento</i>	127
3.3.2	<i>Propriedades físico-químicas</i>	127
3.3.3	<i>Composição em ácidos graxos</i>	130
3.3.4	<i>Análise de triacilgliceróis</i>	134
3.3.5	<i>Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	138
3.4	Conclusão	140
3.5	Referências	141
4	CAPÍTULO 4	
	Otimização das Condições Reacionais para Hidrólise Química do Óleo de Peixe visando a Obtenção de Ácidos Graxos Livres	146
4.1	Introdução	148

4.2	Parte Experimental	150
4.2.1	<i>Obtenção dos ácidos graxos livres</i>	150
4.2.2	<i>Rendimento</i>	152
4.2.3	<i>Índice de acidez</i>	152
4.2.4	<i>Tratamento dos dados</i>	152
4.3	Resultados	153
4.3.1	<i>Cálculos e interpretação dos efeitos em relação ao rendimento</i>	153
4.3.2	<i>Análise de variância ANOVA em relação ao rendimento</i>	157
4.3.3	<i>Modelo de regressão em relação ao rendimento</i>	159
4.3.4	<i>Análise de planejamento e otimização da obtenção de ácidos graxos livres de acordo com o índice de acidez (teor de ácidos graxos livres)</i>	163
4.3.5	<i>Análise de variância ANOVA para o índice de acidez</i>	168
4.3.6	<i>Modelo de regressão para o índice de acidez</i>	169
4.4	Conclusão	174
4.5	Referências	175
5	5 CAPÍTULO 5 Produção e Caracterização de Ácidos Graxos Livres Obtidos do Filé e do Resíduo do Peixe Clupea harengus	177
5.1	Introdução	179
5.2	Parte Experimental	161

5.2.1	<i>Obtenção do ácido graxo proveniente de resíduos de peixe Clupea harengus</i>	161
5.2.2	<i>Rendimento</i>	186
5.2.3	<i>Propriedades físico-químicas</i>	186
5.2.4	<i>Análise de elementos químicos</i>	186
5.2.5	<i>Composição em ácidos graxos</i>	187
5.2.6	<i>Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	188
5.3	Resultados	189
5.3.1	<i>Rendimento</i>	189
5.3.2	<i>Propriedades físico-químicas</i>	189
5.3.3	<i>Análise de elementos químicos</i>	191
5.3.4	<i>Composição em ácidos graxos</i>	192
5.3.5	<i>Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)</i>	197
5.4	Conclusão	199
5.5	Referências	200
6	Uma Nova Estratégia de Concentração de ácidos graxos Poli-insaturados Ômega-3 em Óleo de Resíduos de Peixe: hidrólise química e cristalização em duas etapas na ausência de solventes	201
6.1	Introdução	203
6.2	Parte Experimental	206
6.2.1	<i>Investigação da temperatura de cristalização</i>	206

6.2.2	<i>Cristalização em duas etapas</i>	207
6.3	Resultados	209
6.3.1	<i>Investigação da temperatura de cristalização</i>	209
6.3.2	<i>Cristalização em duas etapas</i>	210
6.4	Conclusão	215
6.5	Referências	216
	CONCLUSÃO GERAL	221

1. CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Peixe: o superalimento da natureza

A busca pela sustentabilidade para suprir a população mundial em alimentação e energia abrange, como uma possível solução, o aproveitamento de resíduos ou subprodutos da atividade humana. Dentre os resíduos que podem ser aproveitados, estão os da indústria pesqueira. O descarte dos resíduos orgânicos e inorgânicos da indústria de pescado é um problema sanitário, pois sua alta concentração em matéria orgânica pode prejudicar a sanidade do solo e a saúde pública quando dispostos nos recursos hídricos (PILOTTO, 2014).

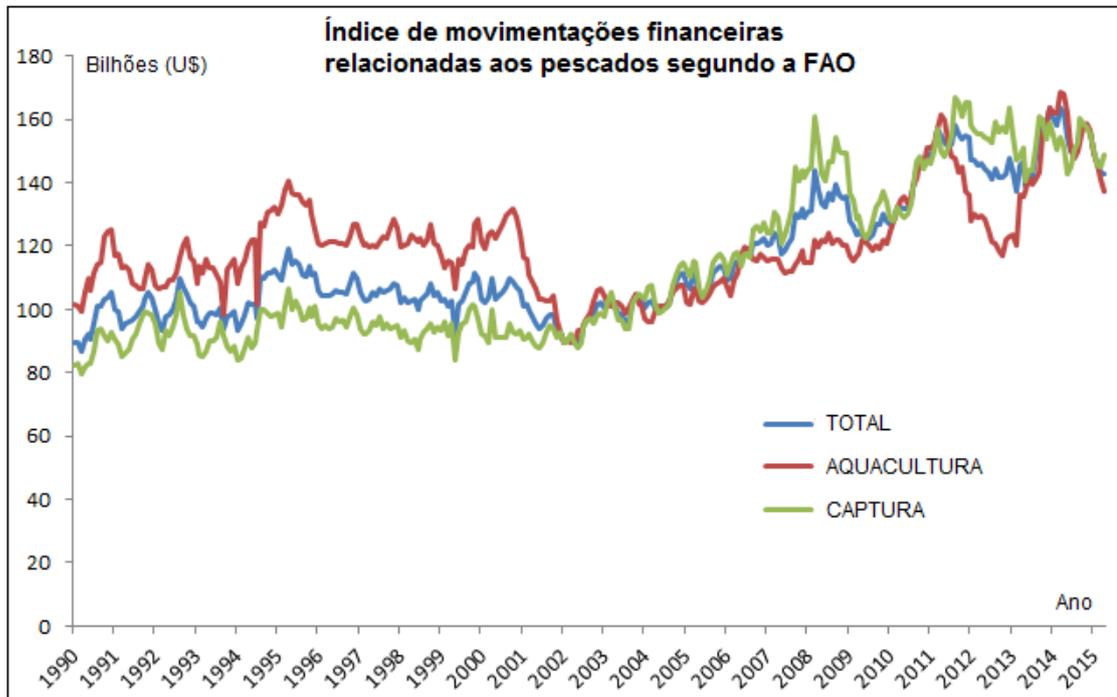
A produção mundial, pesqueira e aquícola, atingiu níveis recordes em 2012, em um total de aproximadamente 160 milhões de toneladas (MPA, 2015c). Além disso, o estabelecimento de uma tendência de crescimento das classes médias no mundo reflete no consumo de alimentação saudável (MPA, 2015b). O fato é que o consumo mundial per capita de peixe cresceu de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012 (FAO, 2014b), e estima-se que o cenário demandará de estratégias que incluem além da pesca extrativa, a aquicultura dulcícola e marítima.

A China, desde 2002, tem sido o maior exportador mundial de produtos de pesca e, em 2014, chegou a US\$ 20,8 bilhões em exportações. Outros grandes exportadores são Noruega, Vietnam, Tailândia, EUA e Chile. Os países em desenvolvimento detiveram a participação de exportações da pesca de 54% do total mundial (em valor) ou 61% em quantidade (DOWN TO EARTH, 2016).

O comércio internacional de peixe declinou em suas movimentações financeiras de US\$ 144 bilhões (2014) para US\$ 130 bilhões (2015). Isso devido à queda nos preços de algumas espécies de peixes e a alta do dólar, de acordo com a estimativa da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations ou Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação).

O índice de valores das movimentações financeiras dos pescados relativo ao período de 1990 a abril de 2015 é apresentado na Figura 1.1. Apesar disso, o comércio de peixes está altamente globalizado, é importante para países em desenvolvimento, e apresenta ganhos em moeda estrangeira para os mesmos (DOWN TO EARTH, 2016).

Figura 1.1 – Índice das movimentações financeiras dos pescados de 1990 a 2015.



Fonte: Adaptada de (GLOBEFISH, 2015)

Além disso, cerca de 200 milhões de pessoas no mundo dependem da pesca para sua subsistência. Nesse sentido, alguns dos objetivos da FAO para a atuação social da aquicultura mundial seriam: refrear a necessidade de migração da sociedade rural para o meio urbano, principalmente dos jovens, oferecendo empregos; e diminuir a discriminação das mulheres, que são na atualidade responsáveis por 20% do total de atividades de pesca primária e 90% do trabalho de processamento pós-pesca (DOWN TO EARTH, 2016).

Assim, a piscicultura marinha e o cultivo de algas marinhas é uma alternativa rentável para pequenos produtores e para investidores da agroindústria, uma vez que possuem maior valor de mercado (MPA, 2015b). No Brasil, essa produção é incipiente e necessita de melhores pacotes tecnológicos, apesar das características da zona costeira serem extremamente favoráveis à implementação da maricultura (MPA, 2015b). Uma das ações para agilizar o desenvolvimento técnico são acordos bilaterais com países como China, Coreia do Sul, Hungria, Islândia, Noruega, Paraguai, Rússia, Sudão, Uruguai e Venezuela (MPA, 2014).

Peter Gullestad, que foi por 12 anos (1996-2008), o principal executivo da agência governamental de pesca da Noruega (Norwegian Directorate of Fisheries)

afirmou que as experiências da aquicultura norueguesa são relevantes para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil, mesmo com a diferença entre espécies e clima (MPA, 2014).

A Noruega, além de ser o sexto maior produtor aquícola mundial (Tabela 1.1), também é famosa no Brasil pela qualidade de seus suplementos alimentares, produzidos a partir de óleos provenientes de peixes marinhos, tendo em suas composições altas quantidades de ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 (MOHANARANGAN, 2012; NORDIC NATURALS, 2016).

Tabela 1.1 – Ranking mundial de pescado dos países com maior produção aquícola em 2012.

País	Produção (toneladas)
China	41.108.306
Índia	4.209.415
Vietnã	3.085.500
Indonésia	3.067.660
Bangladesh	1.726.066
Noruega	1.321.119
Tailândia	1.233.877
Chile	1.071.421
Egito	1.017.738
Mianmar	885.169
Filipinas	790.894
Brasil	707.461

Fonte: (MPA, 2015b)

A recomendação da OMS (Organização Mundial de Saúde) é o consumo per capita de 12 Kg de peixe por ano. Mesmo assim, em muitos países esse consumo não é atingido, por questões que abrangem desde o preço do peixe e dificuldade de obtenção regional, a hábitos culturais e desgosto em relação ao odor e paladar. No Brasil, por exemplo, é estimado um consumo per capita em torno de 9 Kg a 10,6 Kg de pescado ao ano (FIOCRUZ, 2016; SNA, 2015). Nesse contexto, em muitos casos, a insuficiência de ômega-3 e 6 na alimentação deve ser suplementada.

Os suplementos alimentares e nutricionais são definidos como sendo:

[...] produtos constituídos por nutrientes, fitonutrientes, outras substâncias encontradas nos alimentos, substâncias e compostos bioativos, e que se destinam a suplementar a dieta habitual e suprir necessidades nutricionais, metabólicas ou fisiológicas. (SENADO FEDERAL, 2014)

Os suplementos alimentares para a ingestão de ácidos graxos poli-insaturados são geralmente concentrados de óleos oriundos de fontes marinhas. Eles contêm cerca de 30 a 90% de sua constituição em ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexanóico (DHA). Os ácidos graxos poli-insaturados estão geralmente nessas formulações na forma de ácidos graxos livres, ésteres etílicos, ou triacilgliceróis re-esterificados (DYERBERG *et al.*, 2010).

De acordo com o Ministério da Pesca e Aquicultura, MPA, o pescado representa uma fonte alimentar relevante por diversos fatores (MPA, 2014):

1. Possuem todos os aminoácidos essenciais que compõem as proteínas, auxiliando no crescimento e vitalidade;
2. Cerca de 20% de sua composição é de proteínas contendo aminoácidos não essenciais;
3. Contém ótimas doses de cálcio, vitaminas A, D, E e do complexo B, além de niacina e ácido pantotênico, iodo, sódio, magnésio, manganês, ferro e potássio;
4. Peixes como sardinha, salmão, anchova, arenque e atum são ricos em poli-insaturados como ômega-3 e ômega-6, relacionados às atividades anti-inflamatórias que auxiliam na redução do risco de doenças cardiovasculares, na diminuição dos triglicerídeos e colesterol e até mesmo na obesidade;

5. Agem na prevenção do Alzheimer, pois auxiliam na concentração e memória;
6. Melhoram a qualidade do sono

Para Audun Lem, vice-reitor do departamento de pesca e aquicultura da FAO:

O peixe tem um papel importante a desempenhar em nutrição e segurança alimentar. O peixe é o 'superalimento da natureza', uma importante fonte de proteínas e gorduras saudáveis... uma fonte única de nutrientes essenciais, incluindo ácidos graxos de cadeia longa ômega-3, iodo, vitamina D e cálcio. (DOWN TO EARTH, 2016)

A produção mundial de óleo de peixe, para fins de suplementação na forma de cápsulas, tem como seus maiores produtores: o Peru (1,92 milhões de toneladas/ano); a União Européia (0,9 a 1,5 milhões de toneladas/ ano); o Chile (481 mil toneladas/ano); e os países Islândia e Noruega (259 mil toneladas de óleo de peixe/ano) (MURGEL, 2010).

O mercado global de suplementos chegou à receita de US\$ 244 bilhões em 2013. Especificamente, 19,6 bilhões relacionados à nutrição esportiva, 14,2 bilhões ao controle de peso, e 204 bilhões de dólares, abrangeram vitaminas e suplementos como ômega-3 e 6 (ABIAD, 2014).

O mercado brasileiro de suplementos alimentares cresce em média 25% ao ano e o mercado global cresce a taxa de 20-25% ao ano, chegando a ultrapassar a receita de U\$ 200 bilhões em 2014 (DIMITROV, 2015). Dentre esses suplementos, os contendo ômega-3 são destaque (MURGEL, 2010).

Entretanto, mesmo que os óleos provenientes de pescado sejam ótimas fontes de ácidos graxos poli-insaturados, eles fornecem um óleo bruto de baixa qualidade. Isso porque geralmente são obtidos industrialmente por processos hidrotérmicos e mecânicos. Este óleo demanda então de purificação visando a sua utilização em fins mais nobres como a suplementação na alimentação humana (MORAIS e SILVA, 2001).

Assim, a obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados é desejável para aplicações na área farmacêutica e medicinal. Por outro lado, os ácidos graxos saturados são desnecessários à tal suplementação e são interessantes para o uso na produção de biodiesel, pois melhoram a estabilidade oxidativa do biodiesel normalmente obtido a partir de óleos vegetais como a soja e a canola.

Assim, nesse trabalho estudou-se a possibilidade de produzir frações insaturadas e saturadas de ácidos graxos visando a aplicação delas, respectivamente, na produção de suplementos alimentares e biodiesel. Como modelo utilizou-se o óleo extraído dos resíduos (vísceras, peles, cabeças, barbatanas, caudas e espinhas) de uma espécie de peixe marinho da Noruega e região do Atlântico Norte, denominada Arenque do Atlântico (*Clupea harengus*), comumente conhecido como sardinha norueguesa. Isso porque essa espécie de peixe é oriunda de águas frias e profundas, e assim, possui elevado teor de ácidos graxos poli-insaturados.

Vale observar que as técnicas aqui desenvolvidas não visam somente a aplicação em peixes, mas futuramente em microalgas. Elas vêm sendo estudadas para a produção de biodiesel. As microalgas são os organismos responsáveis pela composição química de ácidos graxos em óleos de peixe, o que torna tal óleo importante do ponto de vista nutricional e farmacêutico (DERNER *et al.*, 2006; FERREIRA *et al.*, 2013).

1.2 Objetivos

1.2.1 *Objetivo Geral*

O objetivo desse estudo foi obter e avaliar os ácidos graxos a partir de óleo extraído de resíduos de pescado, visando o fracionamento em frações de interesse para a produção de suplementos alimentares e biodiesel.

1.2.2 *Objetivos Específicos*

Foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- 1) Extração do óleo dos resíduos (cabeça, cauda, pele, barbatana, esqueleto e vísceras) e do óleo do filé de peixe *Clupea harengus*.
- 2) Avaliação dos óleos de resíduos (OR) e óleo do filé (OF) como possíveis matérias-primas para a produção de suplementos alimentares e biodiesel por técnicas físico-químicas, térmicas, e cromatográficas;
- 3) Otimização do processo de hidrólise química do óleo de resíduos de peixe, por planejamento fatorial 2^3 ;
- 4) Obtenção e caracterização dos óleos e dos ácidos graxos livres de resíduos de peixe (FFAR) e de ácidos graxos livres de filé de peixe (FFAF) *Clupea harengus* por técnicas físico-químicas, térmicas, e cromatográficas;
- 5) Separação da mistura de ácidos graxos livres em duas frações: uma contendo uma concentração maior em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), e outra contendo maior concentração em ácidos graxos saturados (SFA) via método físico de resfriamento controlado da mistura, bem como caracterização das frações obtidas visando seu uso como suplementos alimentares e biodiesel.

1.3 Estrutura da Dissertação

A dissertação encontra-se subdividida em seis capítulos, sendo o primeiro referente à introdução geral, e o segundo a revisão bibliográfica sobre a temática, e os demais apresentando os artigos desenvolvidos neste estudo, conforme a seguir:

- ✓ **Capítulo 1** – “Introdução geral”;

- ✓ **Capítulo 2** – “Revisão Bibliográfica” – apresenta uma revisão de literatura sobre elementos importantes para o desenvolvimento deste estudo e posteriores;

- ✓ **Capítulo 3** – referente aos estudos sobre “Óleo de Resíduo de Peixe como Potencial Matéria-prima para Produção de Suplementos Alimentares e Biodiesel”;

- ✓ **Capítulo 4** – referente ao estudo de “Otimização das Condições Reacionais para Hidrólise Química do Óleo de Peixe visando a Obtenção de Ácidos Graxos Livres”;

- ✓ **Capítulo 5** – “Produção e Caracterização de Ácidos Graxos Livres Obtidos do Filé e do Resíduo do Peixe *Clupea harengus*”;

- ✓ **Capítulo 6** – “Uma Nova Estratégia de Concentração de ácidos graxos Poli-insaturados em Óleo de Resíduos de Peixe: hidrólise química e cristalização em duas etapas na ausência de solventes”.

Ao final, uma conclusão geral.

1.4 Referências

ABIAD (Associação Brasileira da Indústria de Alimentos para fins especiais e congêneres). **Suplementos alimentares no Brasil** : Principais desafios do setor regulado. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4cbf6f004670fa1cba75be99223cd76e/4-Panorama_Vis%25C3%25A3o+Setor+Produtivo.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em: 30 mar. 2016.

DERNER, R. B. et al. Microalgas, produtos e aplicações. **Ciência Rural**, v. 36, n. 6, p. 1959–1967, 2006.

DIMITROV, G. **Um mercado em alta**: Suplementos alimentares. Disponível em: <<http://www.revistakairos.com.br/index.php/secoes/setor/252-um-mercado-em-alta-suplementos-alimentares>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

DOWN TO EARTH. **Fisheries**: an answer to food security and nutrition - For several countries fish exports are essential to national economies, FAO experts say. Disponível em: <<http://www.downtoearth.org.in/coverage/fisheries-an-answer-to-food-security-and-nutrition-53099>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

DYERBERG, J. et al. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, n. 3, p. 137–141, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2010.06.007>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Disponível em: <<http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/231544/>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

FERREIRA, S. P. et al. Revisão : microalgas - uma fonte alternativa na obtenção de ácidos gordos essenciais. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 3, p. 275–287, 2013.

FIOCRUZ. **Rico em ômega 3, peixe deve ser consumido semanalmente pelos brasileiros**. Disponível em: <<http://www.canal.fiocruz.br/destaque/index.php?id=482>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

GLOBEFISH. **FAO Fish Price Index** - July 2015 update. Disponível em: <<http://www.fao.org/in-action/globefish/fishery-information/resource-detail/en/c/338601/>>. Acesso em: 16 abr. 2016.

MOHANARANGAN, A. B. **Extraction of omega-3 fatty acids from Atlantic Herring (Clupea harengus)**. 2012. 187 f. Dissertação (Master of Applied Science) - Department of Process Engineering and Applied Science, Dalhousie University, Nova Scotia, 2012.

MORAIS, M. M. et al. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 23–33, 2001. Disponível em: <http://biblioteca.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=27&func=fil>

info&id=258>. Acesso em: 17 abr. 2016.

MPA. Plano de Desenvolvimento da Aquicultura Brasileira - 2015/2020.

Disponível em:

<http://www.mpa.gov.br/files/docs/Outros/2015/Plano_de_Desenvolvimento_da_Aquicultura-2015-2020.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2015a.

MPA. Plano Safra - Pesca e aquicultura/2015 - 2016. Disponível em:

<http://www.mpa.gov.br/files/docs/Planos_e_Políticas/plano_safra/Livro_do_Plano_Safra.pdf>. Acesso em: 22 nov. 2015b.

MPA. Primeiro Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura/ 2014. Disponível em:

<http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2015.

MURGEL, M. F. **Cápsulas de óleo de peixe** : percepção da dosagem e finalidade de consumo. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

NORDIC NATURALS. Nordic Naturals. Disponível em:

<https://www.nordicnaturals.com/ie/faq_ie.php>. Acesso em: 17 mar. 2016.

PILOTTO, M. V. T. Compostagem dos resíduos de filetagem da atividade

pesqueira da Colônia de Pescadores Z3. 2014. 59 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Ambiental e Sanitária) - Centro de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2014. Disponível em:

<<http://wp.ufpel.edu.br/esa/files/2014/10/TCC-MARCUS-PILOTTO.pdf>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

SENADO FEDERAL. Projeto de lei do Senado Número 233, de 2014. Disponível em:

<<http://www.abenutri.org/projeto-de-lei-senado-233-de-2014/>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

SNA. Consumo de pescado no Brasil está abaixo do recomendado pela OMS.

Disponível em: <<http://sna.agr.br/consumo-de-pescado-no-brasil-esta-abaixo-do-recomendado-pela-oms/>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

2. CAPÍTULO 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Ingyrd Cristina de Oliveira, Nelson Roberto Antoniosi Filho

Laboratório de Métodos de Extração e Separação, Instituto de Química,
Universidade Federal de Goiás, Campus II, Samambaia, Goiânia, Goiás, Brasil,
CEP: 74690-900.

nelson@quimica.ufg.br

ingryd.oliveira.br@gmail.com

RESUMO

A utilização de resíduos como os da pesca desponta mundialmente como uma alternativa sustentável e atrativa nos aspectos ambiental, econômico, e social. O aproveitamento desses rejeitos industriais do processamento do peixe — tais como vísceras, cabeça, nadadeiras, escamas, e pele — gera o óleo de peixe concomitantemente à produção da farinha de pescado, utilizada na alimentação animal. O objetivo desse trabalho é o estudo do óleo de peixe como matéria-prima graxa na produção de suplementos alimentares e biodiesel. Assim, essa revisão bibliográfica foi feita de forma a compreender a composição do óleo de peixe; a importância dos ácidos graxos que compõem seu conteúdo lipídico; a obtenção desses ácidos graxos em sua forma livre; e algumas das técnicas pelas quais ocorre o fracionamento de ácidos graxos pela instauração, e a concentração de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω -3 PUFA). O óleo de peixe, principalmente o de fonte marinha, se mostrou uma fonte de ω -3 PUFA. Estes são comercializados como suplementos alimentares pois são benéficos à saúde, prevenindo diversas doenças. Dentre os métodos de concentração de ω -3 PUFA, a cristalização à baixas temperaturas se destacou por ser um processo ambientalmente amigável e que evita a degradação da amostra. Além disso, foi relatado na literatura que o enriquecimento em ácidos graxos insaturados, como o EPA e o DHA, foi mais elevado sob a forma de ácidos graxos livres do que como triacilglicerol. O óleo de peixe também apresentou-se interessante na produção de biodiesel já que aproximadamente 80% do custo de produção do biodiesel é relacionado à matéria-prima graxa. O aproveitamento de um passivo ambiental como os resíduos pesqueiros revelou-se uma potencial matéria-prima importante na produção de valiosos produtos mercadológicos, e não somente artigo de alimentação animal.

Palavras-chave: Aproveitamento de resíduos; Ácidos graxos poli-insaturados n-3; Óleo de peixe; Ácidos graxos livres; Fracionamento de ácidos graxos; Cristalização.

2.1 Lipídeos e Ácidos graxos

Os lipídeos encontram-se no corpo humano como constituintes de tecidos, membranas celulares, adipócitos, e ligados às biomoléculas. Essas biomoléculas desempenham funções biológicas específicas, como na constituição de hormônios, comunicação celular, e interação com enzimas. Além disso, os lipídeos estão relacionados a uma série de cascatas bioquímicas para produzir ações fisiológicas, estando ligados assim às funções cerebrais (FAROOQUI, A, FAROOQUI, T, HORROCKS, 2000).

Dentre as principais funções dos lipídeos, pode-se citar (WAITZBERG, 2006):

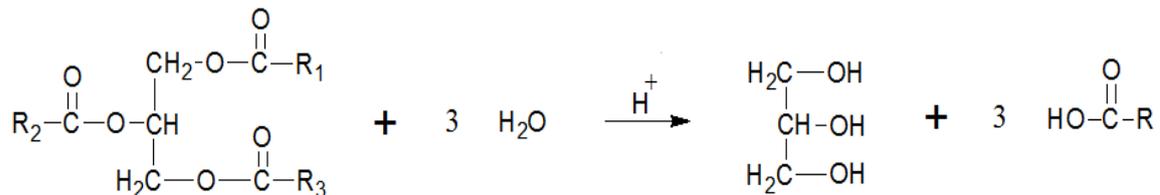
1. Fornecimento de energia (9,3 kcal/g), ácidos graxos essenciais e vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K);
2. Estoque de combustível energético, na forma de triacilgliceróis, utilizado principalmente no jejum;
3. Prover proteção mecânica de ossos e órgãos, além da manutenção da temperatura corpórea;
4. Participar da síntese de estruturas celulares, como a membrana fosfolipídica celular;
5. Participar da síntese de hormônios;
6. Transportar vitaminas lipossolúveis;
7. Funcionar como mediadores intra e extracelulares da resposta imune;
8. Participar no processo inflamatório e no estresse oxidativo.

Grande parte da dieta humana é constituída por lipídeos na forma de triacilgliceróis (TAG), também chamados de triacilglicerídeos. Os triacilgliceróis são a principal forma de armazenamento de gordura no organismo, e constituem cerca de 98% do conteúdo das gorduras. A parte remanescente é feita de diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), ácidos graxos livres (FFA), fosfolipídeos, glicolipídeos, e esteróis (METIN e HARTEL, 2005).

Os triacilgliceróis são constituídos por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. Na digestão de alimentos (Equação 2.1), realizada no fígado

(WAITZBERG, 2006), a hidrólise ácida dos TAG libera moléculas do grupo mais abundante de lipídeos nos seres vivos: os ácidos graxos.

Equação 2.1 – Hidrólise de triacilgliceróis em meio ácido, liberando ácidos graxos.



Nota: Sendo R= R₁, R₂, ou R₃ e representando as diferentes cadeias de ácidos graxos.

Ácidos graxos (FA, Fatty Acids) são ácidos orgânicos que contêm ao menos um grupo carboxílico (COOH) e uma cadeia carbônica que pode variar de tamanho (contendo de 4 a 24 carbonos). Podem apresentar estrutura isomérica, e conter ligações somente simples ou também duplas (*cis* e *trans*) (NATURE, 2015). Assim, os ácidos graxos são classificados: em relação ao número de carbonos que compõem a cadeia carboxílica; de acordo com o número de insaturações; e a posição em que se encontra a primeira ligação dupla (MARTINS; PIOTTO; BARBOSA, 2008). Essa especificidade dos ácidos graxos que os fazem desempenhar a função de definidores nas distintas propriedades físicas e químicas dos lipídios (CHRISTIE, 2013).

Os ácidos graxos fazem parte da constituição de diversos seres vivos, sendo que alguns podem ser produzidos pelo organismo humano e alguns devem ser adquiridos através de uma alimentação equilibrada (ácidos graxos essenciais). Na natureza, dificilmente os ácidos graxos estão livres, sendo geralmente encontrados ligados a outras moléculas por seu grupo terminal carboxílico (COOH) (MARTINS; PIOTTO; BARBOSA, 2008).

2.2 Classificação e Ponto de Fusão dos Ácidos Graxos

Os ácidos graxos são classificados de acordo com a quantidade de átomos de carbono (cadeia curta, média, ou longa), e de acordo com o critério de ausência ou presença de insaturações em sua cadeia estrutural (saturados ou insaturados). Dentre os insaturados também se faz distinção isomérica entre os ácidos graxos que possuem ligações *cis* e os que possuem ligações *trans*.

Os ácidos graxos saturados são aqueles que não possuem duplas ligações entre átomos de carbonos. Os materiais graxos preponderantemente saturados são geralmente sólidos à temperatura ambiente (25°C), sendo denominados gorduras. O estado sólido ocorre por terem um fácil empacotamento intermolecular causado pela ausência das insaturações (IMAHARA; MINAMI; SAKA, 2006).

Os materiais graxos insaturados são usualmente líquidos à temperatura ambiente, sendo denominados óleos. A presença de ligações duplas *cis* gera um ângulo na estrutura dos ácidos graxos, o que diminui a ordem do empacotamento, e o número de interações de van der Waals entre as cadeias. Como consequência, menor energia é necessária para perturbar o empacotamento dos ácidos graxos. Por esta razão, os ácidos graxos insaturados possuem menores pontos de fusão que os saturados.

Sendo assim, os óleos (vegetais, animais, e os provenientes de fontes marinhas) que contêm uma grande fração insaturada em sua composição, são líquidos a temperatura ambiente. Já acerca das gorduras animais ou vegetais, compostas majoritariamente de ácidos graxos saturados ou de ácidos insaturados *trans*, essas possuem o ponto de fusão aproximadamente entre 30 °C e 42 °C (INSUMOS, 2015).

Isso ocorre, pois a introdução de uma ligação dupla *cis* em uma cadeia de ácido graxo reduz o ponto de fusão consideravelmente, em comparação com a cadeia saturada com o mesmo número de átomos de carbono. Isso porque a ligação dupla *cis* introduz uma curva na cadeia do hidrocarboneto. O mesmo não é verdadeiro para uma ligação dupla *trans*, pois nesse caso, a cadeia é propagada de um modo próximo ao das espécies saturadas correspondentes (KNOTHE e DUNN, 2009). Na Tabela 2.1, são apresentados os pontos de fusão de alguns ácidos graxos, ésteres, e triacilgliceróis correspondentes.

Tabela 2.1 – Ponto de fusão de alguns ácidos graxos, ésteres, e triacilgliceróis formados a partir desses ácidos graxos (saturados e insaturados).

Tipo de Cadeia Carbônica	Notação Taquigráfica	Ponto de Fusão segundo a função química (°C)			
		Ácido	Éster Metílico	Éster Etilico	Triacilglicerídeo
SATURADA	C8:0	15	-37	-45	9
	C10:0	31	-13	-20	30
	C12:0	43	4	-2	46
	C14:0	53	18	13	57
	C15:0	52	18	12	55
	C16:0	62	28	23	65
	C18:0	69	38	33	73
	C20:0	75	46	41	78
	C22:0	80	53	49	83
	C24:0	84	59	56	86
INSATURADA	C14:1 cis9	-4	-52	-65	
	C16:1 cis9	1	-34	-37	-23
	C16:1 trans9	32	-3	-11	32
	C18:1 cis6	29	-1	-8	26
	C18:1 trans6	52	19	9	52
	C18:1 cis9	13	-20	-20	4
	C18:1 trans9	43	10	4	

continua

conclusão

Tabela 2.2 – Ponto de fusão (°C) de alguns ácidos graxos, ésteres, e triacilgliceróis formados a partir desses ácidos graxos (saturados e insaturados).

Tipo de Cadeia Carbônica	Notação Taquigráfica	Ponto de Fusão segundo a função química (°C)			
		Ácido	Éster Metílico	Éster Etílico	Triacilglicerídeo
INSATURADA	C18:1 cis11	15	-24	-36	1
	C18:1 trans11	43	10	4	
	C18:2 cis9, cis12	-7	-43	-57	-13
	C18:3 cis9, cis12, cis15	-12		-62	
	C20:1 cis9	23			
	C20:1 cis11	23	-8	-9	10
	C20:1 trans11	52	21	14	
	C22:1 cis13	32	-3	-11	30
	C22:1 trans13	59	29	25	
C24:1 cis15	43	9	1	41	

Fonte: Elaborada pela Autora (dados retirados de KNOTHE E DUNN, 2009).

Os fatores que afetam o ponto de fusão dos ácidos graxos são: o tamanho da cadeia dos ácidos graxos (quanto maior a cadeia carbônica, maior o ponto de fusão); grau de saturação (quanto mais saturado, maior o ponto de fusão); e isomeria (ácidos graxos *trans* possuem maior ponto de fusão que os *cis*) (INSUMOS, 2015).

Em regra geral, a conversão de um ácido graxo em seu éster metílico diminui o ponto de fusão, sendo tal diminuição intensificada na forma de éster etílico. Isso

porque diminui as ligações de hidrogênio (de O-H no ácido, para O-CH₃ no éster metílico, por exemplo).

Para ácidos graxos de cadeia curta (C_{6:0} e C_{8:0}), o triacilglicerol correspondente possui ponto de fusão inferior ao ácido graxo, mas superior aos ésteres metílicos ou etílicos. Para ácidos graxos saturados de C_{12:0} a C_{24:0}, o triacilglicerol correspondente possui maior ponto de fusão que o do ácido graxo livre, bem como de seus ésteres metílicos e etílicos.

Para ácidos graxos insaturados, em regra gerais, o triacilglicerol correspondente possui ponto de fusão inferior ao ácido graxo livre que o gerou, mas superior ao apresentado por ésteres metílicos e, principalmente, etílicos.

Assim, para estudos de fracionamento de matérias graxos por resfriamento, as temperaturas necessárias para cristalizar ácidos graxos livres são mais facilmente acessíveis que as necessárias quando tais ácidos se encontram na forma de ésteres metílicos ou etílicos. Além disso, a forma de ácido graxo livre é preferível à forma de triacilglicerídeo dada a maior diversidade de estruturas químicas de diferentes pontos de fusão desse último.

2.3 Cristalização de Óleos e Gorduras

Processos de cristalização de óleos e gorduras – tais como óleo de palma, gordura do leite, sebo bovino, e gordura do cacau – são frequentemente promovidos pela indústria alimentícia na alteração de características primordiais das matérias-primas. Essas características incluem sabor, textura, brilho, odor, e estabilidade durante o tempo de prateleira. Os processos tem como objetivo a elaboração de produtos finais como a manteiga, a margarina, o chantilly, e a manteiga de amendoim, entre outros.

Essas alterações que fazem com que o leite adquirido no supermercado seja tão diferente do retirado diretamente da vaca na fazenda, o chocolate seja tão diferente da fruta cacau, o sorvete seja por algum tempo uma mistura estável e homogênea, e que alimentos não encontrados na natureza (a margarina, por exemplo) sejam encontrados nas prateleiras de mercados (METIN e HARTEL, 2005).

A cristalização de lipídeos é complexa e não poderia ser diferente, por quatro razões (METIN e HARTEL, 2005):

1. A maior parte dos lipídeos é composta de triacilgliceróis, e estes contêm cada um, três ácidos graxos de diferentes comprimentos de cadeia e graus de insaturação, gerando uma vasta gama de componentes possíveis nos óleos e gorduras. Um lipídeo natural é, na verdade, uma rica mistura formada por diferentes triacilgliceróis – cerca de 12 tipos na manteiga de cacau e mais de 100 na gordura do leite – que ao cristalizar tende a formar cristais mistos de distintos tipos de TAG;
2. Os componentes minoritários dos lipídeos, mesmo que representando menos que 5% da constituição total, alteram substancialmente a forma como a cristalização acontece;
3. A existência do polimorfismo, que é a capacidade de uma mesma molécula formar diferentes formas cristalinas, dependendo da estrutura molecular dos triacilgliceróis do lipídeo que será submetido a cristalização, e da forma como

essa cristalização será efetuada (otimização de fatores externos como temperatura, pressão, taxa de resfriamento, impurezas, velocidade de agitação);

4. Ao submeter um material lipídico à cristalização, seu rápido arrefecimento dá origem às formas polimórficas instáveis de estados mais baixos em energia livre de Gibbs. A posterior transformação dessas formas instáveis em polímeros mais estáveis é muito lenta, levando horas ou dias para acontecer. Essas formas polimórficas estáveis possuem maior ponto de fusão e calor latente que as anteriores (METIN; HARTEL, 2005).

Assim, questiona-se: como a cristalização dos lipídeos acontece? Seu primeiro estágio é a nucleação, que também vem a ser o fator mais importante na cristalização, e acontece quando as moléculas no estado líquido conseguem quebrar certa barreira de energia livre, oposta a transição e organização delas na forma de cristal. O núcleo é o menor cristal formado na solução à determinada temperatura. Quando ele é formado, o calor latente de fusão é liberado, e as moléculas assumem um estado de menor energia de organização na rede cristalina (METIN e HARTEL, 2005).

A nucleação pode acontecer de maneira homogênea, sem a assistência de superfícies externas ou aditivos, ou seja, de maneira natural as moléculas na fase líquida se aglomeram continuamente formando núcleos. Existe um tamanho crítico para os núcleos, acima do qual, são formados núcleos estáveis; mas abaixo dele, pequenos aglomerados de moléculas são formados, e quase sempre, se dispersam na fase líquida do lipídeo (METIN; HARTEL, 2005).

Outra forma da nucleação ocorrer, que é a utilizada comercialmente, consiste na adição de superfícies externas, ou iniciadores de nucleação, para reduzir a barreira de energia livre a ser quebrada pelo sistema. Esses sítios de nucleação podem ser as paredes do recipiente, partículas de poeira, sistemas de agitação, ou quaisquer partículas estranhas que sejam acrescentadas ao sistema.

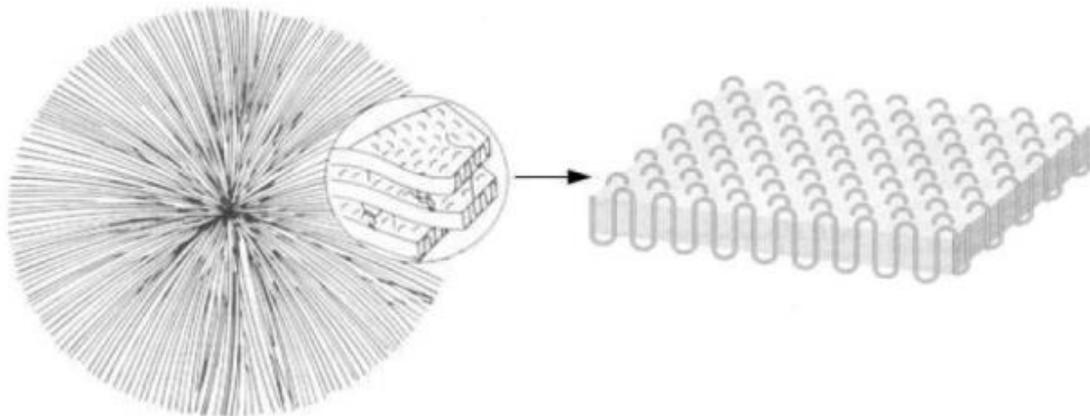
Assim, a nucleação heterogênea diminui a força motriz necessária para a cristalização, podendo esta ser conseguida com a diminuição de temperatura, ou a supersaturação da solução. A dificuldade está em atingir uma similaridade de resultados entre as múltiplas cristalizações do material (METIN; HARTEL, 2005).

É importante salientar que a agitação deve ser reduzida ao mínimo necessário à transferência de calor, na maioria dos casos, já que ela forma núcleos secundários menores que os primeiros cristais, estes sendo de difícil separação (METIN; HARTEL, 2005).

A temperatura é determinante no processo. O resfriamento rápido do material lipídico durante a cristalização aumenta o número de cristais e gera cristais pequenos. Já o resfriamento lento sob agitação suave, forma cristais visíveis à olho nu. Esses cristais grandes o suficiente para serem visíveis, podem por sua vez, agregarem-se e formarem agregados cristalinos (esferulitos) de até centenas de micrômetros (WILFREDO; GAMBOA; GIOIELLI, 2006), tal como acontece com os polímeros, por exemplo (AKCELRUD, 2007).

Em polímeros a cristalização cresce a partir dos núcleos cristalinos que formam cadeias (também chamadas de redes cristalinas), e as cadeias se dobram formando as lamelas. As lamelas ramificam-se em várias direções, tais como fitas (comportamento esférico), e ao final formam esferulitos (Figura 2.1).

Figura 2.1 – Esquema de um esferulito e detalhe representando o esquema das cadeias dobradas.

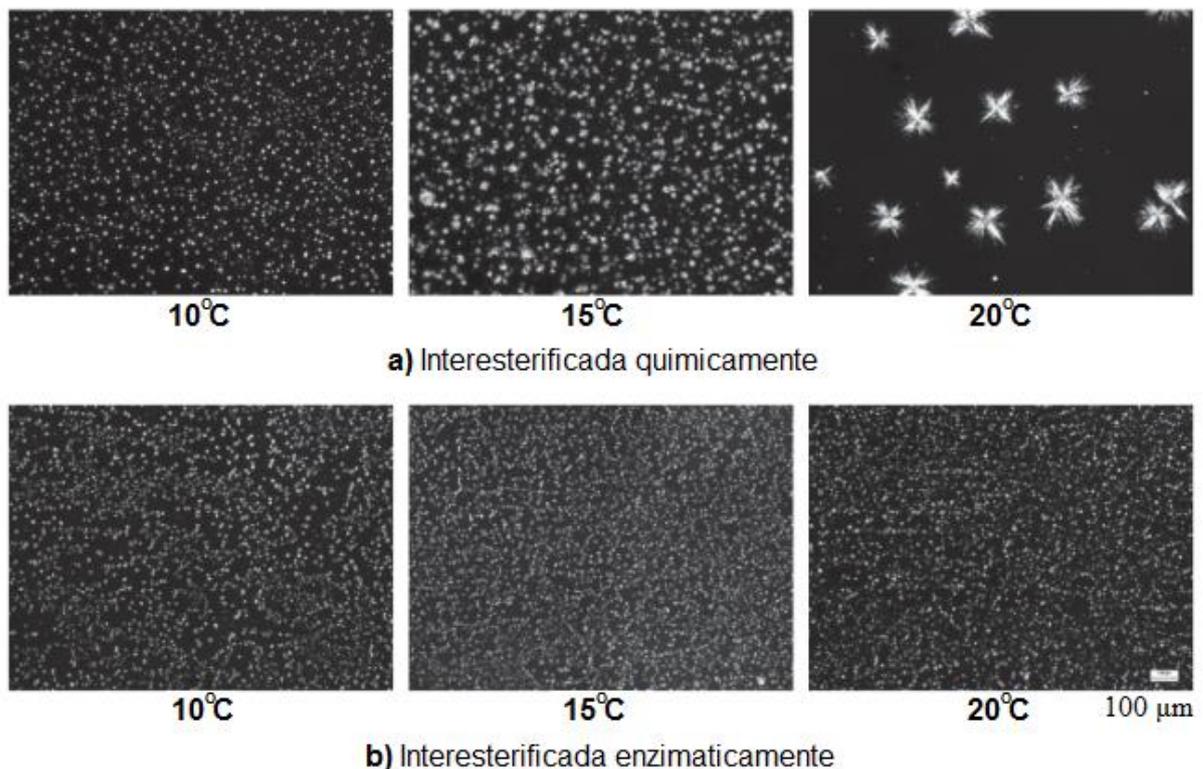


Fonte: Figura adaptada de (FREITAS, 2014).

No encontro de dois esferulitos, as lamelas de cada um deles se sobrepõem na região não cristalizada, mantendo o material unido. Os esferulitos perdem suas formas esféricas e passam a formar poliedros (AKCELRUD, 2007; FREITAS, 2014; WILFREDO; GAMBOA; GIOIELLI, 2006).

Além do uso dos nucleantes, é importante observar também que a modificação de lipídeos estruturados pode levar à elevação do ponto de cristalização e formação de esferulitos. O óleo de peixe, por exemplo, não apresenta estrutura cristalina mesmo a 10 °C. Entretanto, após o óleo de peixe passar pelo processo de esterificação, é possível observar a cristalização logo abaixo de 23,5 °C e 21,5 °C, respectivamente. Além disso, os maiores cristais observados ocorreram geralmente a 20 °C, como pode ser facilmente notado na Figura 2.2 (WILFREDO; GAMBOA; GIOIELLI, 2006).

Figura 2.2 – Imagens digitais dos cristais da amostra de óleo de peixe em função da temperatura.



Fonte: Adaptada de (WILFREDO; GAMBOA; GIOIELLI, 2006).

A última etapa da cristalização, o crescimento de cristais, acontece até que o equilíbrio de fases seja atingido, ou até que todo o sistema seja cristalizado.

2.4 Ácidos Graxos Poli-insaturados

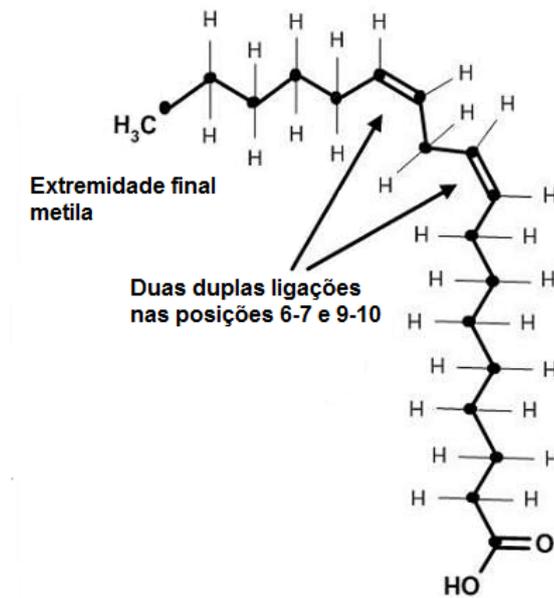
Enquanto os ácidos graxos saturados e os insaturados *trans* estão associados ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HUNTER, 2006, REMIG *et al.*, 2010), e seu consumo suspeito no desenvolvimento de diabetes (SOUZA *et al.*, 2015) e câncer (THOMPSON *et al.*, 2008); os ácidos graxos insaturados *cis* estão associados a diversos efeitos benéficos à saúde.

Dentre os ácidos graxos insaturados, os que sem dúvida têm ganhado destaque, são os ácidos graxos que contém quatro ou mais insaturações, os chamados ácidos graxos poli-insaturados (CARVALHO *et al.*, 2003; MARTINS; PIOTTO; BARBOSA, 2008). Essa importância é justificada pela incapacidade do corpo humano em sintetizar os ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω -3) e ômega-6 (ω -6), e pela necessidade da presença destes no organismo, para sintetizar ácidos do tipo ômega 9 (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016).

Os ácidos graxos possuem uma extremidade terminal contendo um radical metila ($-\text{CH}_3$) e uma extremidade carboxila ($-\text{COOH}$) (SEGURA, 2012), como pode ser visto na Figura 2.3, a qual corresponde ao ácido linoléico, representando a estrutura básica dos ácidos graxos. Os ácidos graxos insaturados fazem parte de 4 famílias diferentes: ω -3 (derivados do α -linolénico – Ln), ω -6 (derivados do ácido linoléico – L), ω -7 (derivados do ácido palmitoléico – Po), ω -9 (derivados do ácido oléico – O) (SEGURA, 2012).

Os ácidos graxos ω - 3, 6, 7 e 9 são assim denominados por possuírem a primeira dupla ligação nos respectivos carbonos 3, 6, 7 e 9, contados a partir do carbono do radical metil terminal (extremidade oposta à da carboxila) (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016). Comumente a nomenclatura abrange o uso de símbolos para designar onde se encontra a insaturação, podem ser Δ -, ω -, ou n-, seguidas pelo número que designa o número do átomo de carbono da primeira insaturação (SEGURA, 2012).

Figura 2.3 – Ácido Linoléico



Ácido linoléico (C18:2 ω-6)

Fonte: Adaptada de (LOOK FOR DIAGNOSIS, 2016).

Os ácidos graxos ω-3 são encontrados em fontes marinhas, tais como nos óleos de peixes (sardinha, salmão, atum, arenque, anchova, entre outros peixes que vivem em águas profundas e frias); microalgas marinhas; e nos óleos e sementes de alguns vegetais, como a linhaça.

Os ácidos graxos ômega-6 possuem uma função especial na conservação da pele e epitélios; e tem como fontes alimentares os óleos vegetais tais como os de girassol, milho, soja, e oliva. Os FA ômega-6, como o linoléico, tem a capacidade de diminuir ambos os colesterol, os de alta (HDL) e os de baixa (LDL) densidade. Já os ácidos graxos monoinsaturados (presentes no azeite de oliva) tendem a diminuir somente o colesterol prejudicial, de baixa densidade (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016).

Os ácidos graxos ômega-9 tem como principal representante o ácido oléico. Ele é importante na síntese de hormônios, no controle do apetite, e na diminuição da gordura abdominal. O ômega-9 pode ser encontrado no azeite de oliva (representando cerca de 70% de sua constituição); óleo de sementes de uva; óleo

de canola; óleo de girassol; óleo de gergelim; óleo de soja; óleo de palma; abacate; castanhas; amêndoas e nozes; e animais marinhos (tais como tubarão e bacalhau) (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016).

Assim, nos seres vertebrados, os ácidos graxos essenciais são os ácidos linoléico e α -linolênico. Isso porque tais organismos não possuem as enzimas Δ -12 e Δ -15 desnaturase, que atuam na síntese de tais ácidos graxos (SEGURA, 2012). Esses ácidos graxos são precursores dos demais ácidos graxos poli-insaturados (Tabela 2.3).

Tabela 2.3 – Principais ácidos graxos insaturados precursores e derivados.

Ácido graxo precursor	Ácidos graxos poli-insaturados derivados
Ácido linoléico (L / 18:2 ω -6)	Ácido araquidônico (AA / 20:4 ω -6)
Ácido linolênico (Ln / 18:3 ω -3)	Ácido eicosapentanóico (EPA / 20:5 ω -3) Ácido docosapentanóico (DPA / 22:5 ω -3) Ácido docosahexaenóico (DHA / 22:6 ω -3)

Fonte: (SEGURA, 2012).

Os PUFA mais importantes são o ácido alfa-linolênico (Ln); ácido eicosapentaenóico (EPA); ácido araquidônico (AA); ácido docosapentaenóico (DPA); e ácido docosahexaenóico (DHA) (MOHANARANGAN, 2012). Mais especificamente, os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, contendo quatro ou mais insaturações (tais como o EPA e o DHA), são os componentes de diversas formulações de suplementação alimentar (MCMANUS; MERGA; NEWTON, 2011; SWANSON; BLOCK; MOUSA, 2012).

Os primeiros estudos sobre os ácidos graxos poli-insaturados, como os pertencentes ao ômega-3, são da década de 70, investigando a doença coronária em esquimós da Groelândia (MARTINS; PIOTTO; BARBOSA, 2008). Foi constatado que apesar dos esquimós possuírem uma dieta de alta ingestão de gorduras e baixa ingestão de carboidratos, seus níveis de triacilglicerídeos, colesterol, e lipoproteínas de baixa densidade (VLDL, Very Low Density Lipoprotein) foram considerados

baixos. Já os níveis encontrados de lipoproteínas de alta densidade (HDL, High Density Lipoprotein) foram altos.

Estes fatores foram relacionados à baixa incidência de doenças como asma, psoríase, auto-imune, cardiovascular, artrite, trombose, hipertensão e arteriosclerose (MARTINS; PIOTTO; BARBOSA, 2008). A explicação para tal fato é a alimentação dos esquimós, composta por peixes ricos em ômega-3 (ADITIVOS E INGREDIENTES, 2016).

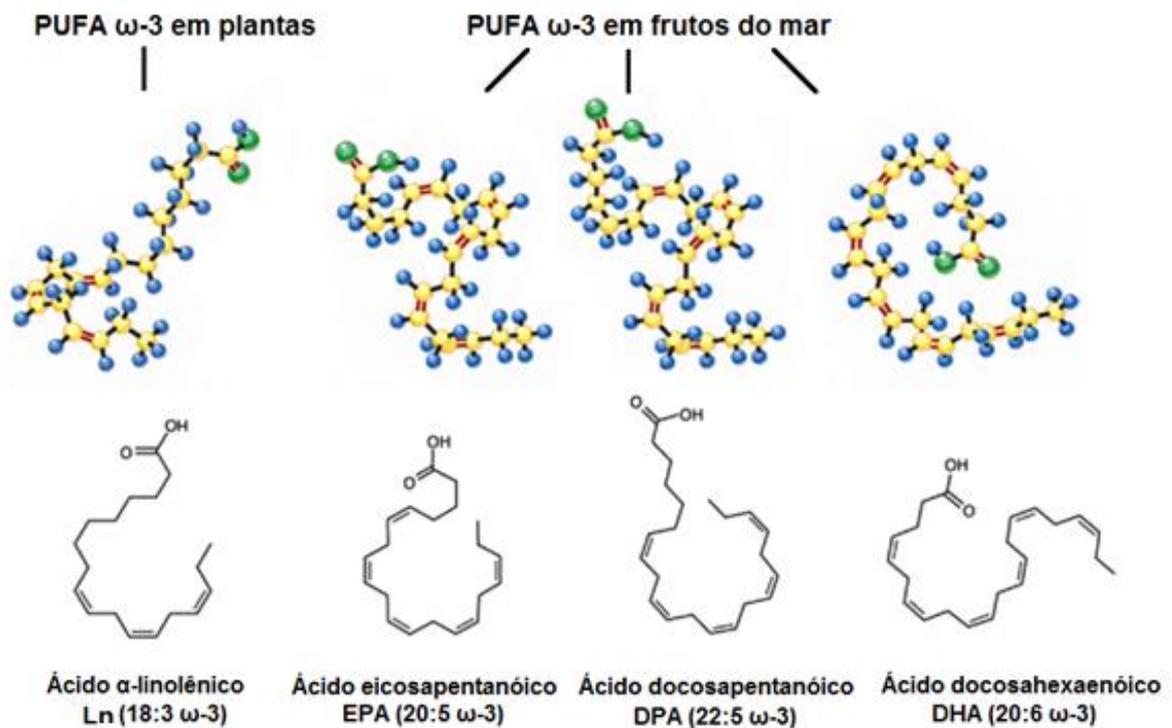
Não há dúvidas que a ingestão dos ácidos graxos poli-insaturados é parte importante de uma dieta saudável, especialmente os ômega-3. Inúmeros trabalhos narram os benefícios da ingestão diária de ácidos graxos essenciais, tais como a prevenção das seguintes desordens:

1. Problemas cardíacos;
2. Depressão;
3. Falta de memória;
4. Obesidade;
5. Osteoporose;
6. Ansiedade;
7. Artrite;
8. Câncer;
9. Hipertensão;
10. Na gravidez, diminui os riscos de partos prematuros e favorece o incremento de peso do recém-nascido;
11. Melhora de humor e tensão pré-menstrual;
12. Favorece a melhora da visão.

Isso, de acordo com várias referências (CHANG *et al.*, 2015; CHOWDHURY *et al.*, 2012; CONNOR, 2000; HUNT, 2014; KINSELLA, 1986; KURATKO; NOLAN; SALEM, 2014; MANSOORI *et al.*, 2015; MARCHIOLI; LEVANTESI, 2013; MARTIN *et al.*, 2006; MARTINS, 2012; MOHANARANGAN, 2012; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2005; OMS, 2015; ONGARATTO, 2016; PACHECO; REGITANO-D'ARCE, 2009; PUSCEDDU *et al.*, 2015; RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010; SEGURA, 2012; SWANSON; BLOCK; MOUSA, 2012; TOUSOULIS *et al.*, 2014;

WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2008). A estrutura de alguns dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e algumas de suas fontes estão representadas na Figura 2.4.

Figura 2.4 – Estrutura dos ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e suas fontes naturais.



Fonte: Adaptada de (MOZAFFARIAN; WU, 2011).

Os EPA, DPA, e DHA estão principalmente nas fontes marinhas como: peixes; frutos do mar; algas (TOCHER, SARGENT, 1984, MOHANARANGAN, 2012, SWANSON, BLOCK, MOUSA, 2012); e microalgas (XAVIER, MANCINI, MANCINI-FILHO, 2002, FERREIRA et al., 2013). O conteúdo desses ácidos, também classificados como ômega-3, varia de acordo com a espécie de peixe ou outros frutos do mar, como observado na Tabela 2.3.

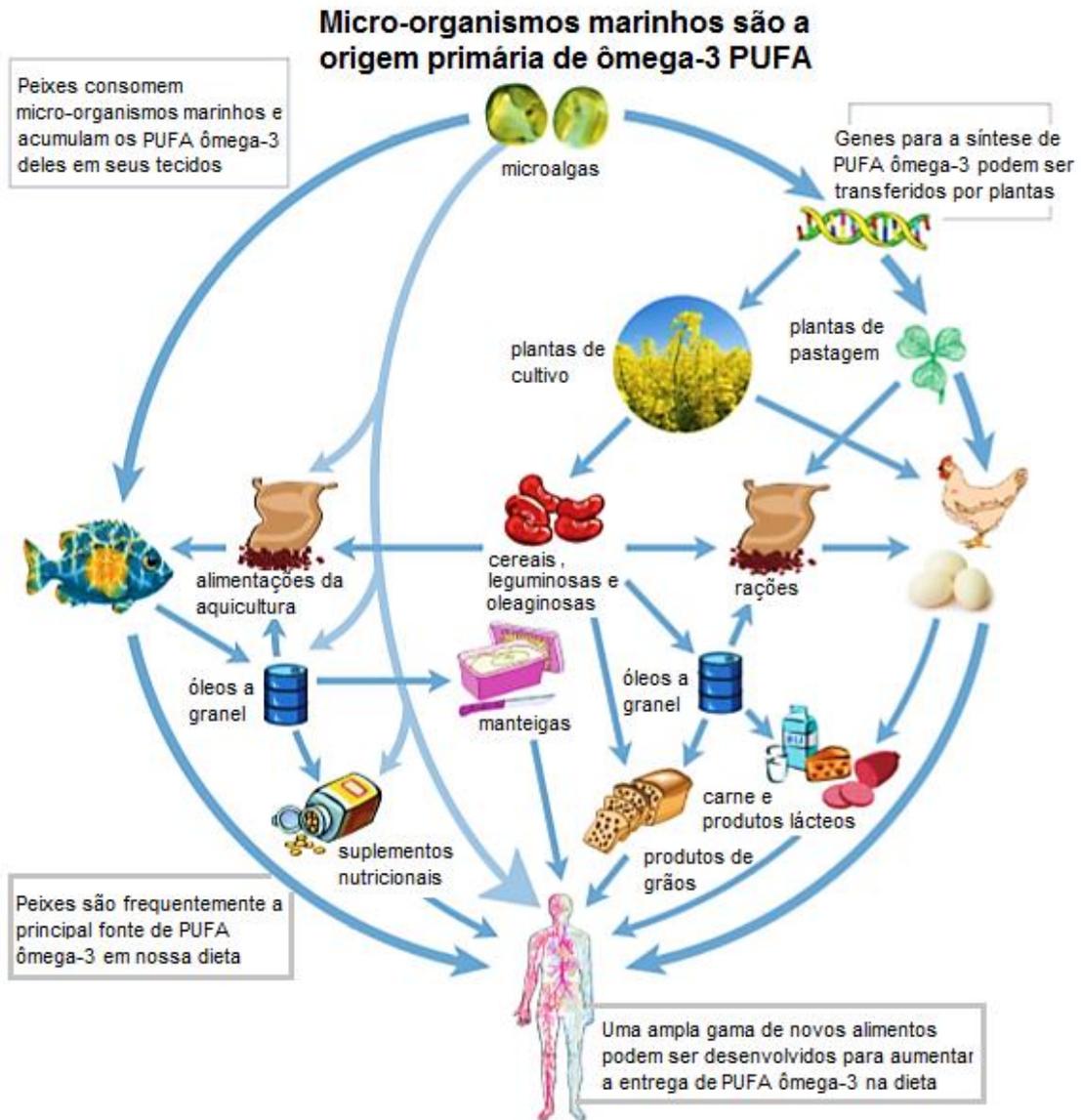
Tabela 2.4 – Conteúdo de ácidos graxos ômega-3 em várias espécies de peixes e outras fontes.

Fontes de ômega-3 (nome comum)	Ômega-3 (EPA + DHA) (g/100 g de peixe)
Atum (fresco)	0,28 - 1,51
Salmão do Atlântico	1,28 - 2,15
Cavala	0,4 - 1,85
Arenque do Atlântico ou <i>Clupea harengus</i>	2,01
Truta-arco-íris	1,15
Sardinhas	1,15-2
Halibute	0,47 - 1,18
Atum (enlatado)	0,31
Bacalhau	0,28
Hadoque	0,24
Peixe gato	0,18
Linguado	0,4
Ostra	0,44
Camarão	0,32
Vieira	0,20
Óleo de fígado de bacalhau (em cápsula)	0,19
Suplemento Omacor (Ésteres etílicos de Omega-3 em cápsulas)	0,85

Fonte: (PICCOLO, 2008).

Apesar da atual fonte de ômega-3 ser majoritariamente composta por fontes marinhas, outras fontes estão, e podem ser futuramente pesquisadas (KITESSA *et al.*, 2014) (Figura 2.5). Entretanto, ainda não há evidências da eficiência de suplementos que substituam os organismos contendo EPA e DHA (KITESSA *et al.*, 2014).

Figura 2.5 – Fontes de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 de cadeia longa.



Fonte: Adaptada de (KITESSA *et al.*, 2014).

Nota: As fontes correntes são mostradas à esquerda da figura, sendo frutos do mar e microalgas, enquanto as potenciais futuras fontes, abrangendo plantas geneticamente modificadas, são apresentadas à direita na figura.

2.5 *Clupea harengus* (Arenque do Atlântico)

Um exemplo de espécie de peixes marinhos que é uma fonte alimentar rica em ômega-3 é o *Clupea harengus* (Figura 2.6). Ele contém, em cada 100 g de peixe: cerca de 909 mg de EPA; 71 mg de DPA; 1,105 mg de DHA; e 2,014 g de EPA + DHA (MOZAFFARIAN; WU, 2011). Sua alimentação é de plânctons e zooplânctons presentes no ambiente marinho. Também chamado comumente de arenque do atlântico ou sardinha norueguesa, sua espécie é assim classificada por Linnaeus em 1758 (ITIS, 2016):

Reino *Animalia*
Filo *Chordata*
Classe *Actinopterygii*
Ordem *Clupeiformes*
Família *Clupeidae*
Gênero *Clupea* Linnaeus
Espécie *Clupea harengus* Linnaeus

Figura 2.6 – *Clupea harengus* ou Arenque do atlântico.



Fonte: Adaptada de (FISHDB, 2013).

A composição dos arenques inteiros da espécie *Clupea harengus* é mostrada na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Composição de arenques inteiros da espécie *Clupea harengus* (Determinada por Nova West Laboratory).

Parâmetros	Valor (%)
Gordura	8,82
Proteína	18,46
Umidade	70,36
Cinzas	2,12
Carboidratos	0,24

Fonte: (MOHANARANGAN, 2012)

Os peixes prateados da espécie *Clupea harengus* vivem em grandes cardumes que migram e desovam em padrões complexos, emergindo das águas profundas para a superfície no período noturno. O comprimento deles pode chegar a 46 cm. As principais fontes de *Clupea harengus* estão na Noruega, seguida pela Islândia e Canadá. Eles são capturados em pescarias marinhas, principalmente com redes de arrasto pelágico (EDF, 2016).

2.6 Suplementação

Um fato de grande importância sobre a ingestão dos ácidos graxos é a relação entre o consumo de ômega-6 e 3 (ω -6/ ω -3). A alimentação dita 'ocidental' tem se distanciado nos últimos 20 anos da alimentação saudável, com o incremento da ingestão exacerbada de alimentos ricos em ômega-6 (óleos vegetais, por exemplo) em detrimento dos alimentos contendo ômega-3 (peixes, por exemplo) (SEGURA, 2012).

Um marcador de deficiência em ácidos graxos essenciais é a acumulação do ácido all-cis-5,8,11-eicosatrienóico (C20:3 ω -9) nos tecidos. Em uma dieta de baixa ingestão de ácidos graxos essenciais, o ácido graxo insaturado mais abundante nos tecidos, o ácido oléico é dessaturado e alongado à eicosatrienóico (20:3 ω -9). Já o desbalanceamento da ingestão de ácidos graxos ômega-6 e 3 é marcado pela diminuição de DHA (22:6 ω -3) nos tecidos, e acumulação de docosapentaenóico (22:5 ω -6) (FAO, 2016).

Nos últimos séculos, o excessivo consumo de ácidos graxos ômega-6, juntamente ao decréscimo no consumo de ômega-3, têm sido em parte, o responsável por diversas desordens: psiquiátricas, tais como depressão, bipolaridade, declínio cognitivo, e esquizofrenia; doenças cardiovasculares; problemas de origem inflamatória; além de problemas sociais como o aumento da agressividade (SOUZA, 2010).

Um recente estudo aponta que um índice sanguíneo de ácidos graxos ômega-3 (EPA+DHA) menor que 4%, confere um elevado risco de mortalidade por doenças cardíacas; enquanto um índice maior que 8%, confere maior proteção contra as doenças cardiovasculares. Além disso, esse estudo associa o índice baixo de ômega-3 (cerca de 3,95%), encontrado em pacientes de doenças mentais tais como esquizofrenia e depressão, com o possível surgimento e agravamento desse tipo de doença (PARLETTA *et al.*, 2016).

Enquanto a relação ω -6/ ω -3 atual é de 15 a 20/1, a dos animais selvagens é de 1/1, e provavelmente, essa seria a relação presente na alimentação dos primeiros humanos (SEGURA, 2012). O equilíbrio entre a ingestão de ácidos graxos ômega-3 e 6 é importante, pois eles participam competitivamente em atividades biológicas (FAO, 2016).

A taxa de ingestão recomendada para o tratamento eficaz de doenças cardiovasculares varia de 1 a 5/1, e para a redução do risco de doenças crônicas é de 1 ou 2/1 (SEGURA, 2012). Outros valores recomendados são mostrados na Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Valores recomendados para a razão entre os ácidos graxos ω -6 e ω -3.

País ou Instituição	ω-6/ω-3
Canadá	4:1 – 10:1
EUA	2:1 – 3:1
França	5:1
Japão	2:1 – 4:1
Suécia	5:1
Recomendado por WHO*/FAO**	5:1 – 10:1

Fonte: Adaptada de (MARTIN *et al.*, 2006).

Nota: Sendo *WHO (World Health Organization, ou Organização Mundial de Saúde) e **FAO (Food and Agriculture Organization, ou Organização para alimentação e Agricultura).

Para o desenvolvimento adequado do feto, recomenda-se o consumo diário de 200 a 300 mg de DHA, pelas mulheres grávidas. Já para promover a saúde cardiovascular, a ISSFAL (International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, ou Sociedade Internacional de Estudo dos Ácidos Graxos) recomenda a ingestão diária por pessoas adultas, de 500 mg de EPA+DHA. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde), faz a recomendação do uso de 500 mg/dia de EPA (SEGURA, 2012).

Não existe um consenso entre a quantidade exata a ser ingerida de ômega-3 para evitar desordens metabólicas, mas sabe-se que as recomendações diárias são resultados de anos de pesquisas clínicas e epidemiológicas (KITESSA *et al.*, 2014). Na tabela 2.6 encontram-se algumas doses diárias de EPA e DHA recomendadas por agências e órgãos de pesquisa.

Tabela 2.6 – Sugestões de ingestão diária recomendada de EPA e DHA para adultos de várias agências e órgãos de pesquisa.

Grupo	EPA + DHA (mg / dia)
SACN/COT (Reino Unido), 2004	450
National Heart Foundation (Australia), 2008	500
American Dietetic Association and Dieticians of Canada, 2007	500
FAO/WHO Expert Consultation, 2008	250 – 2000 *
American Heart Association: Coronary heart disease sufferers, 2002	1000
Para reduzir os níveis de triacilglicerídeos no sangue	2000 – 4000
National Health and Medical Research Council (Australia)	430 – 610
European Food Safety Authority, 2010	250

Fonte: (KITESSA *et al.*, 2014)

Nota: * Para a prevenção secundária da doença cardíaca coronária.

Uma boa fonte de biodisponibilidade de EPA e DHA são os óleos de peixe refinados, fracionados, ou os glicerídeos parciais. Já os ésteres etílicos tem biodisponibilidade baixa, pois o organismo tem dificuldade em romper a ligação ácido graxo e etanol (SEGURA, 2012).

A fonte mais indicada de ácidos graxos como o EPA e DHA é a ingestão direta de peixes com elevada taxa destes, em seu conteúdo lipídico. Entretanto, o elevado preço dos peixes e frutos do mar e a indisponibilidade destes em algumas regiões do planeta, fazem com que fontes como os suplementos alimentares de PUFAs ganhem popularidade. A indústria têm apresentado esses suplementos ômega-3, 6, e 9 na forma de óleos refinados ou fracionados (winterizados), glicerídeos parciais, e ésteres etílicos de EPA e DHA (SEGURA, 2012).

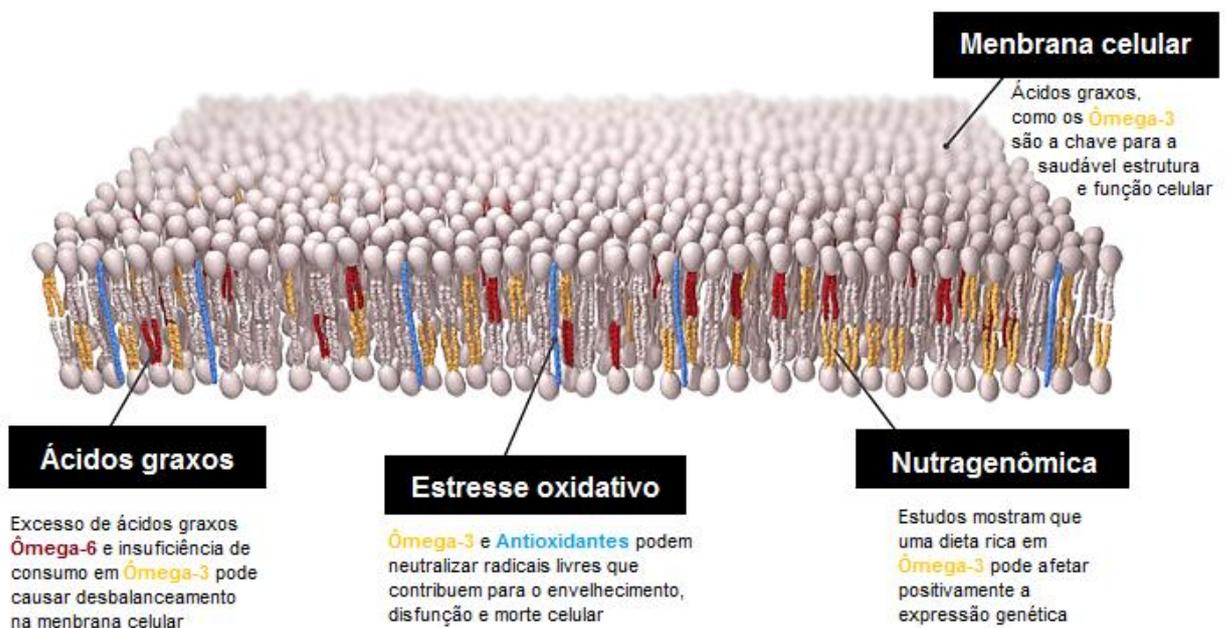
A biodisponibilidade pode ser aumentada no corpo humano, se o horário da ingestão de suplementos de EPA/DHA for em torno das refeições, em vez de em jejum, sendo que a absorção de ácidos graxos é reforçada por enzima pancreática (lipase) e sais biliares (SUMMERTON, 2015).

A ingestão de óleo de peixe aumenta a concentração de ácidos graxos de cadeia longa no sangue humano. Esses ácidos graxos são incorporados aos fosfolípídeos da membrana celular. A dieta correta em ácidos graxos poli-insaturados

e a proporção entre ácidos graxos ômega-6 e 3 afetam o ciclo fosfatidilinositol, responsável pelos processos de divisão celular. A divisão celular, por sua vez, influencia a resposta imune e o crescimento (ou não) de tumores.

Além disso, os ácidos graxos ômega-3 afetam outros processos como a fluidez da membrana; a produção de eicosanóides das séries 3 e 5 (anti-inflamatórios) (SEGURA, 2012); e a produção de citocinas, uma família de proteínas liberadas pelas células envolvidas em processos inflamatórios e imunológicos. Os ácidos graxos poli-insaturados podem ainda interagir com um grupo de proteínas e receptores do DNA, e assim, alterar a transcrição genética (FAO, 2016). Mais detalhes dos efeitos dos PUFA no metabolismo celular são dados nas ilustrações das Figuras 2.7 e 2.8.

Figura 2.7 – Malefícios causados à saúde corpórea pelo excesso no consumo de ácidos graxos ômega-6 e insuficiente ingestão de ômega-3.



Fonte: Adaptada de (FOUGERE, 2013).

Figura 2.8 – Efeitos clínicos benéficos causados pelo consumo de ácidos graxos ômega-3 (EPA e DHA) e combinação entre estes.



Fonte: Adaptada de (SUMMERTON, 2015).

A maioria das marcas de suplementos vendidas no mercado contém entre 300 a 850 mg de EPA+DHA por cápsula. Os suplementos podem ser utilizados por pessoas que não podem consumir a quantidade suficientemente saudável na dieta, ou que desejam suplementá-la. Eles possuem a vantagem de normalmente não possuírem mercúrio, já que esse elemento quando encontrado em peixes é fortemente ligado à fração proteica (MOZAFFARIAN; WU, 2011).

Os fatores de escolha de uma marca de suplemento, entre as várias no mercado, incluem fatores como: a quantidade de EPA+DHA por cápsula; preço; disponibilidade; e sabor (aromatizadas ou não). Esse último fator, o sabor desagradável, pode ser minimizado pela ingestão da cápsula juntamente com refeições, ou pela ingestão de cápsulas congeladas (MOZAFFARIAN; WU, 2011).

2.7 Biodiesel

Assim como os ácidos graxos poli-insaturados apresentam sua importância nutricional, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados parecem ter potencial para outro interessante fim: o de matéria-prima para a produção de biodiesel.

O próprio Rudolf Diesel, criador do primeiro motor a diesel, apresentou oficialmente sua invenção em na Feira Mundial de Paris, utilizando óleo de amendoim como biocombustível. Como um visionário, Rudolf Diesel acreditava que futuramente os óleos vegetais seriam utilizados para produzir combustíveis, como pode-se observar nessa afirmação, datada do período entre 1911 e 1912:

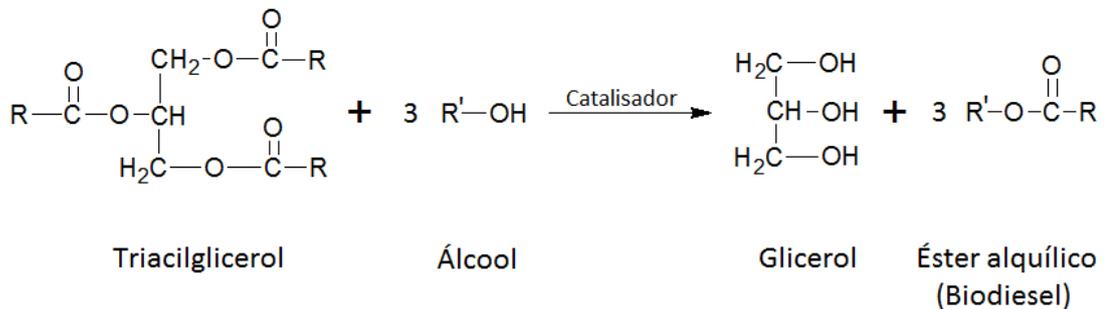
“O motor a diesel pode ser alimentado por óleos vegetais, e ajudará no desenvolvimento agrário dos países que vierem a utiliza-lo. O uso de óleos vegetais como combustível pode parecer insignificante hoje em dia. Mas com o tempo irão se tornar tão importante quanto o petróleo e o carvão são atualmente”. (BIODIESELBR, 2006; RINALDI et al., 2007)

Os primeiros motores tipo diesel eram de injeção indireta, e assim, podiam ser alimentados por petróleo filtrado, óleos vegetais, e até mesmo por óleos de peixe (CÂMARA, 2006). Com o desenvolvimento de motores voltados para uso de combustíveis fósseis, novos biocombustíveis tiveram que ser desenvolvidos.

O biodiesel é um biocombustível obtido a partir da biomassa, e quimicamente pode ser chamado de ésteres alquílicos de ácidos graxos. Geralmente o grupo alquila é um grupo metil (FAME, Fatty Acids Methyl Esters), ao usar metanol em sua produção; ou um grupo etil (FAEE, Fatty Acids Ethyl Esters), quando o etanol é o álcool precursor.

Sua principal via de produção passa por uma reação de transesterificação (Equação 2.2), na qual um óleo ou gordura graxa, na presença de um catalisador (geralmente alcalino) e um álcool, origina ésteres alquílicos de ácidos graxos (KNOTHE, GERPEN e KRAHL, 2005).

Equação 2.2 – Reação de transesterificação alcalina.



Fonte: Adaptada de (KNOTHE, GERPEN e KRAHL, 2005).

Nota: R é a cadeia hidrocarbônica dos ácidos graxos.

A transesterificação pode ser catalisada por ácidos ou bases, todavia a reação é mais rápida quando realizada por bases, tais como hidróxido de sódio ou potássio (SANTOS; PINTO, 2009). Além disso, na transesterificação catalisada por ácidos é preciso utilizar temperaturas mais elevadas (RINALDI *et al.*, 2007).

Na conversão de um mol de triacilglicerídeos (TAG) em três mols de ésteres e um mol de glicerol como coproduto, geralmente é necessário um excesso de álcool. Ao realizar a reação de transesterificação por uma hora, à 60 °C, com catalisador alcalino e condições anidras, pode-se atingir aproximadamente 98% de conversão (DUNN e BAGBY, 1995).

Segundo a premissa de que os triacilgliceróis geralmente se constituem de vários ácidos graxos diferentes, e ainda que, esses ácidos graxos têm distintas propriedades físicas e químicas, então é válido afirmar que o perfil de ácidos graxos é o principal parâmetro que define as principais propriedades dos lipídeos e de seus correspondentes biodieseis (KNOTHE, GERPEN e KRAHL, 2005).

O biodiesel possui vantagens e desvantagens em comparação ao petrodiesel já estabelecido no mercado. Vantagens no que se refere a ser advindo de uma fonte renovável; ser biodegradável; reduzir a maior parte da quantidade de emissão na atmosfera (química verde); ponto de inflamação superior, ou seja, manipulação e armazenamento mais seguros; e ainda, inerente lubricidade. As desvantagens aparecem nos quesito emissão de óxidos de nitrogênio (KNOTHE e DUNN, 2009).

Considerando que aproximadamente 80% do custo de produção do biodiesel é relacionado à matéria-prima graxa – o restante se deve à gastos com mão de obra, insumos de energia, catalisador, etc (LIMA *et al.*, 2010) – seria interessante a utilização de resíduos como óleo de frituras (ALMEIDA *et al.*, 2015; COSTA NETO *et al.*, 2000) ou resíduos da indústria pesqueira (óleo de peixe) (BERY, 2012, CASTRO, 2009, FELTES *et al.*, 2010) para a minimização de custos.

O biodiesel a partir de resíduos de peixe tem potencial como combustível renovável, não-tóxico, e biodegradável. O óleo de peixe, assim como uma matéria graxa vegetal ou animal, pode ser transesterificado à biodiesel, através da adição de um catalisador (geralmente soda cáustica) e um álcool (comumente metanol). Ácidos como o sulfúrico podem ser adicionados em uma etapa anterior à conversão em biodiesel, para a neutralização dos ácidos graxos livres e, conseguinte, redução dos índices de acidez.

Esse processo dá origem a um biodiesel B100 (100% biodiesel) de alta pureza, e ainda gera um coproduto valioso para as indústrias de alimentos, plásticos, farmacêutica, e de cosméticos: a glicerina (MOTA; SILVA; GONÇALVES, 2009; PICCOLO, 2008; FIUZA; MIRANDA; JUNIOR, 2014; PALOMINO-ROMERO *et al.*, 2012).

2.8 Óleo de Peixe e Farinha de Pescado

Considerando que mais de 50% do peso dos peixes não é utilizado como alimento, gerando em torno de 30 milhões de toneladas de resíduo por ano (SEGURA, 2012), algumas alternativas devem ser utilizadas para a disposição e utilização desses possíveis contaminantes ambientais.

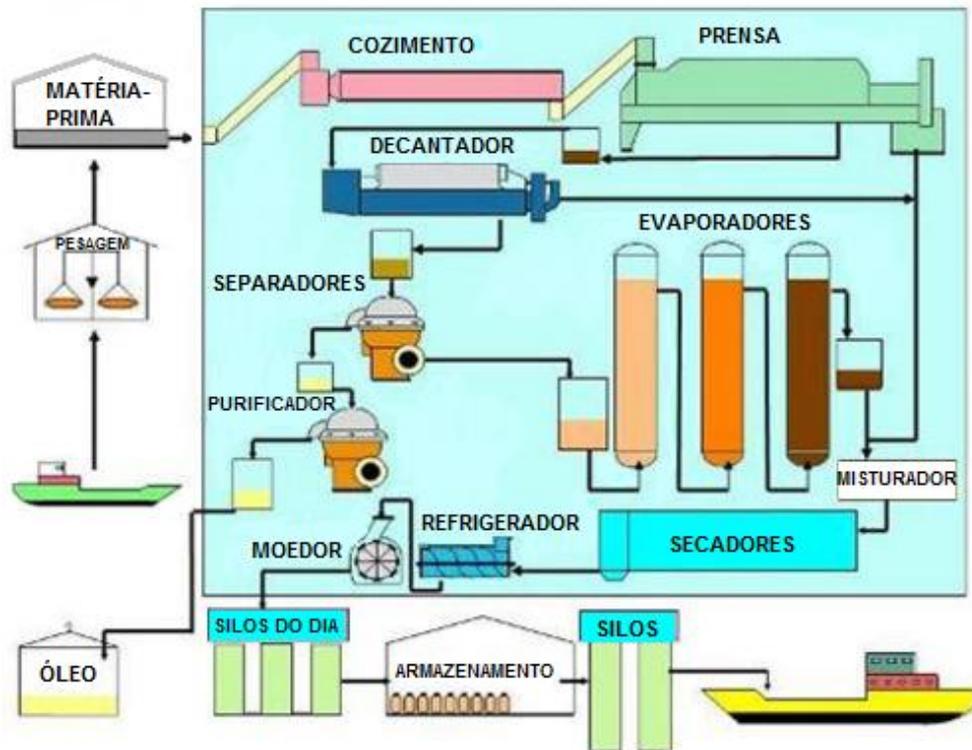
A farinha de pescado ou farinha de peixe, por exemplo, é um dos subprodutos do aproveitamento de resíduos no processamento de pescado, e vem sendo utilizada como alimentação animal em razão do seu conteúdo em proteína bruta, que gira em torno de 64% a 67% (MORAIS e SILVA, 2001). Ela não contém carboidratos, e pode apresentar até 12% de lipídeos, caso o resíduo de pescado não tenha sido submetido à extração de óleo de peixe (IFFO, 2011). Entretanto, tal farinha é normalmente obtida concomitantemente à produção de óleo de peixe (Figura 2.9).

O método tradicional de obtenção do óleo de peixe envolve o cozimento dos peixes ou resíduos de peixes ainda em bom estado (não deteriorados), na temperatura de cerca de 110 °C à 120 °C (MURGEL, 2010); embora a IFFO (The Marine Ingredients Organisation ou Organização dos Ingredientes Marinhos), utilize a temperatura de 85 °C à 90 °C (IFFO, 2011). Esse cozimento é responsável por coagular as proteínas e pela mortandade de micro-organismos que possam estar presentes (IFFO, 2011).

O material resultante do cozimento passa em seguida por uma prensa de parafuso, chamada prensa expeller, que pressiona o material em um cilindro perfurado. Durante a prensagem, o licor composto basicamente por óleo e água é retirado, e passa por decantação ou filtração em tela fina para retirar sólidos que ainda estejam presentes (MURGEL, 2010).

O licor de prensa é então centrifugado para separar o óleo da fase aquosa, sendo que a fase aquosa passa por secagem por bobinas com ar aquecido a 90 °C. O material sólido é igualmente direcionado à secagem. A matéria resultante da secagem origina a farinha de peixe, com teor de matéria seca de 90%, o que inibe o crescimento microbiano. O óleo de peixe pode ser então purificado através de filtros especiais.

Figura 2.9 – Processamento de peixes para obtenção de óleo e farinha de pescado.



Fonte: Adaptada de (IFFO,2011).

Em alguns países como o Brasil, o óleo bruto de peixe é usado em curtumes, na fabricação de tintas e vernizes, impermeabilizantes, lubrificantes, e outros. Um refino sofisticado via degomagem, neutralização, branqueamento, e desodorização (MOHANARANGAN, 2012; MORAIS *et al.*, 2001), pode ser realizado caso a intenção seja produzir um óleo claro e inodoro para utilização nutracêutica (IFFO, 2011).

As espécies de peixes e seres aquáticos mais utilizados para obtenção dos óleos e farinhas de peixe são as espécies pelágicas, de menor uso na alimentação humana, como: arenque; sardinhas; sável; anchovas; salmão; atum; cavala; capelim; fígado de bacalhau; e alguns tipos de tubarões (SEGURA, 2012).

Outras alternativas de aproveitamento dos resíduos do pescado que vem sendo pesquisadas são as silagens ácidas químicas e enzimáticas para alimentação animal, biodiesel, e a obtenção de hidrolisados proteicos, ou colágeno (BENITES; SOUZA-SOARES, 2010; BERY, 2012; PADILHA, M. E. D. S.; AUGUSTO-RUIZ, 2007; PITTIGLIANI, 2014).

2.9 Métodos de Concentração de Ácidos Graxos Poli-insaturados

2.9.1 *Obtenção de ácidos graxos*

Em 1993, ao pesquisar a distribuição posicional dos ácidos graxos nos triacilgliceróis do óleo do fruto da palma, maiores quantidades de ácidos graxos saturados esterificados foram encontradas nas posições sn-1,3; enquanto que, maiores teores de ácidos graxos insaturados foram encontrados na posição sn-2 dos triacilgliceróis. Durante a fase ativa da síntese dos triacilgliceróis, foram observados índices mais elevados de incorporação de ácido palmítico nas posições 1 e 3, enquanto que o ácido oléico exibiu tendência contrária (GEORGE; ARUMUGHAN, 1993).

Desta forma, assumindo uma distribuição randômica dos ácidos graxos, nos principais triacilgliceróis contendo ácidos graxos poli-insaturados, é grande a probabilidade de haver a presença de ácidos graxos saturados e/ou monoinsaturados. Formando assim, triacilgliceróis de alta similaridade em termos de propriedade físico-químicas, tal como deve ocorrer, por exemplo, para o 1,2-dipalmitato-3-docosahexadecanoato de glicerila (PDHAP) e 1-oleato, 2-eicosapentadecanoato, 3-erucicato de glicerila (OEPAEr) (ANTONIOSI-FILHO, 1995). Isso significa que o fracionamento desses triacilgliceróis para isolamento de frações mais insaturadas é de difícil realização.

Na prática, tal situação já foi observada por Wanasundara em 1996, mas não explicada (WANASUNDARA, UDAYA N., 1996). Wanasundara relata que o enriquecimento em ácidos graxos, como o EPA e DHA, bem como o rendimento, foram consideravelmente mais elevados sob a forma de ácidos graxos livres do que sob a forma de triacilgliceróis. Isso justifica a realização do procedimento de conversão dos triacilgliceróis de óleo de peixe em ácidos graxos livres, visando o fracionamento de seus ácidos graxos pelo grau de insaturação.

2.9.2 Hidrólise química

A obtenção de ácidos graxos livres, a partir de óleos ou gorduras submetidos à hidrólise química, envolve basicamente as reações de saponificação e posterior acidificação. O processo de saponificação foi descoberto e descrito em detalhes por Chevreul em 1823 (CHEVREUL, 1823).

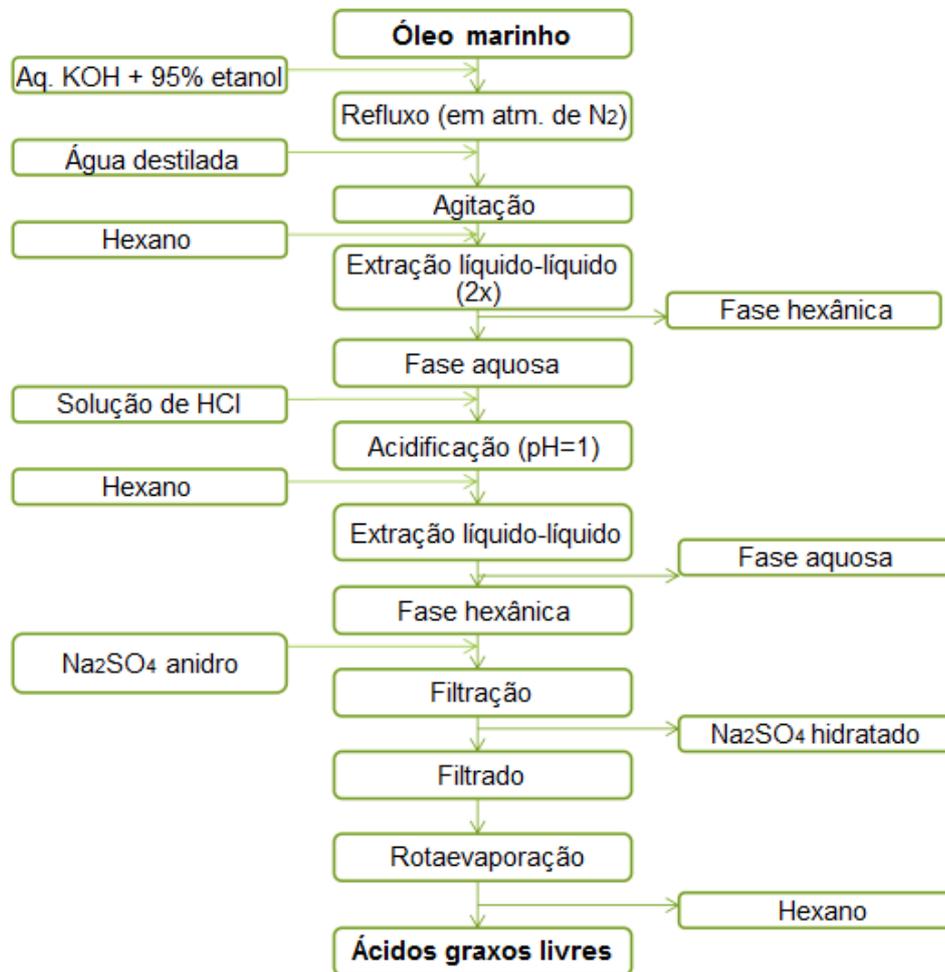
Em 1956, Hilditch propôs que para a maioria das gorduras, pode-se executar a saponificação de 100 partes em peso de gordura, com uma solução de 30 partes de KOH em 500 partes de etanol 95%, em ebulição sob refluxo durante 3 horas, seguido pela remoção da maior parte do álcool por destilação (CYBERLIPID, 2016a, b).

Em seu destacado artigo, Wanadsundara e Shahidi (1999), propõem a hidrólise alcalina feita com solução etanólica de KOH, remoção da matéria insaponificável com hexano, acidificação da fase aquosa com HCl, separação da solução de FFA com hexano, secagem com Na₂SO₄, e recuperação dos FFA por rotaevaporação (Figura 2.10) (WANASUNDARA, UDAYA N.; SHAHIDI, 1999).

Mas enquanto a presença de etanol favorece a reação de transesterificação, a saponificação (hidrólise dos triacilglicerídeos) é favorecida pela presença de água no meio reacional (SANTOS; PINTO, 2009). Esse fato é uma indicação que a água talvez seja melhor componente no meio reacional da saponificação que o álcool.

A água, especialmente a temperaturas mais elevadas, hidrolisa os ésteres de ácidos graxos (triacilgliceróis e/ou biodiesel), formando ácidos carboxílicos que são neutralizados pelo catalisador básico, formando sais de ácidos graxos (sabões) (RINALDI *et al.*, 2007). Ao saponificar óleos e gorduras, forma-se sabão e glicerol; já quando a reação acontece com ácidos graxos livres, há apenas a formação de sabão.

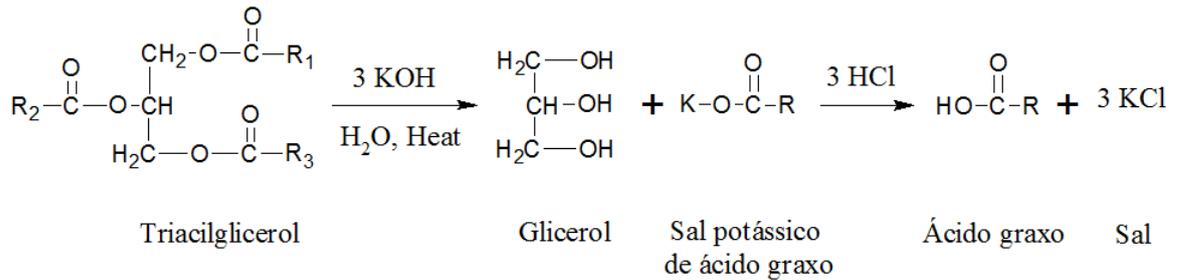
Figura 2.10 – Esquema da obtenção de ácidos graxos livres (Free fatty acids, FFA) por Wanasundara e Shahidi.



Fonte: Adaptada de (MOHANARANGAN, 2012).

A Equação 2.3 é um exemplo de hidrólise de triacilgliceróis utilizando sal de potássio e aquecimento como catalisadores, e ácido clorídrico na etapa de recuperação dos ácidos graxos livres.

Equação 2.3 – Reação de hidrólise de triacilgliceróis em óleos gerando ácidos graxos livres como produto final de interesse.



Fonte: (Adaptada de SALIMON, ABDULLAH e SALIH, 2011).

Nota: Sendo R= R₁, R₂, R₃ e representando as diferentes cadeias de ácidos graxos presentes nos óleos.

Um meio reacional contendo quantidades significativas em água (maiores que 5% em massa) e temperaturas mais elevadas (maiores que 60 °C), interrompe a agregação das gotas de óleo e favorece a redução na viscosidade da emulsão, formando uma maior área superficial entre os substratos da reação, e obtendo maiores rendimentos em ácidos graxos livres (TRENTINI, RASPE e SILVA, 2014).

Os produtos da reação de hidrólise, ácidos graxos e glicerol, são importante matéria base para indústria oleoquímica, gerando alimentos, sabões, detergentes, cosméticos, fármacos, e outros (SALIMON, ABDULLAH e SALIH, 2011).

2.9.3 Primeiras tentativas históricas de fracionamento de ácidos graxos livres: Diferenças de solubilidade dos sais de ácidos graxos

Em 1828 foi relatado o primeiro processo de separação de ácidos graxos por Gusserow (GUESSEROW, 1828), preparando primeiramente uma mistura de sais de chumbo em grandes quantidades de éter etílico, para separar os sais dos ácidos graxos saturados (saturated fatty acids, SFA) (menos solúveis) dos sais dos ácidos graxos insaturados (unsaturated fatty acids, UFA) (mais solúveis).

Os fatores que determinam as diferentes solubilidades são o comprimento da cadeia, o grau de insaturação dos ácidos graxos e a natureza do íon metálico. Apesar de sua eficiência, este método dependia de grandes quantidades de solvente, uso de um elemento altamente tóxico como o chumbo, e uma etapa de preparação de sais de ácidos graxos; não se mostrando assim, comercialmente interessante (ZILCH, 1979).

As informações sobre os ácidos graxos ainda eram escassas e incompletas, como pode ser visto em um estudo de 1921 sobre ácidos graxos presentes em óleos de peixe. Este estudo visava demonstrar a presença de UFA através do método de esterificação e fracionamento com pressão reduzida, ou através da saponificação com chumbo e bário, e fracionamento por “desbromação” e cristalização em baixas temperaturas (BROWN, 1921).

Em 1921, Twitchell substituiu o éter etílico por etanol, mas ainda assim não foi possível obter uma separação nítida. Tal método é aplicável somente para SFA de cadeias maiores que C14 e UFA de cadeias menores que C18, ou seja, poderia ser usado para somente algumas oleaginosas mas não para palma, óleos contendo ligações insaturadas *trans*, óleos poli-insaturados, etc (TWITCHELL, 1931).

Em um trabalho sobre a concentração de EPA e DHA de óleo de peixe por diferença de solubilidade de sais de ácidos graxos de sódio em etanol, Han et al (1987) afirma que na composição em ácidos graxos do óleo de sardinha (lipídeo altamente insaturado), o grau de insaturação é um fator mais importante que o tamanho da cadeia carbônica (HAN; AHN; SHIN, 1987).

2.9.4 Métodos comerciais clássicos de separação

Os processos comerciais clássicos de separação de ácidos graxos são: a compressão e descompressão; o processo Solexol; o processo Emersol; o processo Armour-Texaco; e o processo Henkel.

No processo de compressão e descompressão, a separação em ácidos graxos saturados e insaturados acontece colocando a matéria-graxa previamente fundida, em recipientes retangulares de alumínio, e solidificando lentamente à temperatura final de 4,5 à 7,2 °C por 12 a 20 horas. Os bolos solidificados formados nos recipientes são retirados e prensados em prensas hidráulicas sob pressões de 10,6 à 17,6 bar. Esse processo possui alto custo de manutenção e refrigeração e foi usado para obtenção de frações de ácido oléico e esteárico (GREENFIELD, 1959).

O processo Solexol consiste na extração em contracorrente de óleos e gorduras de origem vegetal e animal, utilizando-se propano líquido como solvente em temperatura de aproximadamente 65,6 °C; inferior a temperatura crítica do propano, de 96,7 °C, para haver solubilização do óleo no solvente. No processamento do óleo de sardinha, esse processo separa frações de cor, concentrado de vitamina A e D, e frações com menor índice de iodo que o óleo bruto (PASSINO, 1949).

Em 1942, entra em funcionamento a primeira unidade em escala comercial do processo conhecido como Emersol. O princípio da técnica é a cristalização controlada de ácidos graxos em um solvente polar e posterior remoção dos ácidos graxos sólidos por filtração (AULT, 1954; KISTLER; MUCKERHEIDE; MYERS, 1946).

No Processo Emersol uma mistura entre ácidos graxos e metanol é continuamente bombeada para um cristalizador de múltiplos reatores equipado com lâminas de raspagem resfriando a -10 °C. Um filtro rotativo contínuo separa a fração cristalina com o ponto de fusão mais elevado, da fração de inferior ponto de fusão.

O bolo de filtração é derretido e destilado rapidamente para remover o metanol e recuperar o ácido graxo de ponto de fusão mais alto (ácido esteárico). Do mesmo modo, a outra parte também é destilada para obter o ácido graxo de ponto de fusão mais baixo (ácido oléico) (KISTLER; MUCKERHEIDE; MYERS, 1946). O

Armour-Texaco é similar ao processo Emersol, usando acetona como solvente, separando em frações ricas em ácido esteárico ou oléico (GEE, 1948).

O processo Henkel utiliza o resfriamento controlado da mistura de ácidos graxos de gorduras para formar uma suspensão de ácidos graxos saturados, na forma de cristais; e ácidos insaturados, na forma líquida. Essa suspensão entra em um misturador onde é adicionado um agente surfactante como o lauril sulfato de sódio, seguido pela adição de uma solução aquosa de um eletrólito tal como sulfato de magnésio.

A dispersão é centrifugada e gera uma fração mais leve, rica em ácidos graxos insaturados; e uma fração aquosa mais densa, rica em ácidos graxos saturados. Essas frações são separadas, aquecidas, e lavadas; dando origem a concentrados de ácido oléico e esteárico, respectivamente (HARTMAN, H.; STEIN, 1973; STEIN, 1968).

Como se pode observar, esses métodos comerciais clássicos de separação focam na recuperação dos ácidos esteárico e oléico, e não na obtenção de ácidos graxos de alto valor como os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA).

2.9.5 Técnicas de fracionamento de ácidos graxos

Dentre os métodos alternativos existentes de isolamento e concentração de ácidos graxos estão: a cromatografia; a destilação fracionada; a partição enzimática; a cristalização a baixa temperatura; a extração por fluido supercrítico; e a complexação com uréia.

2.9.5.1 Método cromatográfico

O método cromatográfico possibilita a separação de ácidos graxos ou seus ésteres, tendo como parâmetros o número de carbonos destes, e o grau de insaturação que os acompanham (BROWN; KOLB, 1955b). Pela cromatografia, a obtenção com alta pureza de ácidos graxos individuais é possível. Isso, através de adequadas fases estacionárias e adsorventes.

A escolha da fase móvel é determinante na resolução obtida nesse tipo de separação. Deve ser levada em consideração a toxicidade, mas também a competição entre a amostra e o solvente da fase móvel pelos sítios de ligação da fase estacionária.

Por exemplo, na cromatografia com íons de prata - denominada argentação - um solvente como o etanol, que é uma boa escolha para indústria alimentícia em se tratando da toxicidade, se torna uma má escolha pois tende a competir fortemente pelos sítios de ligação da prata (DILLON *et al.*, 2013).

Entretanto, nesse método a pureza do produto final depende das condições brandas durante a separação, e ésteres metílicos são preferidos à ácidos graxos livres. Dentre as técnicas de cromatografia gás-líquido, cromatografia líquida e cromatografia de partição centrífuga; a cromatografia líquida é a mais aplicável em escala preparativa e industrial (WANASUNDARA, UDAYA N; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

As escolhas recorrentes das condições cromatográficas para concentração de poli-insaturados ômega-3 são: a cromatografia líquida de alta performance (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), geralmente em fase reversa; a cromatografia de argentação (com o uso de íons prata na fase móvel); e mais

recente, a associação entre estas técnicas, a cromatografia líquida de alta performance de íons de prata (Silver Ion High Performance Liquid Chromatography).

Essa associação entre as técnicas foi necessária pois as amostras reais contém inúmeros componentes que são de difícil separação, em vista da natureza dual na separação de lipídeos (comprimento da cadeia e grau de insaturação). O principal problema da cromatografia líquida de alta performance de íons de prata é a estabilidade do sistema, reprodutibilidade, e tempo de vida curto da coluna (NIKOLOVA-DAMYANOVA, 2009).

Um recente trabalho sobre a separação de ésteres metílicos a partir de óleo de sardinha, concentrou ésteres metílicos de ácidos graxos poli-insaturados C20-22 n-3, com 86% de pureza e recuperação superior à 30% por cromatografia de argentação (CHAKRABORTY; JOSEPH; JOSEPH, 2016).

Também pode haver a associação entre técnicas de separação, utilizando a hidrólise do óleo de sardinha, a complexação com uréia (temperatura de cristalização de 4 °C na cristalização e proporção 4:1 uréia:ácido graxo), e posterior purificação por cromatografia de argentação com fase móvel éter dietílico:n-hexano (50:50 v/v). Obtem-se ao final ácido eicosapentaenoico (EPA) com pureza de 99,6% e com 54% de recuperação (CHAKRABORTY; RAJ, 2007).

Além do óleo de peixe, outra matéria-prima explorada na obtenção desses concentrados ômega-3 são as microalgas (BELARBI; MOLINA; CHISTI, 2000).

2.9.5.2 Extração com fluido supercrítico

Atualmente, a técnica de extração com fluido supercrítico é considerada como a técnica que poderá vir a substituir os processos tradicionais de extração de óleo, como a destilação a vapor ou extração com solvente, obtendo um óleo de peixe de qualidade e com alto rendimento (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010). Nesta técnica, a separação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) depende do tamanho molecular dos componentes em vez de seu grau de insaturação (SHAHIDI, F; WANASUNDARA, 1998).

Dentre os parâmetros que interferem no processo, os que parecem ser determinantes são: a pressão e temperatura do fluido supercrítico; e o tempo de extração (HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014). O fluido supercrítico é uma

substância que está na (ou acima) da temperatura e pressão críticas. Neste ponto, não há mais distinção entre as fases líquidas e gasosas. O fluido geralmente utilizado é o CO₂, por ser considerado seguro (não inflamável), de baixo custo, inerte, ambientalmente aceitável, e de temperatura e pressão críticas moderadas (304,15 K ou 31 °C e 7,38 MPa ou 73,8 bar) (SHAHIDI, F; WANASUNDARA, 1998).

A solubilidade do óleo de peixe no CO₂ aumenta conforme níveis mais elevados de temperatura e pressão são atingidos. Isso acontece, porque nessas condições a densidade do fluido aumenta, diminuindo os espaços entre as moléculas de fluido supercrítico e óleo. Assim, no trabalho de Sahari e colaboradores (HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014), o maior rendimento na extração foi obtido a 60 °C e 350 bar.

Nessas condições, a maior parte do óleo extraído (cerca de 70%) é composto de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, principalmente os de cadeia carbônica curta (HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014). Assim sendo, a fração não extraída se torna enriquecida em PUFA.

A principal desvantagem da extração por fluido supercrítico é o custo de produção elevado, tanto para obtenção do equipamento de alta pressão (MOHANARANGAN, 2012), tanto pelo congelamento a seco (liofilização) que deve ser executado como uma etapa de pré-tratamento para reduzir a umidade da matéria-prima a valores menores que 20% (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008).

Além disso, existem limitações para aumentar a escala de produção de pesquisa para industrial. Essas limitações são relativas ao conhecimento sobre o comportamento de fase das misturas envolvidas no processo de extração com fluido supercrítico, e o desenvolvimento de modelos que descrevam esse comportamento (RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010).

Dentre outros métodos descritos usando SFE, Espinosa e colaboradores propuseram um método utilizando três colunas de fracionamento e sistema contra-corrente de alta pressão (ESPINOSA; DIAZ; BRIGNOLE, 2002). Através desse método, foram obtidas frações de EPA com uma pureza de 60,46 mol% e um rendimento de 98,18%; e de DHA com uma pureza de 80,09 mol% e um rendimento de 80,34%. Adicionalmente, uma etapa prévia de complexação com uréia foi sugerida para aumentar a pureza do produto final.

Recentemente, um trabalho sobre a otimização das condições de fracionamento de ésteres etílicos de ácidos graxos, obtidos a partir de subprodutos da comercialização de peixes, foi otimizado em termos de custo do processo (FIORI; MANFRINI; CASTELLO, 2014). As melhores condições operacionais foram estimadas como sendo: temperatura da coluna de fracionamento de 80 °C; pressão de 19,5 Mpa; razão de refluxo de 0,92; e razão de alimentação de solvente de 63. Nessas condições, o custo do processo foi de 2,3 €/Kg de concentrado ômega-3 (85% em peso de C20 e C22). Ao projetar a planta para capacidades de 10, 100, e 300 kg/h o custo fica entre 2 a 15 €/Kg de concentrado ômega-3.

2.9.5.3 Métodos enzimáticos

O uso de enzimas tem ganhado popularidade no meio acadêmico e industrial, ao catalisar reações de esterificação e hidrólise (MARANGONI; ROUSSEAU, 1995). Esse processo biológico depende dos substratos e lipases utilizadas, tendendo a ocorrer sob condições brandas para não ocorrer a desnaturação das enzimas.

Isso se reflete em custos operacionais mais baixos que os processos químicos para manter as temperatura e pH do meio nos reatores. Entretanto, para que o processo seja economicamente viável, as lipases devem ser estáveis e capazes de efetuar sucessivas catálises (VALVERDE *et al.*, 2013).

Algumas enzimas podem concentrar ácidos graxos insaturados de interesse, tais como DHA e EPA, pois agem especificamente na hidrólise de SFA e MUFA e não conseguem hidrolisar os PUFA de cadeia longa. Foi reportado através de trabalhos com enzima pancreática, que a causa de tal especificidade advém das 5 ou 6 duplas ligações presentes nos ácidos resistentes a ação da enzima, que dobram a cadeia carbônica e colocam o grupo metila terminal próximo a carboxila, causando impedimento estérico (BOTTINO; VANDENBURG; REISER, 1967).

Na hidrólise do óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) com enzima pancreática porcina, foram produzidas frações de monoacilgliceróis, diacilgliceróis, e triacilgliceróis. Na fração dos triacilgliceróis, verificou-se um aumento de 46,14% e 40,23% de ácido araquidônico (AA) e eicosapentaenóico (EPA), respectivamente, enquanto que na fração monoacilglicerol houve um acréscimo de 96,96% e 52,55% de DPA e DHA (PADILHA, M. E. D. S.; AUGUSTO-RUIZ, 2007).

Na concentração de PUFA em óleos marinhos, diversas lipases podem ser utilizadas, tais como: *Alcaligenes sp.*; *Aspergillus oryzae*; *Bacillus licheniformis*; *Mucor miehei* (Lipozyme); *Lipase vegetal de nabo*; *Candida cylindracea* (rugosa); *Candida antarctica*; *Chromobacterium viscosum*; *Aspergillus niger*; *Aspergillus oryzae*; *Chromobacterium viscosum*; *Fusarium heterosporum*; *Geotrichum candidum*; *Lipozyme IM*; *Penicillium cyclopium*; *Porcine pâncreas*; *Rhizopus arrizus*; *Rhizopus delemar*; *Rhizopus oryzae*; *Rhizomucor miehei*; *Pseudomonas fluorescens*; e *Pseudomonas sp.*

Algumas lipases obtêm melhores resultados em reações com determinados tipos de substrato. Como exemplo, nas hidrólises de óleo do peixe savelha (*Alosa fallax*) e gordura de foca, houve um acréscimo de ω 3-PUFA nas frações não hidrolisadas de 20,2% e 30,1% (respectivamente) para 40,2% e 40,9%, utilizando a enzima *Candida cylindracea* por 12 h. Entretanto, ao utilizar a enzima *Aspergillus niger* em mesmas condições, os resultados obtidos pouco diferem das concentrações iniciais, chegando a 20,8% e 30,3% (WANASUNDARA, UDAYA N., 1996).

Além disso, o enriquecimento em PUFAS pode ser conseguido associando a técnica enzimática a outras técnicas como, por exemplo, a complexação com uréia, ou a cristalização com solventes (CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2008; GÁMEZ-MEZA *et al.*, 2003; SCHMITT-ROZIERES; DEYRIS; COMEAU, 2000).

Alguns pesquisadores também acreditam que ao associar as condições suaves características da técnica enzimática, com um sistema de filtração em membrana e livre de solvente, obtém-se um processo competitivo economicamente com outras técnicas tais como: destilação; extração com fluido supercrítico; complexação com uréia; entre outras (LINDER; FANNI; PARMENTIER, 2005; XU *et al.*, 2000).

O uso de enzimas é delicado e várias condições podem afetar sua atividade. Dentre os parâmetros que podem ser investigados estão: o volume de água adicionado (que deve ser moderado, pois uma pequena quantidade é necessária para manter a atividade e estrutura da enzima, mas grandes quantidades deslocam o equilíbrio em função da hidrólise e não favorece a esterificação); o volume e tipo de solvente orgânico (que são necessários para a solubilização de componentes hidrofóbicos da reação presentes principalmente no substrato, mas podem alterar a

especificidade do substrato e a afinidade enzimática); a concentração da enzima; e uso de glicerol.

Na literatura, já pode ser encontrado na hidrólise de óleo de peixe, o uso de enzima imobilizada em sílica funcionalizada, que torna possível a discriminação entre EPA e DHA, em favor do EPA, e promove uma melhor reutilização da enzima (MOHAMMADI *et al.*, 2014). Isso indica um novo fator a ser observado nessa técnica enzimática: o modo de imobilização da enzima escolhida (BARBOSA *et al.*, 2013).

2.9.5.4 Complexação com uréia

O fenômeno de complexação da uréia com os ácidos graxos de cadeias alifáticas lineares foi descoberto e descrito primeiramente por Bengen em 1940 (BENGEN; HOLMAN, 1950). A descoberta acidental aconteceu enquanto ele estudava sobre o leite. Ele estudou a preparação de complexos de cadeias lineares de hidrocarbonetos, ácidos, ésteres, álcoois, aldeídos e cetonas. Mais tarde, outros trabalhos como o de Schlenk descreveram a utilização da técnica com outros tipos de compostos de cadeia linear (SCHLENK; HOLMAN, 1950).

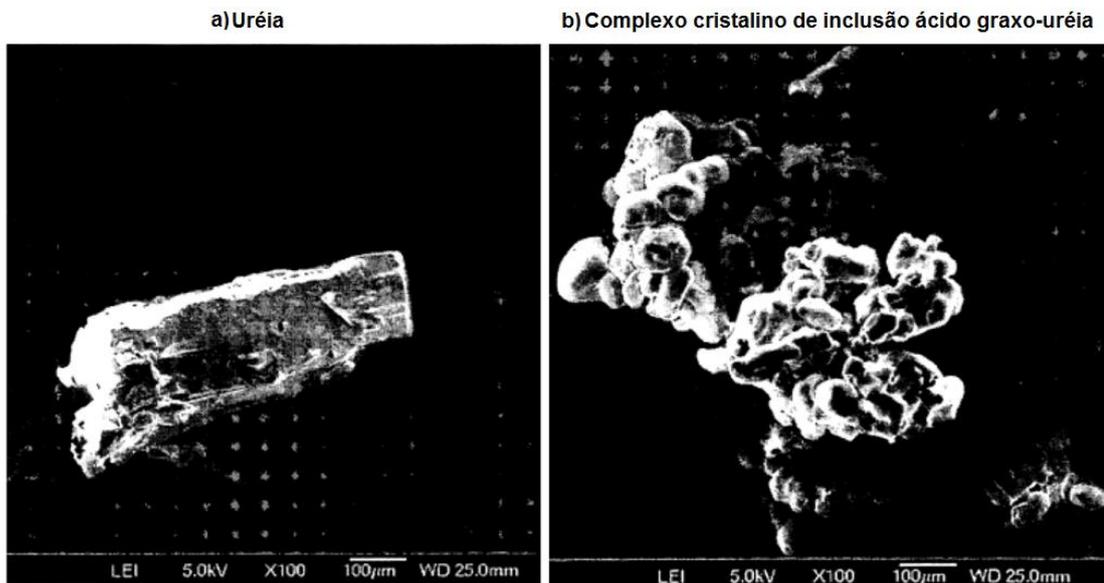
A uréia é um composto orgânico, em forma de cristais brancos, solúvel em água (1080 g/L a 20 °C), com ponto de fusão de 133 °C, de fórmula molecular $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$, e que pode gerar compostos de inclusão ao entorno de cadeias carbônicas lineares e pouco ramificadas (KISTLER; MUCKERHEIDE; MYERS, 1946). Isso porque as moléculas de uréia se arranjam através de ligações de hidrogênio que formam túneis paralelos e lineares de diâmetro mínimo de 5,5 Å a 5,8 Å.

Embora a uréia cristalize em uma estrutura tetragonal, seus compostos de inclusão apresentam uma estrutura hexagonal, e podem ser destruídos por simples adição de água (SUNG; LEE, 2006). Em razão de suas características, a uréia é utilizada para promover a concentração de PUFAs.

Isso porque ela forma adutos contendo ácidos graxos saturados (Figura 2.12). Já os ácidos graxos insaturados, contendo várias duplas, não possuem a simetria necessária para a formação de adutos porque a presença de duplas aumenta o volume das moléculas. Assim, os ácidos graxos insaturados permanecem presentes

em solução (MAROTTA; AQUINO NETO; AZEVEDO, 2014; NGUYEN; FOWLER; LAUHER, 2001).

Figura 2.11 – Imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura da complexação com uréia para a concentração de ácidos graxos poli-insaturados.



Fonte: Adaptada de (SUNG; LEE, 2006).

Nota: a) uréia, e b) aduto formado entre a uréia e o ácido graxo.

Até agora, a complexação com uréia parece ser a mais simples e eficiente técnica para obter concentrados de PUFA's; e promover a separação desses, dos ácidos graxos saturados e monoinsaturados, proveniente da matéria-prima em forma de ácidos graxos livres (CREXI, VALÉRIA T. *et al.*, 2012; SHAHIDI, F; WANASUNDARA, 1998). Antes da complexação, os FFA são obtidos a partir da matéria-prima por saponificação com solução alcóolica de KOH ou NaOH.

A separação da matéria insaponificável (contendo esteróis, vitaminas A, D, E, e outros) é promovida por processo de partição com solvente orgânico, e a fase contendo FFA é misturada com solução alcóolica de uréia.

A cristalização promove a formação dos cristais de aduto, separados por filtração ou centrifugação da mistura, e posteriormente os ácidos graxos insaturados e saturados podem ser recuperados por lavagem com água, acidificação, e adição de solvente orgânico como o hexano.

As variáveis mais influentes que afetam o grau de concentração de PUFA são: a proporção de uréia e ácidos graxos; o tempo; e a temperatura de cristalização. Geralmente, as melhores condições para obtenção de concentrados PUFA estão relacionadas com uma maior relação uréia/ácido graxo, menores temperaturas, e tempo de cristalização variados (Tabela 2.7). Os solventes de cristalização preferidos são metanol e etanol, embora já tenha sido descrito a utilização de água como solvente.

Tabela 2.7 – Exemplos de variáveis experimentais relatadas em trabalhos que utilizam a técnica de complexação com uréia.

Temperatura	Tempo de cristalização	Relação uréia/ácido graxo	Referência
- 20 °C	6 h	4/1 m/m	(THAMMAPAT; SIRIAMORNUN; RAVIYAN, 2016)
- 10 °C	*	10% m/v	(HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014)
- 12 °C	14 h	6/1 m/m	(PAIM <i>et al.</i> , 2012)
- 10 °C	20 h	4,5/1 m/m	(CREXI, VALÉRIA T. <i>et al.</i> , 2012)
20 °C	20 h	4:1 m/m	(WANADSUNDARA; PETERSON, 2011)
1 °C	24 h	2,5/1 m/m _{óleo}	(TALAB <i>et al.</i> , 2010)
-18°C (winterização)/8°C	12 h	3,5/1 m/m	(MENDES; DA SILVA; REIS, 2007)
- 5 °C	20 h	15 mol/mol	(LIU <i>et al.</i> , 2006)
-10 °C	24 h	4,5/1 m/m	(WANASUNDARA, UDAYA N.; SHAHIDI, 1999)
1 °C	24 h	3/1 m/m	(RATNAYAKE <i>et al.</i> , 1988)

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: São descritas as melhores condições encontradas pelos autores, envolvendo temperatura, tempo de cristalização, e relação utilizada entre uréia e ácido graxo livre. *não é descrito.

A principal vantagem da complexação com uréia é a formação de cristais estáveis, não sendo necessárias temperaturas tão baixas como as utilizadas na técnica de cristalização a baixas temperaturas, embora as duas técnicas também possam ser utilizadas em conjunto (PATIL; NAG, 2011).

Essa técnica detém um potencial industrial interessante, pois a uréia é um composto abundante, barato, e de baixa toxicidade (ZIMMERSCHIED *et al.*, 1950). Entretanto, possui a desvantagem de baixa recuperação de PUFA, como o EPA, pois tendem a formar adutos com a uréia (ESTIASIH; AHMADI; NISA, 2013; HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014; ROBLES MEDINA *et al.*, 1998) especialmente à baixas temperaturas (TALAB *et al.*, 2010).

2.9.5.5 *Cristalização à baixas temperaturas com o uso de solventes*

O fracionamento por cristalização envolve a separação de uma mistura de ácidos graxos ou triacilgliceróis, através dos pontos de fusão dos componentes (BROWN; KOLB, 1955). Os fatores que interferem no sucesso da cristalização são: a taxa de resfriamento, o tempo empregado, e a intensidade da agitação (INSUMOS, 2015).

Existem dois tipos de fracionamento por cristalização: fracionamento a seco conhecido como cristalização a baixas temperaturas e o fracionamento utilizando solventes orgânicos, conhecido como cristalização com solventes. Nesse último, um fator a ser considerado é a interação entre ácidos graxos e solvente.

Geralmente a cristalização a baixas temperaturas é feita em múltiplos estágios, depende de temperaturas altamente negativas, e necessita de longos períodos de tempo na cristalização; enquanto que a cristalização com solventes, tende a ser em um só estágio, existe o gasto com solventes, mas estes podem ser em parte recuperados (BIST; TAO; MOHTAR, 2009).

Na cristalização por solventes, um líquido puro ou uma mistura de solventes é adicionada à mistura de ácidos graxos, que é posteriormente cristalizada e fracionada por filtração. Em 1937, Brown e Stoner (BROWN; STONER, 1937) obtiveram um concentrado de ácido linoléico em óleo de semente de algodão utilizando solução aquosa com 10% de acetona à -20 °C; e Brown e Shinowara (SHINOWARA; BROWN, 1937) obtiveram um concentrado de ácido oléico em azeite através de múltiplas cristalizações em acetona à temperaturas de -20 °C a -60 °C .

A formação de ácidos graxos livres para posterior cristalização com solventes tem vantagens sobre a winterização (cristalização de triacilgliceróis em óleos) no enriquecimento em ácidos PUFA, pois os ácidos graxos livres são mais solúveis em

diferentes solventes. Em contrapartida, a winterização pode ser feita com menor número de etapas.

Em 1996, Wanasundara relatou que o enriquecimento em ácidos graxos como o EPA e DHA, bem como o rendimento, foram consideravelmente mais elevados sob a forma de ácidos graxos livres do que sob a forma de triacilgliceróis (WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, 1996).

Posteriormente, Wanasundara e colaboradores relatam uma versão adaptada de seus resultados em que comparam a utilização da acetona e do hexano como solvente no fracionamento de PUFA (Tabela 2.8) (WANASUNDARA, UDAYA N; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005). Usando como matéria-prima, ácidos graxos livres de óleo de gordura de foca, e como solvente hexano, o teor de ácidos graxos totais ômega-3 foi de 58,3% e 66,7%, a -60 °C e -70 °C, com recuperação de 39,0 % e 24,8%.

Tabela 2.8 – Fracionamento de PUFA em óleo de gordura de foca por cristalização à baixas temperaturas em diferentes solventes.

Temperatura de Cristalização (°C)	Triacilgliceróis (%)		Ácidos graxos livres (%)	
	Hexano	Acetona	Hexano	Acetona
- 10	23,2	23,5	23,8	24,3
- 20	23,9	26,9	24,5	25,4
- 40	26,2	36,4	31,0	40,6
- 60	30,5	43,8	58,3	56,8
- 70	35,1	47,9	66,7	46,8

Fonte: (WANASUNDARA, UDAYA N., 1996; WANASUNDARA, UDAYA N; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Nota: O conteúdo de ácidos graxos PUFA original na amostra é de 20,1%.

Em um recente trabalho de winterização de óleo de pescado, usando hexano como solvente, e resfriamento até -5 °C, foi obtido um concentrado de PUFA a 64,3%, e um aumento percentual de concentração dos ácidos insaturados de cerca de 9,2%, em relação ao óleo branqueado (CUNHA *et al.*, 2009).

Diversos solventes podem ser utilizados na cristalização por solventes como: metanol; acetona; hexano; heptano; entre outros. Existem trabalhos na literatura que relatam as solubilidades dos ácidos graxos puros em variados solventes e temperaturas (BROWN; KOLB, 1955b; FOREMAN; BROWN, 1944).

A solubilidade dos lipídeos em água é maior quando os ácidos graxos são mais insaturados e diminui com a massa molecular média (CHAWLA; DEMAN, 1990). As regras para a solubilidade de ácidos graxos em solventes orgânicos são as seguintes (BROWN; KOLB, 1955):

- a) Ácidos graxos saturados de cadeia curta são mais solúveis que os de cadeia longa;
- b) MUFA e DUFA são mais solúveis que ácidos graxos saturados de cadeia de mesmo comprimento;
- c) Ácidos graxos contendo insaturações *cis* são mais solúveis que os contendo *trans*;
- d) Ácidos graxos ramificados são mais solúveis que lineares.

Um recente estudo utilizando óleo de sardinha como matéria prima (HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014), conseguiu acréscimos na concentração de EPA e DHA de respectivamente 17,74% e 25,51%, procedendo a cristalização em etanol 99,9% (30 mL solvente/g), na temperatura de -5°C por 24 h.

Ainda, um estudo de 2016 investigou através da cristalização à baixas temperaturas com uso de solventes, o enriquecimento de conteúdo de DPA e DHA em óleo de *Schizochytrium sp.* (MU *et al.*, 2016), uma microalga marinha conhecida por um conteúdo apreciável em DHA (JIANG *et al.*, 2004; SARKER; *et al.*, 2016).

A concentração ótima de DPA ($26,26 \pm 0,06\%$) e DHA ($64,81 \pm 0,69\%$), com rendimentos respectivos de $53,58 \pm 2,14\%$ e $52,57 \pm 2,09\%$, foi obtida utilizando ácidos graxos livres (FFA) como material de partida, solvente acetonitrila na razão de 1:5 FFA/solvente (m/v) e cristalização à -60°C por 80 min.

Utilizando triacilgliceróis como material de partida, a melhor condição de DPA ($21,50 \pm 0,27\%$) e DHA ($53,87 \pm 0,67\%$) é obtida com acetona na razão de 10% óleo/solvente (m/v) e cristalização à -80°C por 4 h, com rendimentos respectivos de $61,34 \pm 1,33\%$ e $62,46 \pm 1,33\%$.

Em outro estudo, utilizando óleo de sardinha, solvente hexano, várias temperaturas (-55 °C, -65 °C, -75 °C, e -85 °C) e tempos de cristalização (1-24h), mostrou que a maior concentração de PUFA (> 80%) foi alcançada à temperatura de -85 °C e tempo de 24 h (MORALES-MEDINA *et al.*, 2016). Assim, o fracionamento de PUFA's por cristalização em solventes, na maioria das vezes possui a dificuldade de necessitar temperaturas extremamente baixas e operacionalmente difíceis de serem obtidas em grande escala, representando uma importante desvantagem do método.

2.9.5.6 Cristalização à baixas temperaturas na ausência de solventes

O fracionamento à seco, ou cristalização à baixas temperaturas é um processo ambientalmente amigável pois não utiliza solventes, e opera em condições brandas, evitando a degradação da amostra (SOLEIMANIAN; SAHARI; BARZEGAR, 2015).

Uma mistura de ácidos graxos, quando submetida a resfriamento lento, tende a cristalizar os ácidos graxos que possuem ponto de fusão mais elevado (ácidos graxos saturados) e os PUFA de cadeia longa tendem a permanecer no estado líquido. Os cristais formados são separados por filtração ou centrifugação e duas frações são obtidas. A eficiência de cristalização também depende se essa foi feita de forma estagnada ou com agitação.

A cristalização na ausência de solventes, ou fracionamento a seco (Dry Fractionation), é feita em dois estágios: a cristalização que forma duas fases, uma sólida, e uma líquida com conteúdo enriquecido em PUFA; e a separação destas (SHAHIDI, F; WANASUNDARA, 1998).

Através dessa técnica o fracionamento de ácidos graxos insaturados é possível para alguns tipos de lipídeos, mas em determinadas temperaturas ocorre a formação de cristais mistos (CHAWLA; DEMAN, 1990). Seria difícil a separação de somente um determinado ácido graxo.

O fracionamento é geralmente empregado na separação da fração sólida (estearina) da fração líquida (oleína), como por exemplo, na cristalização e filtração do óleo de palma na indústria alimentícia; e mescla deste com as frações geradas (oleína e estearina) para produzir frituras, biscoitos, sorvetes, salgadinhos, alimentos

para bebês, margarinas sem gorduras *trans*, panificação em geral, balas, entre outros (INSUMOS, 2015).

Tal técnica é usada desde 1940 e é adequada para PUFA que podem ser oxidados a altas temperaturas. Para triacilgliceróis, os problemas que atrapalham a separação do óleo resfriado em nítidas frações mais saturadas das frações mais insaturadas é a formação de soluções sólidas (triacilgliceróis cristalizam juntos); e o arrastamento (parte líquida fica retida nas partículas sólidas da mistura de cristalização) (INSUMOS, 2015; METIN; HARTEL, 2005; WANASUNDARA, UDAYA N; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005).

Um recente trabalho, por exemplo, utiliza cristalização à baixas temperaturas de triacilgliceróis em óleo de peixe (conteúdo inicial de PUFA de 30 g/100 g de óleo), no qual a melhor condição (com conteúdo em PUFA 45,8 g/100 g de óleo e rendimento em 51,5%) foi obtida através de cristalização em dois estágios (3 °C/h até 5 °C e 0,7 °C/h até 0 °C); agitação lenta (3 rpm); e presença de nucleador primário (SOLEIMANIAN; SAHARI; BARZEGAR, 2015).

2.10 Referências

- ADITIVOS E INGREDIENTES. **Ômega 3 , 6 e 9 - Entenda as diferenças e seus benefícios à saúde**. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/666.pdf>. Acesso em: 6 jun. 2016.
- AKCELRUD, L. Estado cristalino. **Fundamentos da ciência dos polímeros**. Barueri, SP: Manole, 2007. p. 120. Disponível em: <<https://books.google.com/books?id=3wJHvsGcjl4C&pgis=1>>. Acesso em: 6 jun. 2016.
- ALMEIDA, V. F. et al. Biodiesel production from mixtures of waste fish oil, palm oil and waste frying oil: Optimization of fuel properties. **Fuel Processing Technology**, v. 133, p. 152–160, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2015.01.041>>. Acesso em: 6 jun. 2016.
- ANTONIOSI-FILHO, N. R. **Análise de óleos e gorduras vegetais utilizando métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais**. 1995. 339 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Carlos, São Carlos, SP, 1995.
- AULT, W. C. Inedible Fats and Fatty Acids. History and Technological Trends. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 31, n. 11, p. 486–489, 1954. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%252FBF02638557>>. Acesso em: 6 jun. 2016.
- BARBOSA, O. et al. Heterofunctional Supports in Enzyme Immobilization: From Traditional Immobilization Protocols to Opportunities in Tuning Enzyme Properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm400762h>>. Acesso em: 7 jun. 2016.
- BELARBI, E.-H.; MOLINA, E.; CHISTI, Y. A process for high yield and scaleable recovery of high purity eicosapentaenoic acid esters from microalgae and fish oil. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 951–969, 2000.
- BENGEN, F.; HOLMAN., R. T. The Urea Complexes of Unsaturated Fatty Acids. **Science**, v. 112, jul., p. 19–20, 1950.
- BENITES, C. I.; SOUZA-SOARES, L. A. Farinhas de silagem de resíduo de pescado co-secas com farelo de arroz: Uma alternativa viável. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 227, p. 447–450, 2010.
- BERY, C. Estudo da viabilidade do óleo de vísceras de peixes marinhos (Seriola Dumerlii (Arabaiana), Thunnus ssp (Atum), Scomberomorus cavala (Cavala) e Carcharrhinus spp (Cação) comercializados em Aracaju-SE para a produção de biodiesel. **Geintec**, v. 2, p. 297–306, 2012.
- BIODIESELBR. **Motor Diesel**. Disponível em:

<<http://www.biodieselbr.com/biodiesel/motor-diesel/motor-diesel.htm>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

BIST, S.; TAO, B. Y.; MOHTAR, S. Purdue Research Foundation (Estados Unidos da América). **Method for separating saturated and unsaturated fatty acid esters and use of separated fatty acid esters**. US n. 20090199462 A1, 13 ago 2009. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US20050232956%5Cnhttp://www.google.com/patents/US20090199462>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

BOTTINO, N. R.; VANDENBURG, G. A.; REISER, R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. **Lipids**, v. 2, n. 6, p. 489–493, 1967.

BROWN, J. B. **A study of the highly unsaturated fatty acids occurring in fish oils**. 1921. Tese (Doctor of Philosophy) - Universidade de Illinois, Illinois, 1921. Disponível em: <<http://chestofbooks.com/health/nutrition/Fish-Oil/>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

BROWN, J. B.; KOLB, D. K. Applications of low temperature crystallization in the separation of the fatty acids and their compounds. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**, v. 3, n. c, p. 57–94, 1955a.

BROWN, J. B.; KOLB, D. K. Low temperature solubilities of fatty acids in selected organic solvents. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 32, n. June, p. 357–361, 1955b.

BROWN, J. B.; STONER, G. G. The Purification of Linoleic Acid by Crystallization Methods. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, p. 3–6, 1937.

CÂMARA, G. M. DE S. **Biodiesel Brasil - Estado Atual da Arte**. Disponível em: <http://www.cib.org.br/pdf/biodiesel_brasil.pdf>. Acesso em: 24 ago. 2015.

CARVALHO, P. D. O. et al. Aplicação de lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 75–80, 2003.

CASTRO, B. C. S. **Otimização das condições da reação de transesterificação e caracterização dos Rejeitos dos Óleos de Fritura e de Peixe para obtenção de Biodiesel**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CHAKRABORTY, K.; JOSEPH, D.; JOSEPH, D. Concentration and stabilization of C20-22 n-3 polyunsaturated fatty acid esters from the oil of *Sardinella longiceps*. **Food Chemistry**, v. 199, p. 828–837, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.12.082>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R. Enrichment of eicosapentaenoic acid from sardine oil with Δ^5 -olefinic bond specific lipase from *Bacillus licheniformis* MTCC 6824. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1428–1433, 2008.

CHAKRABORTY, K.; RAJ, R. P. Eicosapentaenoic acid enrichment from sardine oil by argentation chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7586–7595, 2007.

CHANG, J. P.-C. et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFAs) levels in patients with cardiovascular diseases (CVDs) with and without depression. *Brain, behavior, and immunity*, v. 44, p. 28–31, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25452150>>. Acesso em: 24 ago. 2015.

CHAWLA, P.; DEMAN, J. M. Measurement of the size distribution of fat crystals using a laser particle counter. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 67, n. 5, p. 329–332, 1990.

CHEVREUL, M. E. La saponification. **Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale**. Levraut ed. Paris: [s.n.], 1823. Cap. V, p. 372–389. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=94_H7hfQfS0C&pg=PA473&hl=fr&source=gb_s_selected_pages#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 25 jun. 2015.

CHOWDHURY, R. et al. Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: systematic review and meta-analysis. **Bmj**, v. 345, n. October, p. 6698-, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3484317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

CHRISTIE, W. W. **Fatty acids**. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/whatdo/index.htm>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

CONNOR, W. E. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 1 Suppl, p. 171S–5S, 2000.

COSTA NETO, P. R. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.

CREXI, V. T. et al. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: Chemical hydrolysis and urea complexation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 329–334, 2012.

CUNHA, D. C. et al. Winterization of fish oil with solvent. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 207–213, 2009.

CYBERLIPID. **History of the developments of fatty acid separation techniques**. Disponível em: <<http://www.cyberlipid.org/fattyt/fatt0008.htm>>. Acesso em: 1 abr. 2016a.

CYBERLIPID. **The work of Chevreul**. Disponível em: <<http://www.cyberlipid.org/chevreul/work0003.htm>>. Acesso em: 1 abr. 2016b.

DILLON, J. T. et al. Purification of omega-3 polyunsaturated fatty acids from fish oil using silver-thiolate chromatographic material and high performance liquid

chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1312, p. 18–25, 2013.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2013.08.064>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

DUNN, R. O.; BAGBY, M. O. Low-temperature properties of triglyceride-based diesel fuels: Transesterified methyl esters and petroleum middle distillate/ester blends.

Journal of the American Oil Chemists' Society, v. 72, n. 8, p. 895–904, 1995.

Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02542067>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

EDF. **Herring**. Seafood Selector. Disponível em: <<http://seafood.edf.org/herring>>.

Acesso em: 2 out. 2016.

ESPINOSA, S.; DIAZ, S.; BRIGNOLE, E. A. Thermodynamic Modeling and Process Optimization of Supercritical Fluid Fractionation of Fish Oil Fatty Acid Ethyl Esters.

Industrial & Engineering Chemistry Research, v. 41, n. 6, p. 1516–1527, mar.

2002. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ie010470h>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

ESTIASIH, T.; AHMADI, K.; NISA, F. C. Optimizing conditions for the purification of omega-3 fatty acids from the by-product of tuna canning processing. **Advance**

Journal of Food Science and Technology, v. 5, n. 5, p. 522–529, 2013.

FAO. **Fats oils in human nutrition**. Chapter 3 : Aspects of fat digestion and

metabolism. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/v4700e/V4700E08.htm>>.

Acesso em: 1 jun. 2016.

FAROOQUI, A. A.; HORROCKS, L. A.; FAROOQUI, T. Glycerophospholipids in brain: their metabolism, incorporation into membranes, functions, and involvement in neurological disorders. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 106, n. 1, p. 1–29, jun.

2000. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009308400001286>>. Acesso em: 27 jun. 2015.

FELTES, M. M. C. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**,

v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.

FIORI, L.; MANFRINI, M.; CASTELLO, D. Supercritical CO₂ fractionation of omega-3 lipids from fish by-products: Plant and process design, modeling, economic feasibility. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 2, p. 120–132, 2014.

FISHDB. **Clupea harengus** — Fisch Data Base - die Fischdatenbank. Disponível

em: <<http://www.fischdb.de/katalog/fish.2005-02-01.7662602219/view>>. Acesso em: 30 maio 2016.

FIUZA, R. DA P.; MIRANDA, C. DE S.; JUNIOR, R. A. F. Processos de purificação de glicerina bruta. **Cad. Prospec.**, v. 7, n. 1, p. 32–41, 2014.

FOREMAN, H. D.; BROWN, J. B. Solubilities of the fatty acids in organic solvents at low temperatures. **Oil & Soap**, n. 13, p. 183–187, 1944.

FOUGERE, M. **F is for fatty acid part 3! EPA for the win!** Disponível em: <<https://doctorfougere.com/2013/02/11/f-is-for-fatty-acid-part-3-epa-for-the-win/>>. Acesso em: 1 jun. 2016.

FREITAS, R. L. M. F. **Efeito da temperatura de resfriamento sobre as propriedades de polímeros amorfos e semicristalinos**. 2014. 52 f. Monografia (Engenharia de Materiais) - Escola Politécnica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://monografias.poli.ufrj.br/monografias/monopoli10011617.pdf>>. Acesso em: 1 jun. 2016.

GÁMEZ-MEZA, N. et al. Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. **Food Research International**, v. 36, n. 7, p. 721–727, 2003.

GEE, W. P. **Fractional separation of fatty oil substances**. Texaco Development Corp (Estados Unidos da América). US n. 2450235 A, 28 set. 1948. Disponível em: <<http://www.google.ch/patents/US2450235>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

GEORGE, S.; ARUMUGHAN, C. Positional distribution of fatty acids in the triacylglycerols of developing oil palm fruit. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 70, n. 12, p. 1255–1258, 1993.

GREENFIELD, C. Estados Unidos da América. **Recovery of stearic and oleic acids**. US 2911423 A, 3 nov. 1959. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US2911423>>. Acesso em: 3 jun. 2016.

GUESSEROW, C. A. **In: The developments of fatty acid separation techniques**. Disponível em: <www.cyberlipid.org/fattyt/fatt0008.htm#3>. Acesso em: 2 jun. 2016.

HAN, D.-S.; AHN, B.-H.; SHIN, H.-K. Separation of EPA and DHA from fish oil by solubility differences of fatty acid salts in ethanol. **Korean J. Food Sci. Technology**, v. 19, n. 5, p. 430–434, 1987.

HARTMAN, H.; STEIN, W. Estados Unidos da América. **Continuous process for the separation of mixtures of fatty acid esters of different melting points**. U.S. Patent 3733343, 1973.

HOMAYOONI, B.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M. Concentrations of omega-3 fatty acids from rainbow sardine fish oil by various methods. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 743–748, 2014.

HUNT, M. Women's Health Care: The potential of long-chain omega-3 polyunsaturated fatty acids. **Journal of Women's Health Care**, v. 3, n. 1, p. 1–3, 2014. Disponível em: <<http://www.omicsgroup.org/journals/womens-health-care-the-potential-of-longchain-omega-polyunsaturated-fatty-acids-2167-0420.1000142.php?aid=24051>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

HUNTER, J. E. Dietary trans fatty acids: review of recent human studies and food industry responses. **Lipids**, v. 41, n. 11, p. 967–92, nov. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17263298>>. Acesso em: 8 out. 2015.

IFFO (Organização dos Ingredientes Marinhos). **Produção dos ingredientes marinhos**. Disponível em: <<http://www.iffo.net/es/producci%25C3%25B3n>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

IMAHARA, H.; MINAMI, E.; SAKA, S. Thermodynamic study on cloud point of biodiesel with its fatty acid composition. **Fuel**, v. 85, n. 12–13, p. 1666–1670, set. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001623610600086X>>. Acesso em: 14 maio 2015.

INSUMOS. Lipídios : Hidrogenação, Interesterificação e Fracionamento. **Revista Aditivos e Ingredientes**, p. 41–51, 2015. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/86.pdf>. Acesso em: 14 maio 2015.

ITIS (Integrated Taxonomic Information System). **ITIS Standard Report Page: *Clupea harengus***. Disponível em: <http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=161722>. Acesso em: 30 maio 2016.

JIANG, Y. et al. Fatty Acid composition and squalene content of the marine microalga *Schizochytrium mangrovei*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 5, p. 1196–1200, 2004. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-1542317132&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 16 out. 2016.

KINSELLA, J. E. Food componentes with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. **Food Technology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 89–97, 1986.

KISTLER, R.; MUCKERHEIDE, V. J.; MYERS, L. D. The commercial solvent separation of fatty acids. **Oil & Soap**, p. 146–150, 1946.

KITESSA, S. M. et al. DHA - containing oilseed: A timely solution for the sustainability issues surrounding fish oil sources of the health-benefitting long-chain omega-3 oils. **Nutrients**, v. 6, n. 5, p. 2035–2058, 2014.

KNOTHE, G.; DUNN, R. O. A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 843–856, 2009.

KNOTHE, G.; GERPEN, J. H. VAN; KRAHL, J. **The Biodiesel Handbook**. Champaign, Illinois: AOCS Press, 2005. v. 2. Disponível em: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=a051QEoxZVYC&oi=fnd&pg=PR3&dq=The+Biodiesel+Handbook&ots=Nvg50QxyZZ&sig=4dh3x65XEcqiln1j1yy0j_awWw0>. Acesso em: 16 out. 2016.

KURATKO, C. N.; NOLAN, C. C.; SALEM, N. Long-chain omega-3 fatty acids and cardiovascular health. **Nutrafoods**, v. 13, n. 2, p. 49–60, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13749-014-0020-7>>. Acesso em: 16 out. 2016.

LIMA, A. L. et al. Parâmetros da reação de transesterificação etílica com óleo de milho para produção de biodiesel. **Ecletica Química**, v. 35, n. 4, p. 101–106, 2010.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases. **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 70–76, 2005.

LIU, S. et al. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: Optimization of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 3, p. 203–209, 2006.

LOOK FOR DIAGNOSIS. **Ácido Linoléico**. Disponível em: <[http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=%25C3%2581cido Linoléico&lang=5](http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=%25C3%2581cido%20Linoléico&lang=5)>. Acesso em: 19 abr. 2016.

MANSOORI, A. et al. Docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation improves body composition without influence of the PPAR γ Pro12Ala polymorphism in patients with type 2 diabetes: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **Journal of Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 8, n. 4–6, p. 195–204, 2015. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/Abstract/442792>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

MARANGONI, A. G.; ROUSSEAU, D. Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 10, p. 329–335, 1995.

MARCHIOLI, R.; LEVANTESI, G. N - 3 PUFAs in cardiovascular disease. **International Journal of Cardiology**, v. 170, n. 2 Suppl.1, p. S33–S38, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2013.06.042>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

MAROTTA, E.; AQUINO NETO, F. R.; AZEVEDO. Separação e determinação quantitativa dos alcanos lineares e dos cíclicos/ ramificados em petróleos brasileiros por aduto de ureia e cromatografia gasosa: um estudo de caso revisitado. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1692–1698, 2014.

MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.

MARTINS, G. I. **Potencial de extração de óleo de peixe para a produção de biodiesel**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, 2012. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/tede//tde_arquivos/16/TDE-2013-01-28T163734Z-902/Publico/Gislaine.pdf>. Acesso em: 19 out. 2016.

MARTINS, M. B.; PIOTTO, R. F.; BARBOSA, M. Propriedades dos ácidos graxos poliinsaturados omega 3 obtidos de óleo de peixe e óleo de linhaça. **Inst. Ciência Saúde**, v. 26, n. 2, p. 153–156, 2008.

MCMANUS, A.; MERGA, M.; NEWTON, W. Omega-3 fatty acids. What consumers need to know. **Appetite**, v. 57, n. 1, p. 80–83, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.appet.2011.03.015>>. Acesso em: 19 out. 2016.

MENDES, A.; DA SILVA, T. L.; REIS, A. DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 38–44, 2007.

METIN, S.; HARTEL, R. W. Crystallization of Fats and Oils. In: SHAHIDI, F. (Org.). **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. Sixth ed. Wisconsin: John Wiley & Sons, Inc, 2005. p. 45–76.

MOHAMMADI, M. et al. Improvement of the stability and selectivity of *Rhizomucor miehei* lipase immobilized on silica nanoparticles: Selective hydrolysis of fish oil using immobilized preparations. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1314–1323, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.05.007>>. Acesso em: 19 out. 2016.

MOHANARANGAN, A. B. **Extraction of omega-3 fatty acids from atlantic herring (*Clupea harengus*)**. 2012. 187 f. Dissertação (Master of Applied Science) - Department of Process Engineering and Applied Science, Dalhousie University, Nova Scotia, 2012.

MORAIS, M. M. et al. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 60, n. 1, p. 23–33, 2001. Disponível em: <http://biblioteca.ial.sp.gov.br/index.php?option=com_remository&Itemid=27&func=filinfo&id=258>. Acesso em: 19 out. 2016.

MORALES-MEDINA, R. et al. Mass transfer modeling of sardine oil polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentration by low temperature crystallization. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 16–23, 2016.

MOTA, C. J. A.; SILVA, C. X. A. DA; GONÇALVES, V. L. C. Gliceriquímica: novos produtos e processos a partir da glicerina de produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 639–648, 2009.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. Omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 20, p. 2047–2067, 2011.

MU, H. et al. Enrichment of DPA_n-6 and DHA from *Schizochytrium* sp. Oil by Low-Temperature Solvent Crystallization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 3, p. 737–746, 27 jan. 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.iecr.5b03766>>. Acesso em: 16 out. 2016.

MURGEL, M. F. **Cápsulas de óleo de peixe : percepção da dosagem e finalidade de consumo**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública) - Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, RJ, 2010.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Office of Dietary Supplements - Omega-3 Fatty Acids and Health**. Disponível em: <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcidsandHealth-HealthProfessional/>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

NATURE PUBLISHING GROUP. **Fatty acids : Definition**. Disponível em: <http://www.nature.com/subjects/fatty-acids?WT.ac=search_subjects_latestres_fatty_acids#research-and-reviews>. Acesso em: 25 jun. 2015.

NGUYEN, T. L.; FOWLER, F. W.; LAUHER, J. W. Commensurate and incommensurate hydrogen bonds. An exercise in crystal engineering. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 44, p. 11057–11064, 2001.

NIKOLOVA-DAMYANOVA, B. **Silver ion chromatography and lipids: Silver Ion High-Performance Liquid Chromatography**. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/content.cfm?ItemNumber=40343>>. Acesso em: 5 jun. 2016.

OMS. OMS - **Supplémentation en huiles d'origine marine pendant la grossesse**. Disponível em: <http://www.who.int/elena/titles/fish_oil_pregnancy/fr/>. Acesso em: 19 abr. 2016.

ONGARATTO, N. **Risco de glaucoma cai 20% com alimentação adequada**. Disponível em: <<http://www.investmentosenoticias.com.br/noticias/saude/risco-de-glaucoma-cai-20-com-alimentacao-adequada>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

PACHECO, S. G. A.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 927–932, 2009.

PADILHA, M. E. D. S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 285–290, 2007.

PAIM, R. M. et al. Concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos a partir de óleo de carpa (*Cyprinus Carpio*) utilizando o método da complexação com uréia. **Vetor**, v. 22, n. 1, p. 18–37, 2012.

PALOMINO-ROMERO, J. A. et al. Tratamentos dos efluentes gerados na produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 367–378, 2012.

PARLETTA, N. et al. People with schizophrenia and depression have a low omega-3 index. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids (PLEFA)**, v. 110, p. 42–47, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0952327816300333>>. Acesso em: 15 maio 2015.

PASSINO, H. J. The solexol process. **J. Ind. Eng. Chem.**, v. 41, p. 280–287, 1949.

PATIL, D.; NAG, A. Production of PUFA concentrates from poultry and fish processing waste. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 4, p. 589–593, 2011.

PICCOLO, T. **Frame work analysis of fish waste to biodiesel production – Aquafinca – case study**. Disponível em: <<https://aquaticbiofuel.files.wordpress.com/2009/08/fishwaste-biodiesel.pdf>>. Acesso

em: 15 maio 2015.

PITTIGLIANI, A. H. **Resíduos de pescado: produção de biodiesel e extração de colágeno**. 2014. 74 f. Monografia (Medicina Veterinária) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2014.

PUSCEDDU, M. M. et al. n-3 PUFAs have beneficial effects on anxiety and cognition in female rats: Effects of early life stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 58, p. 79–90, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25965872>>. Acesso em: 15 maio 2015.

RATNAYAKE, W. M. N. et al. Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea complexation. **Fat Science Technology**, v. 90, n. 10, p. 381–386, 1988. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/lipi.19880901002>>. Acesso em: 02 set. 2016.

REMIG, V. et al. Trans fats in America: a review of their use, consumption, health implications, and regulation. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 110, n. 4, p. 585–92, 4 abr. 2010. Disponível em: <<http://www.andjrnl.org/article/S000282230902094X/fulltext>>. Acesso em: 15 maio 2015.

RINALDI, R. et al. Síntese de biodiesel: Uma proposta contextualizada de experimento para laboratório de química geral. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1374–1380, 2007.

ROBLES MEDINA, A et al. Downstream processing of algal polyunsaturated fatty acids. **Biotechnology advances**, v. 16, n. 3, p. 517–580, 1998.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.006>>. Acesso em: 15 maio 2015.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis*-*Merluccius paradoxus*) by-products: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 215–226, 2008.

SALIMON, J.; ABDULLAH, B.; SALIH, N. Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. *Chemistry Central Journal*, v. 5, n. 1, p. 67, 2011. Disponível em: <<http://journal.chemistrycentral.com/content/5/1/67>>. Acesso em: 15 maio 2015.

SANTOS, A. P. B.; PINTO, A. C. Biodiesel: Uma Alternativa de Combustível Limpo. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 1, p. 58–62, 2009. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc31_1/11-EEQ-3707.pdf>. Acesso em: 15 maio 2015.

SARKER, P. K. et al. Complete substitution of fish oil with marine microalga *Schizochytrium* sp. Improves growth and fatty acid deposition in juvenile Nile Tilapia

(*Oreochromis niloticus*). **PLOS**, 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0156684>>. Acesso em: 15 maio 2015.

SCHLENK, H.; HOLMAN, R. T. Separation and Stabilization of Fatty Acids by Urea Complexes. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, p. 5001–5005, 1950.

SCHMITT-ROZIERES, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L.-C. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 3, p. 329–332, 2000.

SEGURA, J. G. **Extração e Caracterização de Óleos de Resíduos de Peixes de Água Doce**. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 230–240, 1998.

SHINOWARA, G. Y.; BROWN, J. B. Studies on the Chemistry of the Fatty Acids. The Preparation of Pure Oleic Acid by a Simplified Method. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 59, n. 2, p. 6–8, 1937.

SOLEIMANIAN, Y.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M. Influence of processing parameters on physicochemical properties of fractionated fish oil at low temperature crystallization. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 1, p. 2–19, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84922311123&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

SOUZA, R. J. et al. Intake of saturated and trans unsaturated fatty acids and risk of all cause mortality, cardiovascular disease, and type 2 diabetes: systematic review and meta-analysis of observational studies. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 351, p. 3978, jan. 2015. Disponível em: <<http://www.bmj.com/content/351/bmj.h3978.abstract>>. Acesso em: 15 ago. 2015.

SOUZA, S. M. G. DE. Review: Essential fatty acids: importance of fish oils and aquaculture. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 189–196, 2010. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v13n3422a.pdf>>. Acesso em: 2 out. 2016.

STEIN, W. The Hydrophilization Process for the Separation of Fatty Materials. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 471–474, 1968.

SUMMERTON, S. **Omega-3s: What they can do for you**. Disponível em: <<https://www.reviewofoptometry.com/article/omega3s-what-they-can-do-for-you>>. Acesso em: 2 out. 2016.

SUNG, S.-K.; LEE, S. K. Dongbu Hannong Chemical Corporation Ltd (Seoul, Koréia).

Method for preparing unsaturated fatty acids. EP 1 712 609 A1, 10 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.google.com.ar/patents/EP1712609A1?hl=pt-BR>>. Acesso em: 2 out. 2016.

SWANSON, D.; BLOCK, R.; MOUSA, S. A. Omega-3 Fatty Acids EPA and DHA: Health Benefits Throughout Life. *Advances in Nutrition: An International Review Journal*, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2012.

TALAB, H. A. et al. Extraction and purification of omega-3 fatty acids concentrate from Hypophthalmichthys molitrix oil. *Nutrition & Food Science*, v. 40, n. 2, p. 193–203, 2010.

THAMMAPAT, P.; SIRIAMORNUN, S.; RAVIYAN, P. Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) of Asian catfish oil by urea complexation : optimization of reaction conditions. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, v. 38, n. 2, p. 163–170, 2016.

THOMPSON, A. K. et al. Trans-fatty acids and cancer: the evidence reviewed. *Nutrition research reviews*, v. 21, n. 2, p. 174–188, 2008.

TOUSOULIS, D. et al. Omega-3 PUFAs improved endothelial function and arterial stiffness with a parallel antiinflammatory effect in adults with metabolic syndrome. *Atherosclerosis*, v. 232, n. 1, p. 10–16, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atherosclerosis.2013.10.014>>. Acesso em: 17 out. 2016.

TRENTINI, C. P.; RASPE, D. T.; SILVA, C. DA. Obtenção de Ácidos Graxos Livres do Óleo de Macaúba (Acrocomia Aculeata) em Sistema Livre de Solvente Orgânico. *Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas*, v. 35, n. 1, p. 15, 2014. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/15200>>. Acesso em: 17 out. 2016.

TWITCHELL, B. E. The precipitation of solid fatty acids with lead acetate in alcoholic solution. *The Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 13, n. 9, p. 806–807, 1931.

VALVERDE, L. M. et al. Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) by selective alcoholysis catalyzed by lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, n. 9, p. 990–1004, 2013.

WAITZBERG, D. L. **Ômega-3: o que existe de concreto?** Disponível em: <<http://www.nutritotal.com.br/publicacoes/files/644--MonografiaOmega3.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

WANADSUNDARA, U. N.; PETERSON, R. Pos Pilot Plant Corporation (Saskatchewan, Canadá). **Process for separating saturated and unsaturated fatty acids.** Estados Unidos da América: US 8003813 B2., 23 ago. 2011.

WANASUNDARA, U. N. **Marine oils:** Stabilization, structural characterization e omega-3 fatty acid concentration. 1996. 292 f. Tese de doutorado (Doctor of Philosophy) - Departament of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, Canadá, 1996.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: Optimization of reaction conditions. **Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 41–49, 1999.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Stabilization of seal blubber and menhaden oils with green tea catechins. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 9, p. 1183–1190, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02523382>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

WANASUNDARA, U. N.; WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F. Novel separation techniques for isolation and purification of fatty acids and oil by products. In: FERREIDON, S. **Bailey's industrial oil and fat products**. Sixth ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2005. p. 585–621.

WILFREDO, O.; GAMBOA, D.; GIOIELLI, A. Comportamento de cristalização de lipídios estruturados obtidos a partir de gordura de palmiste e óleo de peixe. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 646–653, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Fats and fatty acids in human nutrition**. Report of an expert consultation. [S.l.: s.n.], 2008. v. 91. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21812367>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

XU, X. et al. Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a flat membrane reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 10, p. 1035–1041, 2000.

ZILCH, K. T. Separation of Fatty Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 56, n. 11, p. 739A–742A, 1979. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%252FBF02667432>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

ZIMMERSCHIED, W. J. et al. Crystalline adducts of urea with linear aliphatic compounds. **Industrial and Engineering Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 1300–1306, 1950.

3. CAPÍTULO 3

ÓLEO DE RESÍDUO DE PEIXE COMO POTENCIAL MATÉRIA-PRIMA PARA PRODUÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E BIODIESEL

Ingyrd Cristina de Oliveira, Nelson Roberto Antoniosi Filho

Laboratório de Métodos de Extração e Separação. Instituto de Química,
Universidade Federal de Goiás, Campus II, Samambaia, CEP: 74690-900, Goiânia,
Goiás, Brasil.

nelson@quimica.ufg.br

ingryd.oliveira.br@gmail.com

RESUMO

O objetivo desse trabalho é avaliar o óleo proveniente dos resíduos de peixe (OR) como potencial matéria-prima para a produção de biodiesel e suplementos alimentares. Para isso, foram extraídos por sohxlet, o óleo proveniente dos resíduos (vísceras, pele, escamas, nadadeiras, e cabeça) do peixe *Clupea harengus*; e também do filé (OF), como comparativo. Ambos os óleos foram caracterizados por análises físico-químicas, de composição em ácidos graxos, e térmicas. OR e OF foram obtidos com rendimento de 53% m/m e 33% m/m. Os óleos apresentaram uma cor escura. A acidez de OR foi de 7,68 mg KOH/g e a de OF de 8,73 mg KOH/g. A análise via cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de Massas (GC-MS), apontou que o teor de ácidos graxos insaturados foi de 71,81% no OR e de 72,90% no OF. O teor de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (ω -3 PUFA) foi de 17,44% no OR e de 19,61% no OF. As curvas de resfriamento por DSC (Differential Scanning Calorimetry) apresentaram dois picos de eventos exotérmicos, nas temperaturas de -4,5 °C e -45,5 °C no OR; e de -3,0 °C e -45,0 °C no OF. A cor escura e a acidez elevada indicam que os óleos de peixe devem ser submetidos ao refino, com etapas de neutralização e branqueamento, antes de serem destinados ao consumo. A pesquisa apontou que OR e OF possuem alto teor de insaturados e de ω -3 PUFA. Isso pode dificultar a obtenção de um biodiesel de qualidade a partir do óleo bruto, mas também é extremamente favorável à produção de suplementos alimentares. As análises de DSC demonstraram que o fracionamento de triacilgliceróis por cristalização à baixas temperaturas, visando a obtenção de concentrados poli-insaturados, seria de difícil execução. Uma estratégia, seria a hidrólise dos triacilgliceróis em ácidos graxos livres, com vistas a posterior fracionamento entre ácidos graxos saturados e insaturados. Assim, o óleo de resíduos de peixe torna-se uma fonte de matéria-prima adequada para a produção de biodiesel e suplementos alimentares.

Palavras-chave: *Clupea harengus*; Óleo de peixe; Biodiesel; Suplementos alimentares ômega-3; Caracterização.

3.1 Introdução

A cada ano que passa, a humanidade carece mais de alternativas e fontes para suprir de forma sustentável as demandas energéticas e alimentícias. Nesse contexto, o reaproveitamento de resíduos, como os gerados pela indústria pesqueira, pode vir a ser extremamente benéfico (FAO, 2014a). Os peixes estão entre as principais fontes de proteínas e lipídeos na alimentação humana. Segundo a FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), o consumo mundial per capita de peixe cresceu de 9,9 kg em 1960 para 19,2 kg em 2012, a produção mundial de pescado tem crescido a uma taxa média anual de 3,2%, e atingiu 158 milhões de toneladas em 2013 (FAO, 2014b).

Entretanto muitas vezes o processo de beneficiamento das indústrias pesqueiras gera resíduos de até 70% da matéria-prima (BENITES e SOUZA-SOARES, 2010) – tais como vísceras, pele, cabeça, cauda, esqueleto e barbatanas. Estes são passivos ambientais e possuem baixo valor comercial, mas que poderiam ser fontes de ácidos graxos destinados à produção de suplementos alimentares (LÚCIA et al., 2015), farinha de pescado (HIGUCHI, 2015) e produção de biocombustíveis, tal como o biodiesel (PORTAL BRASIL, 2015), evitando assim a disposição inadequada de tais resíduos. De acordo com Audun Lem, responsável pelo Serviço de Produtos, Comércio e Comercialização da FAO:

“Temos que garantir que esses produtos não sejam desperdiçados, do ponto de vista econômico, mas também nutricional. Os subprodutos dos peixes têm muitas vezes um valor nutricional mais elevado do que o próprio peixe, especialmente em termos de ácidos graxos essenciais, vitaminas e minerais, e podem ser uma excelente maneira de combater as deficiências em micronutrientes nos países em desenvolvimento”. (FAO, 2014a)

A comercialização de cápsulas de óleo de peixe como suplementos alimentares, apesar das controvérsias quanto aos estudos de eficácia da suplementação (MOYER, 2012, SIMMER, 2016), possui amplo mercado e gera elevado retorno financeiro, já que as elevadas quantidades de ácidos graxos poli-insaturados presentes neste óleo - tais como EPA e DHA - são indicadas para a

prevenção e tratamento de diversas desordens metabólicas (MARTIN *et al.*, 2006, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2005).

Assim, os óleos de peixes são indicados para evitar doenças cardiovasculares, ansiedade, ou tratar doenças como artrite, câncer e hipertensão (CHOWDHURY *et al.*, 2012, HUNT, 2014, KINSELLA, 1986, KURATKO, NOLAN E SALEM, 2014, KURATKO *et al.*, 2013, MANSOORI *et al.*, 2015, MARTINS, 2012, PACHECO E REGITANO-D'ARCE, 2009, PUSCEDDU *et al.*, 2015, RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2010, SWANSON, BLOCK E MOUSA, 2012). Entretanto, seu consumo humano é indicado na forma de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados, livres de ácidos graxos saturados (HORROCKS e YEO, 1999, SHAHIDI e WANASUNDARA, 1998).

Outro mercado que tem potencial para o aproveitamento de óleos de peixes é o de produção de biodiesel (FELTES *et al.*, 2010). O biodiesel normalmente é produzido a partir de plantas oleaginosas como soja, canola, dendê, e mamona, bem como de origem animal como o sebo bovino e gordura suína (ATABANI *et al.*, 2012).

Entretanto a produção dos biocombustíveis a partir dessas matérias-primas não suprirá a demanda futura de biocombustíveis, sendo necessário encontrar fontes alternativas de matéria-prima graxa. Considerando que aproximadamente 80% do custo de produção do biodiesel é relacionado à matéria graxa (o restante se deve à gastos com mão de obra, insumos de energia, catalisador, etc.) (LIMA *et al.*, 2010), seria interessante para a minimização de custos, a utilização de resíduos como óleo de frituras (COSTA NETO *et al.*, 2000; FILHO, 2010) ou resíduos da indústria pesqueira, como o óleo de resíduos de peixe (BERY, 2012, CASTRO, 2009, FELTES *et al.*, 2010).

Neste contexto, o biodiesel proveniente de pescados pode se tornar uma matriz energética alternativa atrativa, também podendo gerar grande impacto econômico e social na vida dos piscicultores, ou gerar emprego e renda em regiões onde a piscicultura pode ser desenvolvida (MPA, 2015a).

Sabe-se que a temperatura da região de origem dos peixes afeta a composição de seus ácidos graxos. Devido a questões relacionadas a ganho energético e manutenção dos lipídeos na forma líquida, peixes de regiões quentes possuem ácidos graxos saturados em maior quantidade do que peixes de regiões frias.

Assim, peixes oriundos de regiões frias devem apresentar maiores quantidades de ácidos graxos poli-insaturados, já que esses são importantes para manter o interior das células lipídicas em estado líquido sob baixas temperaturas (SNYDER; SCHREGEL; WEI, 2012; SOUZA, 2010; SOUZA, S. M. G. DE; ANIDO; TOGNON, 2007; TOCHER; SARGENT, 1984).

Dentre os peixes que vivem em regiões frias, destaca-se o arenque. O arenque é uma das aproximadamente 200 espécies de peixe pertencentes à família Clupeidae e se alimenta de plâncton e de pequenos crustáceos (RESEARCH, 2015).

Das três espécies de arenque do gênero *Clupea* (*Clupea bentincki*, *Clupea harengus*, e *Clupea pallasii*), a mais abundante, o *Clupea harengus* (Figura 3.1), é originário do Atlântico Norte (Região da Noruega e Islândia), podendo atingir até 39 cm de comprimento e 680 g de massa.

Figura 3.1 – Arenque da espécie *Clupea harengus*.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Esses peixes vivem em grandes cardumes, percorrendo enormes distâncias em águas abertas (REID et al., 1999, FAO, 2010). Um arenque adulto possui aproximadamente 25 cm de comprimento e acumula grande quantidade de gordura próximo aos 2 anos, podendo viver até 18 anos de idade. Parte dessa gordura é perdida no inverno e com a maturidade sexual, sendo que na estação reprodutiva a fêmea põe de 20.000 a 40.000 ovos (BIGELOW, SCHOROEDER, 1953).

Aqui, o arenque foi escolhido como o objeto de estudo por sua abundância e por viver em águas frias (18 a 20 °C) - mais especificamente no Atlântico Norte (MOKSNESS, E., KJORSVIK, E., OLSEN, 2004) do Mar Báltico e do Pacífico Norte - o que normalmente proporciona elevados teores de ácidos graxos poli-insaturados,

que fracionados a partir dos ácidos graxos saturados, podem ser utilizados como nutracêuticos, enquanto a segunda fração pode ser usada para produzir biodiesel.

O *Clupea harengus* foi a quarta espécie de peixe com maior representatividade mundial de captura em 2012, sendo equivalente à 1.849.969 toneladas capturadas, de acordo com o anuário da FAO de 2014 (FAO, 2014b).

Sendo assim, o objetivo desse estudo foi o de extrair óleo de peixe a partir do arenque (*Clupea harengus*) e caracteriza-lo para avaliar o potencial uso posterior como matéria-prima no desenvolvimento de nutracêutico e/ou biodiesel.

3.2 Parte Experimental

3.2.1 Obtenção do óleo de peixe

Os peixes da espécie *Clupea harengus*, conhecidos popularmente como “sardinha norueguesa” ou arenque do Atlântico, foram adquiridos em hipermercado local (Goiânia, Goiás) em 26 de agosto de 2015. Ao todo foram 27 unidades (peixes) congeladas, totalizando 10,334 Kg. Os peixes foram descongelados por 4 horas até alcançarem temperatura ambiente, de aproximadamente 25 °C (Figura 3.2).

Figura 3.2 – Peixes *Clupea harengus* descongelando.



Fonte: Elaborada pela Autora.

As vísceras e demais resíduos como pele, escamas, nadadeiras, cabeça, foram separados do filé (Figura 3.3 e Figura 3.4).

Figura 3.3 – Separação do peixe inteiro em partes: resíduos e filé.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 3.4 – Separação dos peixes em duas partes: à esquerda, resíduos (vísceras, cabeças, escamas, peles, nadadeiras, espinhas) e à direita, filé.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Esses resíduos e filé de peixe foram depositados em formas de alumínio, secos em estufa (Estufa FANEM® Controlador modelo A-HT) à ~75 °C, por 36 h, e posteriormente triturados em Liquidificador industrial SKYMSEN modelo TA-02 com 3 L de capacidade (Figura 3.5 e Figura 3.6).

Figura 3.5 – Resíduos secos em estufa (acima) e posteriormente triturados (abaixo).



Fonte: Elaborada pela Autora

Figura 3.6 – Filé seco em estufa (acima) e posteriormente triturado (abaixo).



Fonte: Elaborada pela Autora

Tanto o óleo de resíduos, como o de filé, foram então retirados por extração contínua em sohxlet (2 sistemas de Soxhlet VIDROLABOR[®] 396 Brasil, com 1 L de capacidade cada, e duas mantas aquecedoras modelo 102 Fisatom[®]) por 6 horas, usando hexano (Hexano P.A. NEON CAS N^o 110-54-3) como solvente (Figura 3.7).

Figura 3.7 – Extração do óleo de peixe em sistema sohxlet.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Após extração, os óleos passaram por filtração simples em sulfato de sódio anidro (Sulfato de sódio anidro P.A. Synth CAS N^o 7757-82-6) e recuperação do hexano em evaporador rotativo QUIMIS[®], com bomba de vácuo QUIMIS[®] na vazão de 60 L/min, tensão de 220 V, potência de 1/6 HP, com banho de água a 60 °C, e pressão de 640 mmHg. O sistema de refrigeração acoplado ao sohxlet e ao rotaevaporador foi o banho refrigerado FRIGOMIX[®] B com controlador de temperatura THERMOMIX[®] B. Braun Biotech International que foi mantido à aproximadamente 5 °C.

O acondicionamento dos óleos foi feito em frascos âmbar, completamente cheios e estocados em freezer GELBOX[®] (-20 ± 2 °C). Em seguida, o óleo de resíduos de peixe e o óleo de filé foram submetidos à caracterização por técnicas físico-químicas, cromatográficas, e térmicas.

3.2.2 *Rendimento*

Antes de cada extração no sohxlet, a massa de peixe a ser extraída foi pesada diretamente nas capsulas de extração. O óleo obtido também foi pesado em balança analítica BEL[®] (com precisão de três casas após a vírgula, capacidade mínima de pesagem de 0,01 g, e máxima de 500 g). A cor e o aspecto dos óleos de filé e de resíduos são as mesmas, sendo exemplificada na Figura 3.8.

Figura 3.8 – Óleo de resíduos de peixe.



Fonte: Elaborada pela Autora.

O rendimento (R) percentual em óleo de filé e resíduos foi calculado em relação a massa extraída de óleo ($m_{\text{óleo}}$), e a massa seca de filé ou massa de resíduos utilizada na extração (m_{inicial}) de acordo com a Equação 3.1:

Equação 3.1 – Cálculo do rendimento percentual da extração de óleo.

$$R(\%) = \frac{m_{\text{óleo}}(g) \times 100}{m_{\text{inicial}}(g)}$$

A porcentagem de água presente na matéria inicial antes da extração foi calculada tendo como parâmetro a massa inicial, de acordo com a Equação 3.2.

Equação 3.2 – Cálculo do teor de água presente na matéria seca inicial (massa que vai ao Soxhlet antes da extração).

$$Teor_{\text{água}} (\%) = \frac{[m_{\text{inicial}} (g) - (m_{\text{óleo}} + m_{\text{após_extração}})(g)] \times 100(\%)}{m_{\text{inicial}} (g)}$$

3.2.3 Índice de saponificação (IS)

O óleo de peixe foi caracterizado através dos ensaios de índice de saponificação (AOAC Official Method 920160); índice de acidez (AOCS Official Method Cd3d-63); índice de iodo (EN 14111); massa específica a 15 °C (NBR 14065); viscosidade cinemática a 40 °C (NBR 10441); e uma estabilidade oxidativa a 110 °C (EN14112).

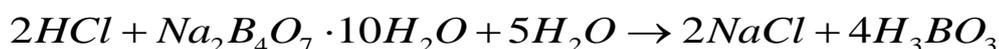
O índice de saponificação é a medida de álcali (quantidade em miligramas de hidróxido de potássio) necessária para saponificar uma determinada quantidade de amostra (quantidade em gramas de amostra). O índice de saponificação é uma indicação indireta em peso dos ácidos graxos, pois é inversamente proporcional a massa molecular média dos ácidos graxos presentes na amostra. A massa molecular média dos triacilgliceróis é calculado pela Equação 3.3, que relaciona 3 mols de KOH (MMKOH = 56 g/mol).

Equação 3.3 – Fórmula para cálculo da massa molecular média do óleo.

$$MM_{\text{óleo}} (g / mol) = \frac{3 \times 56,11 \times 1000 (mg_{\text{KOH}} / mol_{\text{óleo}})}{IS (mg_{\text{KOH}} / g_{\text{óleo}})}$$

O procedimento prático do índice de saponificação possui três etapas: a padronização da solução de HCl, a titulação das amostras de óleo saponificadas, e as titulações dos brancos saponificados. A padronização do HCl com o bórax acontece de acordo com a reação química da Equação 3.4.

Equação 3.4 – Reação geral de padronização do HCl com o bórax.



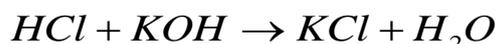
Observa-se que um mol de bórax reage com 2 mols de HCl. Assim, a concentração da solução de HCl foi encontrada pelo cálculo da Equação 3.5.

Equação 3.5 – Cálculo para obter a concentração da solução de HCl.

$$M_{HCl} (mol / L) = \frac{2 \times m_{Bórax} (g)}{V_{HCl} (L) \times MM_{Bórax} (g / mol)}$$

Sabe-se que cada mol de HCl reage equivalentemente com um mol de KOH, de acordo com a reação química da Equação 3.6.

Equação 3.6 – Reação de titulação entre HCl e KOH.



Assim, tendo-se a concentração da solução padronizada de HCl utilizada, e os volumes gastos na titulação das amostras e dos brancos, foi possível calcular o índice de saponificação (IS) da amostra de óleo de acordo com a Equação 3.7.

Equação 3.7 – Cálculo do Índice de Saponificação.

$$IS (mg_{KOH} / g_{óleo}) = \frac{1000 (mg / g) \times 56,11 (g_{KOH} / mol) \times M_{HCl} (mol / L) \times [V_{branco} - V_{óleo}] (L)}{m_{óleo} (g)}$$

O procedimento para obtenção do índice de saponificação (AOAC Official Method 920160) foi efetuado como a seguir:

a) Preparo de 1 L de solução aquosa de ácido clorídrico 0,5 mol/L:

Para isso, 41,4 mL de HCl 37% (TEDIA®, CAS No 7647-01-0) foram pipetados para um béquer VIDROLABOR® de 1 L de capacidade, contendo previamente 600 mL de água destilada. A solução foi misturada agitando-se levemente com um bastão de vidro e logo após foi transferida para um balão volumétrico PHOX® de 1 L de capacidade. O volume do balão foi completado com água destilada para 1 L, e a solução foi homogeneizada.

b) Preparo de 100 mL de solução alcoólica de indicador fenolftaleína 1%:

Para isso, 1 g de fenolftaleína (SIGMA-ALDRICH®, CAS No 77-09-8) foi adicionado a 80 mL de etanol (NEON®, CAS 64-17-5) em um béquer VIDROLABOR® de 250 mL de capacidade. A solução foi misturada agitando-se levemente com um bastão de vidro e logo após foi transferida para um balão volumétrico PHOX® de 100 mL de capacidade. O volume do balão foi completado com etanol para 100 mL, e a solução foi homogeneizada. Finalmente, a solução foi armazenada em frasco conta-gotas apropriado.

c) Padronização da solução HCl:

Foram pesados 1,90 g de Bórax ou Tetraborato de sódio (SIGMA-ALDRICH®, CAS 1303-96-4) em erlenmeyer PYREX® de 250 mL, e em triplicata. Foram acrescentados 100 mL de água destilada e 3 gotas de indicador fenolftaleína em cada erlenmeyer. Titulou-se o bórax com a solução de HCl, com o auxílio de uma bureta PHOX® de 50 mL de capacidade. Calculou-se a concentração real da solução do HCl.

d) Preparo da solução etanólica de KOH 4%:

Pesou-se 23,53 g de KOH 85 % em lentilhas (SIGMA-ALDRICH®, CAS N° 1310-58-3) em um béquer VIDROLABOR® de 500 mL de capacidade. Acrescentou-se 300 mL de etanol. Para completa dissolução do hidróxido de potássio em etanol, levou-se a solução em sistema de ultrassom. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico PHOX® de 500 mL de capacidade, e o volume do balão foi completado com etanol. Em seguida, fez-se a homogeneização da solução.

e) Titulação da amostra saponificada de óleo com solução de HCl:

Aproximadamente, 4 g de óleo foram pesados em erlenmeyer Científica® de 250 mL e em triplicata. A seguir, foram adicionados 50 mL de solução etanólica de KOH 4% em cada erlenmeyer. O erlenmeyer foi conectado a um condensador, e deixado ferver suavemente até a completa saponificação da amostra (aproximadamente 1 hora a 90 °C). Após o resfriamento do frasco, a parte interna do condensador foi lavada com um pouco de água destilada.

Desconectou-se o erlenmeyer do condensador e 3 gotas do indicador foram adicionadas. A titulação foi executada com a solução de ácido clorídrico 0,5 mol/L até o desaparecimento da cor rósea. As titulações de três provas em branco também foram executadas (realizou-se todo o procedimento acima descrito, mas sem a presença de amostra teste). Em todas as titulações foi utilizada agitação magnética, com o auxílio do agitador magnético Fisatom[®] modelo 7524.

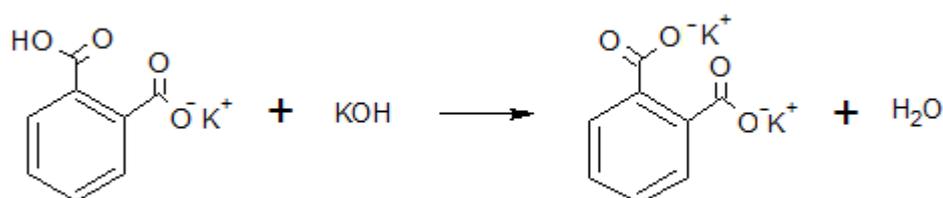
3.2.4 Índice de acidez (IA)

O índice de acidez (IA) é a quantidade de alcáli necessária (geralmente em mg de KOH ou NaOH), para neutralizar os ácidos graxos livres presentes em 1 g de amostra teste.

Isso significa que o índice de acidez é diretamente relacionado à quantidade de ácidos graxos livres presente na amostra. Além disso, pode ser uma indicação de que esteja ocorrendo uma reação de hidrólise, oxidação, ou fermentação. Isso porque essas reações são acompanhadas da alteração na concentração de íons hidrogênio (NASCIMENTO; COSTA NETO; MAZZUCO, 1999).

A norma AOCS Official Method Cd3d-63 é aplicável a óleos brutos e refinados, vegetais e animais, e gorduras animais (incluindo óleos e gorduras marinhos), e para vários produtos derivados deles (AOCS, 2009). O procedimento prático do índice de acidez possui três etapas: A padronização da solução de KOH, a titulação das amostras de óleo, e as titulações dos brancos. A padronização da solução de KOH com o biftalato de potássio acontece de acordo com a seguinte reação química:

Equação 3.8 – Padronização da solução de KOH com o biftalato de potássio.



Pode-se observar que um mol de Biftalato de potássio reage com um mol de KOH. Assim, a concentração real da solução de KOH foi encontrada pelo cálculo da Equação 3.9.

Equação 3.9 – Cálculo para encontrar a concentração real da solução de KOH.

$$M_{KOH} (mol / L) = \frac{m_{biftalato} (g)}{V_{KOH} (L) \times MM_{biftalato} (g / mol)}$$

Assim, tendo-se a molaridade real da solução de KOH utilizada e os volumes gastos na titulação das amostras e dos brancos, foi possível calcular o índice de saponificação da amostra de óleo de acordo com a Equação 3.10.

Equação 3.10 – Cálculo do índice de acidez.

$$IA (mg_{KOH} / g_{\text{óleo}}) = \frac{[v_{\text{óleo}} - V_{\text{branco}}] (mL) \times M_{KOH} (mol / L) \times 56,11 (g / mol)}{m_{\text{óleo}} (g)}$$

O Índice de acidez (AOCS Official Method Cd3d-63) foi executado de acordo com o seguinte procedimento:

- a) Preparação da solução de KOH de concentração de aproximadamente 0,1 mol/L:

Foram pesados aproximadamente 5,6 g de KOH (SIGMA-ALDRICH®, CAS N° 1310-58-3) em béquer VIDROLABOR® de 1 L de capacidade, contendo previamente 600 mL de isopropanol anidro HPLC (TEDIA®, CAS N° 67-63-0). Para completa dissolução do hidróxido de potássio em etanol, levou-se a solução em sistema de ultrassom. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico PHOX® de 1L de capacidade, e completou-se o volume do balão com isopropanol. Em seguida fez-se a homogeneização da solução.

b) Padronização da solução de KOH com biftalato de potássio:

Aproximadamente 1 g de biftalato de potássio foi seco em mufla EDG[®] 3P-S a 120 °C por 30 minutos. Foram pesados aproximadamente 0,204 g de biftalato de potássio em erlenmeyer PYREX[®] de 250 mL, em triplicata. A seguir, foram adicionados 100 mL de água destilada em cada erlenmeyer e 3 gotas do indicador fenolftaleína. A titulação foi executada com a solução alcoólica de KOH até o aparecimento de cor rósea permanente por mais de 30 segundos.

c) Titulação das amostras de óleo com solução alcoólica de KOH:

Aproximadamente 1 g de óleo foi pesado em erlenmeyer PYREX[®] de 250 mL e em triplicata. A seguir, foram adicionados 10 g (aproximadamente 25 mL) de solução de isopropanol/tolueno 1:1 em cada erlenmeyer. A seguir, foram adicionadas 3 gotas do indicador fenolftaleína. A titulação foi executada com a solução alcoólica de KOH padronizada, até o aparecimento de cor rósea permanente por mais de 30 segundos. As titulações de três provas em branco também foram executadas, realizando todo o procedimento anterior, mas sem a presença de amostra teste. Tanto na padronização, quanto nas titulações foi utilizada agitação magnética, com o auxílio do agitador magnético Fisatom[®] modelo 7524.

Nota: Alguns trabalhos na literatura apresentam o índice de acidez como porcentagem em ácido oléico. A relação de conversão entre o índice de acidez com o ácido oléico é a seguinte: 1 unidade do índice de acidez (mg da base/grama de amostra), corresponde a 0,503% de ácido graxo livre medido como oléico (BELLAVAR; ZANOTTO, 2004).

3.2.5 Índice de iodo (II)

O índice de iodo (II) é a medida do grau de insaturação de um óleo ou gordura. Ou seja, quanto maior o grau de insaturação e/ou maior a quantidade de ácidos graxos insaturados, maior é o índice de iodo da amostra teste. Esse parâmetro é medido em número de gramas de iodo (I) que reagem a cada 100 g de amostra (ou centigramas de iodo absorvidos por 1 g de amostra).

A ligação do elemento iodo, assim como de outros halogênios, acontece nas ligações etilênicas dos ácidos graxos (reações de halogenação), produzindo derivados cis/trans-saturados. Por esse motivo, esse método não é aplicável a óleos e gorduras que contenham ácidos graxos com insaturações conjugadas (NASCIMENTO; COSTA NETO; MAZZUCO, 1999).

Como o iodo é pouco reativo, é comum o uso da solução de iodo-cloro (ICI) preparada segundo Wijs (solução acética que contém iodo / cloreto de iodo), na qual se deve adicionar ainda uma solução de iodeto de potássio (KI), antes da titulação.

O índice de iodo é importante na caracterização de matérias graxas, pois é uma medida do teor de ácidos graxos insaturados, da suscetibilidade à rancidez oxidativa, do controle necessário ao processo de hidrogenação, além de auxiliar na verificação de adulterações em óleos e gorduras.

O cálculo do índice de iodo (II) é feito conforme Equação 3.11, na qual V_{branco} e $V_{óleo}$ correspondem aos volumes de titulante para titular as amostras do branco e da matéria graxa, $M_{Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O}$ é a massa usada de tiosulfato de sódio pentahidratado, e $m_{óleo}$ é a massa de matéria graxa utilizada.

Equação 3.11 – Cálculo do índice de iodo.

$$II(g_{I_2} / 100g_{óleo}) = \frac{[V_{branco} - v_{óleo}](mL) \times M_{Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O} (mol / L) \times 12,69}{m_{óleo} (g)}$$

O índice de iodo foi determinado conforme a norma AOAC 993.20, de acordo com o seguinte procedimento:

a) Preparação da solução de tiosulfato de sódio 0,1 mol/L:

Foram adicionados, 24,9 g de tiosulfato de sódio pentahidratado ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) (Synth[®] P. A., CAS N^o. 10102-17-7) em um béquer de 1L VIDROLABOR[®], foram adicionados aproximadamente 600 mL de água destilada aquecida até início da ebulição. Dissolveu-se o tiosulfato de sódio através da agitação leve com bastão de vidro, e transferiu-se a solução para um balão volumétrico PHOX[®] de 1 L de capacidade. O volume do balão foi completado com água destilada aquecida para 1 L, e a solução foi homogeneizada. A solução foi deixada em repouso por 24h.

b) Preparo da solução de KI 10% m/v:

Foram adicionados 50 g de KI (SIGMA-ALDRICH[®], CAS N^o. 7681-11-0) em um béquer PHOX[®] de 500 mL. Foram adicionados 300 mL aproximadamente, de água destilada. Dissolveu-se o iodeto de potássio através da agitação leve com bastão de vidro, e transferiu-se a solução para um balão volumétrico PHOX[®] de 500 mL de capacidade. O volume do balão foi completado com água destilada e a solução foi homogeneizada.

c) Padronização da solução de tiosulfato de sódio com dicromato de potássio:

O dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) (VETEC[®], CAS N^o. 7778-50-9) foi seco na mufla EDG[®] 3P-S a 120 °C, a 30 °C/minuto, durante 2 horas. Em seguida deixou-se em repouso em dessecador. Em triplicata, pesou-se aproximadamente 0,1225 g de dicromato de potássio em béquer PHOX[®] de 250 mL. Foram adicionados em cada béquer, 100 mL de água destilada, 5 mL HCl 37% (TEDIA[®], CAS N^o. 7647-01-0), 20 mL de solução aquosa de KI 10%. Aguardou-se 5 minutos em repouso. Procedeu-se a titulação potenciométrica da solução com dicromato de potássio em titulador potenciométrico (Potentiometric Automatic Titrator AT-500N) e obteve-se a concentração real da solução de tiosulfato de sódio.

d) Preparação da solução de ciclohexano/ácido acético 1:1:

Para cada 200 mL de solução preparada, foram adicionados 100 mL de ciclohexano P.A. (NEON[®], CAS N^o. 110-82-7) e 100 mL de ácido acético glacial 99,8% P.A. (NEON[®], CAS N^o. 64-19-7), com o auxílio de uma proveta VIDROLABOR[®] de 100 mL de capacidade.

e) Titulação dos brancos:

Em triplicata, foram adicionados em béquer PHOX[®] de 400 mL de capacidade, os volumes de 20 mL da solução ciclohexano/ácido acético e 25 mL de solução de iodo-cloro segundo Wijs (SYNTH[®], CAS N^o. 7790-99-0). Para a transferência dos volumes, foram utilizadas pipetas volumétricas PHOX[®] de 20 e 25 mL. Cada mistura preparada repousou durante 1 hora no escuro (foi coberta com papel alumínio e descansou em um armário fechado).

Após esse período, foi adicionado a cada mistura de branco, 20 mL de solução de KI e 150 mL de água destilada. Os brancos foram então titulados em titulador potênciométrico, obtendo-se os volumes gastos nas titulações.

f) Titulação das amostras:

Em triplicata, foram pesadas aproximadamente 0,14 g de amostra. Tal massa de amostra foi pesada em béquer PHOX[®] de 400 mL de capacidade. Logo após, foram adicionados os volumes de 20 mL da solução ciclohexano/ácido acético e 25 mL de solução de iodo-cloro segundo Wijs (SYNTH[®], CAS N^o. 7790-99-0). Para a transferência dos volumes foram utilizadas pipetas volumétricas PHOX[®] de 20 e 25 mL. Cada mistura preparada foi coberta com papel alumínio e colocada para repousar em um armário fechado, no escuro, durante 1 hora. Após esse período foi adicionado a cada mistura de branco, 20 mL de solução KI e 150 mL de água destilada. As amostras foram então tituladas com solução de tiosulfato de sódio, em titulador potênciométrico para obtenção do índice de iodo (II).

Notas: Por ser de difícil preparação, o reagente de Wijs foi adquirido no comércio. As soluções de Wijs devem ser acondicionadas em frasco âmbar, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz e da umidade (NASCIMENTO, COSTA NETO, MAZZUCO, 1999). A titulação manual geralmente utiliza como indicador visual, a solução de amido a 1%.

3.2.6 *Massa específica ou densidade (d)*

A massa específica ou densidade é uma característica de uma substância ou composto, relacionada à massa (g ou Kg), que ocupa um determinado volume (cm³ ou m³), em uma dada temperatura. Ela é um dado que pode auxiliar na manipulação prática da matéria graxa.

A massa específica foi obtida por meio de um densímetro digital ANTON PAAR[®], modelo DMA 4500 M, que possui faixa de uso de 718 Kg/m³ a 998 Kg/m³. O ensaio foi feito tendo as amostras em seu estado inicial na temperatura ambiente. A temperatura utilizada no ensaio durante as medidas foi de 15 °C.

Após ligar o densímetro, antes da injeção da amostra, é feita uma limpeza no canal do equipamento, com aproximadamente, 6 mL de n-heptano P.A. (SYNTH[®], CAS N^o: 142-82-5) e logo após, 6 mL de acetona P.A. (NEON[®], CAS N^o. 67-64-1). A secagem do canal com ar é feita no próprio equipamento. Todo esse procedimento de limpeza foi feito após cada mudança de tipo de óleo.

Em seguida, seleciona-se o método para óleos e escreve-se o nome da amostra em teste. Finalmente, a amostra de óleo é injetada no canal, com o auxílio de uma seringa hipodérmica estéril de uso único, para uso manual (Saldanha Rodriguez, SR[®], de 3 mL de capacidade), evitando a formação de bolhas.

Em primeiro lugar, foi feita a ambientação da amostra de óleo e logo após as medidas das três replicatas. Foram necessários cerca de 6 mL da amostra de óleo para ambientação, e cerca de 1,5 mL para cada replicata. Os resultados são dados pelo equipamento em g/cm³ ou em Kg/m³.

3.2.7 Viscosidade cinemática (v_c)

A viscosidade cinemática a 40 °C foi realizada de acordo com a NBR 10441 (ABNT, 2007), em um sistema automatizado de medida da viscosidade cinemática TANAKA[®] Scientific Ltd, modelo AKV-202.

A viscosidade cinemática é a resistência ao fluxo de um fluido sob a ação da força da gravidade. Neste caso, uma medida relativa à resistência do escoamento do óleo no tubo do viscosímetro. Quanto maior essa resistência de escoamento, maior o valor numérico da viscosidade cinemática. A faixa de trabalho coberta pela norma NBR 10441, vai de 0,2 mm²/s a 300.000 mm²/s.

A viscosidade é importante nos sistemas hidráulicos, no fluxo em tubulações, e na redução de atrito em sistemas de lubrificação. No setor automotivo, por exemplo, a viscosidade da película lubrificante é determinante para evitar o desgaste entre as superfícies metálicas.

O método se resumiu na determinação do tempo, em segundos, para um volume fixo escoar por gravidade através do capilar de um viscosímetro calibrado, a uma temperatura rigorosamente controlada; sendo a viscosidade cinemática, o produto do tempo de escoamento medido pela constante de calibração do

viscosímetro. O resultado da viscosidade cinemática encontrado foi a média entre duas determinações aceitáveis (ABNT, 2007).

3.2.8 *Estabilidade oxidativa e tempo de indução (t_i)*

Estabilidade oxidativa é a resistência de um óleo ou gordura à oxidação e indica a qualidade dos mesmos. O método de indução da estabilidade oxidativa por equipamento Rancimat Metrohm® envolveu a exposição da amostra de derivados de óleos e gorduras, a uma vazão de ar e a uma temperatura constante ($110\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$), de acordo com a norma europeia EN 14112:2003 (CEN, 2003). Foram utilizados cerca de 3 g de óleo em cada replicata.

Esse processo de indução dá origem a produtos de oxidação secundária, altamente voláteis (na maior parte, ácido fórmico), que são transferidos com a vazão de ar para o recipiente de medição contendo água destilada. Assim, os ácidos orgânicos ou produtos de oxidação secundária, podem ser detectados no recipiente de medição por acréscimo de condutividade. O tempo em que ocorre essa detecção é referente ao tempo de indução ou período de indução, o qual é um bom indicador da estabilidade oxidativa (CEN, 2003, METROHM, 2008).

3.2.9 Composição em ácidos graxos

Para a análise cromatográfica do perfil de ácidos graxos do óleo de peixe, fez-se a transesterificação do óleo de peixe de acordo com uma adaptação para microescala (ANTONIOSI-FILHO, 1995) do método desenvolvido por Hartman e Lago (HARTMAN, L.; LAGO, 1973), visando analisar os ácidos graxos na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos (Fatty Acid Methyl Esters - FAME).

Óleos e gorduras contém ácidos graxos presentes preponderantemente como triacilgliceróis (TAG). Os TAG são ésteres de ácidos graxos ligados ao glicerol. Os ácidos graxos integrantes dos triacilgliceróis podem ter diferentes tamanhos de cadeia carbônica e graus de insaturação. O método Hartman e Lago é rápido e eficaz. Ele promove a derivatização dos triacilgliceróis em ésteres metílicos de ácidos graxos. Isso pode ser feito através da reação dos triacilgliceróis com metanol em presença de catalisador ácido ou básico (HARTMAN, L.; LAGO, 1973; SANTOS; PINTO, 2009).

A transesterificação é importante porque ésteres metílicos de ácidos graxos são mais voláteis e menos polares que triacilgliceróis, sendo portanto, analisados por cromatografia gasosa a temperaturas de forno inferiores às necessárias para análise de triacilgliceróis.

Procedimento da transesterificação do óleo:

- a) Preparo da mistura esterificante: Foram adicionados cerca de 3,33 g de cloreto de amônio P. A. (NEON[®], CAS N^o. 12125-02-9) a 90 mL de metanol (TEDIA[®], CAS N^o. 67-56-1), seguido pela adição de 5,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (MERCK[®], CAS N^o. 7664-93-9). A mistura, contida em erlenmeyer PHOX[®] de 250 mL de capacidade, adaptado a um condensador VIDROLABOR[®] de 50 mL de capacidade, foi mantida em refluxo sob agitação por 30 min. Após o refluxo, esperou-se o resfriamento da mistura. Em seguida, a solução foi transferida com o auxílio de um funil de vidro pequeno, para um balão volumétrico de 100 mL BRAND[®] e o volume foi acertado com metanol.

b) Preparo da solução básica de hidróxido de sódio:

Em um béquer de 100 mL de capacidade PHOX[®], foram pesados 2,0 g de NaOH (Hidróxido de sódio em lentilhas P.A. NEON[®], CAS N^o. 1310-73-2). Logo após foram adicionados 80 mL de metanol (TEDIA[®], CAS N^o. 67-56-1). Agitou-se até a completa dissolução do NaOH no metanol. A solução foi transferida com o auxílio de um funil de vidro pequeno, para um balão volumétrico de 100 mL BRAND[®], e o volume foi acertado com metanol. A solução foi estocada em um frasco de plástico com tampa.

c) Transesterificação direta:

Em um tubo de ensaio autoclavável de 20 mL, foram pesados cerca de 35 mg do óleo (aproximadamente três gotas). A seguir, adicionou-se 0,5 mL de solução básica 0,5 mol/L de hidróxido de sódio em metanol seco (TEDIA[®]), e aqueceu-se o tubo de ensaio por 10 min em banho-maria a 90 °C. Resfriou-se o tubo de ensaio em banho de gelo, e adicionou-se 1,5 mL da mistura esterificante previamente preparada segundo o procedimento descrito anteriormente. Aqueceu-se novamente o tubo de ensaio por 10 min em banho-maria a 90 °C. Resfriou-se o tubo de ensaio em banho de gelo, e adicionou-se 5 mL de n-heptano (TEDIA[®], CAS N^o. 142-82-5) e 10 mL de água destilada. Agitou-se o tubo de ensaio por 1 minuto em vortex IKA[®], e o sistema ficou em repouso até a separação de fases. A fase heptânica foi coletada com pipeta tipo Pasteur e analisada por Cromatografia Gasosa.

Procedimento de análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos:

Os FAME foram identificados por análises via Cromatografia Gasosa de Alta Resolução acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS), usando um Cromatógrafo a Gás modelo Shimadzu[®] 17A acoplado a Espectrômetro de Massas QP-5050 Shimadzu, com interface a 280 °C. O gás de arraste utilizado nos ensaios foi o hélio, a velocidade linear de 42 cm/s. As condições operacionais para forno, injetor, e coluna capilar, foram as mesmas utilizadas para HRGC-FID (Tabela 3.1).

Os componentes da amostra foram identificados pela análise de espectros de massas; e comparação com dados de biblioteca NIST; e também por comparação a amostras de composição conhecida, tais como o óleo de soja e amendoim; bem como pela análise de padrões de referência de FAME (NuCheck Prep®).

Para análise da composição de FAME e cálculo do teor de éster foram utilizadas as condições descritas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Condições experimentais cromatográficas utilizadas na análise de composição de ácidos graxos na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos.

Condição cromatográfica	Especificações		
Cromatógrafo	AGILENT® 7890		
Detector	FID		
Temperatura no detector	310 °C		
Coluna	Capilar DB-WAX		
Dimensões da coluna	30 m x 0.25 mm x 0.25 µm		
Modo do Injetor	Split		
Razão de split	10:1		
Temperatura no injetor	310 °C		
Volume de injeção	1 µL		
Gás de arraste	Hidrogênio 5.0		
Velocidade linear do gás de arraste	40 cm/s		
Gás make-up auxiliar	Nitrogênio 5.0		
Vazão do gás make-up auxiliar	20 mL/min		
Programação do forno	Temperatura inicial	70 °C	Permanência de 0 min
	Rampa 1	10 °C/min até 240 °C	Permanência de 13 min
	Rampa 2	5 °C/min até 250 °C	2 min
Tempo total de corrida	34 min		

Fonte: Elaborada pela Autora.

3.2.10 *Análise de triacilgliceróis*

A análise de triacilgliceróis por cromatografia gasosa capilar a altas temperaturas (HT-CGC) foi feita de acordo com a metodologia desenvolvida por Prados e colaboradores (PRADOS et al., 2012), mediante as condições descritas na Tabela 3.2. As amostras de óleo foram preparadas na concentração de 10 mg/mL, diluídas em n-Heptano.

Tabela 3.2 – Condições cromatográficas para análise de triacilgliceróis por HT-CGC.

Condição cromatográfica	Especificações		
Cromatógrafo	AGILENT® 7890		
Detector	FID		
Temperatura no detector	385 °C		
Coluna	Capilar apolar DB-5HT		
Dimensões da coluna	25 m x 0,25 mm x 0,1 µm		
Modo do Injetor	Split		
Razão de Split	20:1		
Temperatura no injetor	360 °C		
Volume de injeção	1 µL		
Gás de arraste	Hidrogênio 5.0		
Vazão do gás de arraste	1,4 mL/min		
Gás make-up auxiliar	Nitrogênio 5.0		
Vazão do gás make-up auxiliar	30 mL/min		
Programação do forno	Temperatura inicial	60 °C	Permanência de 1,5 min
	Rampa 1	25 °C/min até 110°C	Permanência de 1,0 min
	Rampa 2	25 °C/min até 215 °C	Permanência de 5,0 min
	Rampa 3	25°C/min até 350 °C	Permanência de 0 min
	Rampa 4	10 °C/min até 385 °C	Permanência de 2,4 min
Tempo total de corrida	25 min		

Fonte: Elaborada pela Autora.

3.2.11 *Análises por Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

Visando avaliar as temperaturas dos eventos de fusão ou de fracionamento de grupos de componentes pelo grau de instauração, fizeram-se análises por DSC de resfriamento e aquecimento do óleo de filé e do óleo de resíduos de peixe.

Tais análises foram realizadas em equipamento modelo 822^o da Mettler Toledo[®]. Foi realizada uma curva dinâmica com intervalo de temperatura de 25 °C a -70 °C. A razão de resfriamento ou de aquecimento foi de 2 °C/min. Foi utilizada uma atmosfera de ar a uma vazão de 50 mL/min e um cadinho de alumínio com tampa com furo. Todas as amostras foram pesadas em cerca de 5 mg.

Os dados obtidos por DSC foram utilizados para avaliar a possibilidade de fracionamento das amostras de óleos de peixe via resfriamento.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Rendimentos

Ambos os óleos obtidos apresentaram coloração escura, sendo que a porcentagem de rendimento da extração do óleo de resíduos foi de 53%, enquanto que a de filé foi de 33%, o que mostra que os resíduos do peixe contêm mais lipídeos que o filé. Os resíduos de peixe são ricas fontes de matérias graxas, superior aos obtidos para oleaginosas convencionais para a produção de biodiesel como a soja (18 a 20%), canola (40 a 50%), palma (25 a 50%), e macaúba (40 a 50%) (ANTONIASSI; FREITAS, 2017). A porcentagem de água presente na massa de peixe que vai ao soxhlet foi de 0,01% para os resíduos, e de 0,00% para o filé.

3.3.2 Propriedades físico-químicas

Os resultados das análises físico-químicas para os óleos de resíduos e de filé do peixe *Clupea harengus* são descritos na Tabela 3.3.

Tabela 3.3 – Resultados das análises físico-químicas para os óleos de resíduos e de filé de peixe *Clupea harengus*.

Análises físico-químicas	Matéria-prima	
	Óleo de resíduos	Óleo de filé
Índice de Saponificação (mg KOH/g)	254,77 ± 0,34 ^b	302,29 ± 0,35 ^a
Índice de Acidez (mg KOH/g)	7,68 ± 0,02 ^b	8,73 ± 0,01 ^a
Índice de Iodo (gI ₂ /100 g)	125,46 ± 0,09 ^b	125,95 ± 0,06 ^a
Massa Específica (Kg/m ³)	890,22 ± 0,13 ^a	888,92 ± 0,02 ^b
Viscosidade (mm ² /s)	39,96 ± 0,07 ^a	34,05 ± 0,11 ^b
Período de Indução (h)	2,87 ± 0,03 ^a	0,86 ± 0,03 ^b

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p = 0,05$), $n = 3$.

O índice de saponificação obtido é maior que a faixa já relatada para o óleo de arenque (*Clupea harengus*), de 161 a 192 mg KOH/g (YOUNG, 1986). Além disso, por meio do índice de saponificação (IS) do óleo proveniente dos resíduos e do filé, inferiu-se que a massa molar do óleo de resíduos (661 g/mol) é maior do que o do óleo de filé (557 g/mol). A massa molar encontrada para o óleo proveniente de cabeças de carpa (*Cyprinus carpio*), por exemplo, foi de 833 g/mol (CREXI, VALÉRIA T. *et al.*, 2012).

Pelo índice de saponificação, foi obtida a concentração do catalisador KOH em porcentagem de 25% (m KOH/m), ou seja, 25,477 g de KOH a cada 100 g de óleo. Essa é uma das variáveis a serem testadas na otimização da reação de hidrólise do óleo de peixe para a obtenção de ácidos graxos livres.

A ANVISA em seus requisitos específicos para comercialização de óleos, gorduras, e cremes vegetais (ANVISA, 2015), estipula que o índice de acidez de óleos e gorduras refinados deve ser no máximo de 0,6 mg KOH/g; já óleos prensados a frio e não refinados podem apresentar o máximo de 4,0 mg KOH/g. De acordo com alguns autores (JENSEN; FISKEINDUSTRI; DENMARK, 1990), o valor recomendado para o índice de acidez do óleo bruto de peixe não deve exceder a 5 mg KOH/g.

O índice de acidez (IA) do óleo de resíduos de peixe (7,68 mg KOH/g) e o do óleo proveniente do filé (8,73 mg KOH/g) são elevados, o que indica a presença de grandes quantidades de ácidos livres em sua constituição, provavelmente formados no processo de secagem em estufa dos materiais cárneos para remoção da água, no qual a hidrólise de TAG pode ocorrer via aquecimento na presença de água.

Para efeito de comparação, a extração do óleo de vísceras pelo método Bligh e Dyer do peixe *Clupea harengus*, produz um óleo de acidez $5,11 \pm 0,06$ mg KOH/g; e a extração enzimática (enzima alcalase a 2%, pH 7,5, 55 °C), gera um óleo com acidez de $11,13 \pm 0,46$ mg KOH/g (MOHANARANGAN, 2012).

Ainda como comparação, o índice de acidez do óleo de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*) (CREXI, VALÉRIA TERRA *et al.*, 2010) foi de aproximadamente 6,66 mg KOH/g, tendo sido adicionado antioxidante BHT anteriormente à obtenção do óleo (O hidroxitolueno butilado, ou BHT é um composto orgânico lipossolúvel e antioxidante usado como conservante ou aditivo nas indústrias de remédios,

combustível, borracha e taxidermia, e tem possível ação carcinogênica) (RAMALHO; JORGE, 2006).

Assim, caso o óleo bruto de peixe seja empregado como matéria-prima para a produção de biodiesel, necessitará da execução de uma etapa de esterificação ácida, antes da execução da transesterificação básica para conversão à biodiesel, visando reduzir a acidez do produto final já que, no Brasil, o limite de acidez no biodiesel é de 0,50 mg KOH/g (ANP, 2014).

O índice de iodo (II) do óleo de filé (125,95 $\text{gl}_2/100 \text{ g}$) é similar ao de óleo de resíduos (125,46 $\text{gl}_2/100 \text{ g}$), e estão na faixa já relatada para esse tipo de peixe (arenque), de 95 à 160 $\text{gl}_2/100 \text{ g}$ (YOUNG, 1986).

A massa específica do óleo de resíduos (890,22 Kg/m^3) é maior que a do óleo de filé (888,92 Kg/m^3), sendo que na literatura, a massa específica para o óleo de *Clupea harengus* foi relatada como sendo de 916,2 Kg/m^3 (YOUNG, 1986).

A viscosidade cinemática do óleo de resíduos de peixe (39,96 mm^2/s) é maior que a do óleo de filé (34,05 mm^2/s). Ambos os valores estão próximos às viscosidades encontradas para oleaginosas convencionais tais como: os óleos de soja refinado (~34 mm^2/s); girassol (~32 mm^2/s); ou amendoim (39,60 mm^2/s) (INOUE, 2004).

Já os óleos predominantemente saturados, possuem viscosidades mais altas, como o de crambe (50,16 mm^2/s), por exemplo. Essa diferença é explicada pelo maior número de insaturações nos ácidos graxos do óleo de peixe, os quais aparecem quase sempre na conformação *cis*; dificultando o alinhamento das moléculas e interações moleculares, deixando o óleo com um aspecto mais fluido e diminuindo a resistência do escoamento do óleo no tubo do viscosímetro. A conversão desses óleos à biodiesel faz com que a viscosidade diminua, indo de 3,0 a 6,0 mm^2/s .

A presença de ácidos graxos insaturados na constituição de um óleo, ou de um derivado como o biodiesel, favorece a oxidação e a consequente diminuição do tempo ou período de indução, pois as insaturações são altamente reativas ao oxigênio do ar. Assim, o tempo de indução baixo do óleo de resíduos e filé indica que estes óleos são altamente insaturados.

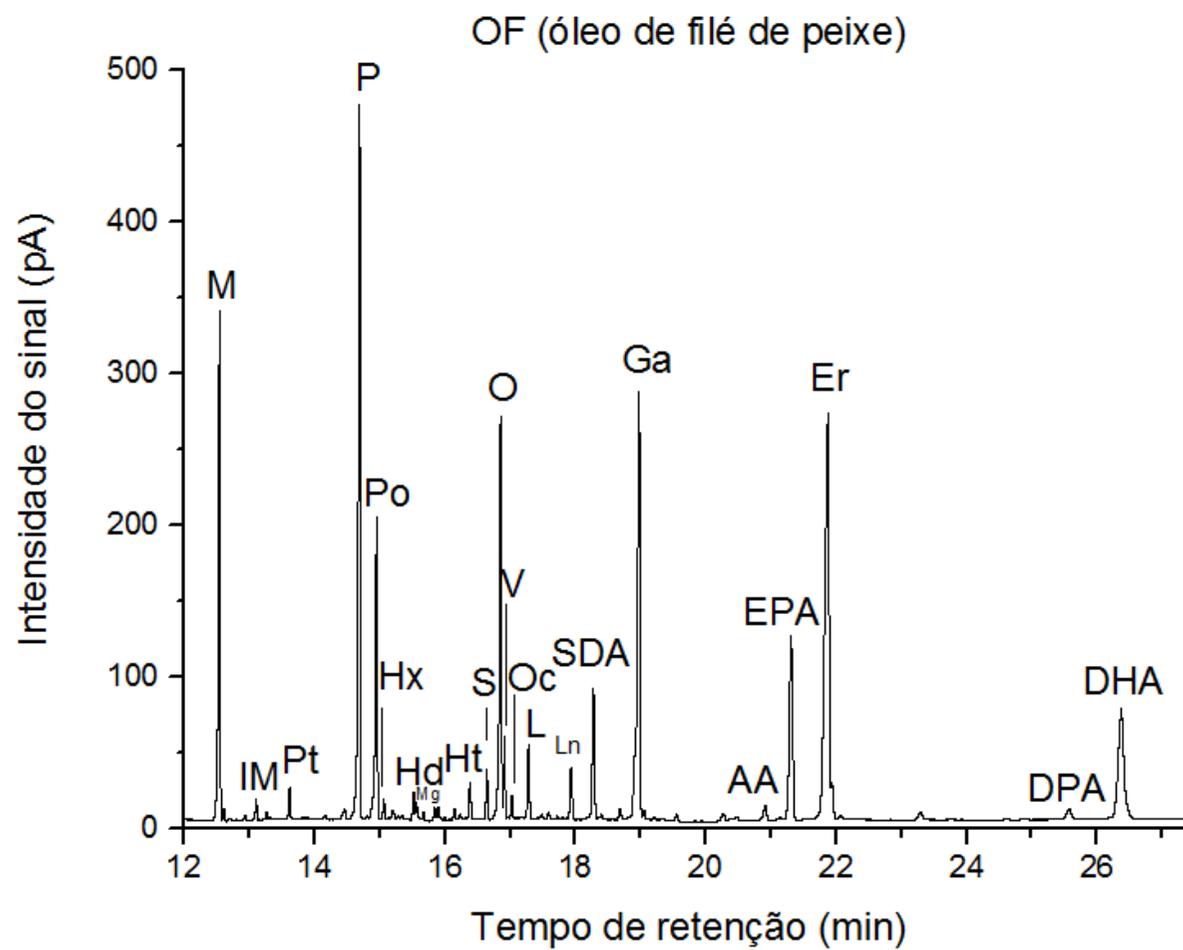
3.3.3 Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos dos óleos de resíduos e de filé de *Clupea harengus* é apresentada na Figura 3.9, Figura 3.10, Tabela 3.4, e Tabela 3.5.

Pode-se observar que o óleo de filé de peixe possui maior teor em ácidos graxos poli-insaturados, ω 3-PUFA, e de somatório em EPA+DPA+DHA. Entretanto, os teores totais de saturados e insaturados não são significativamente diferentes.

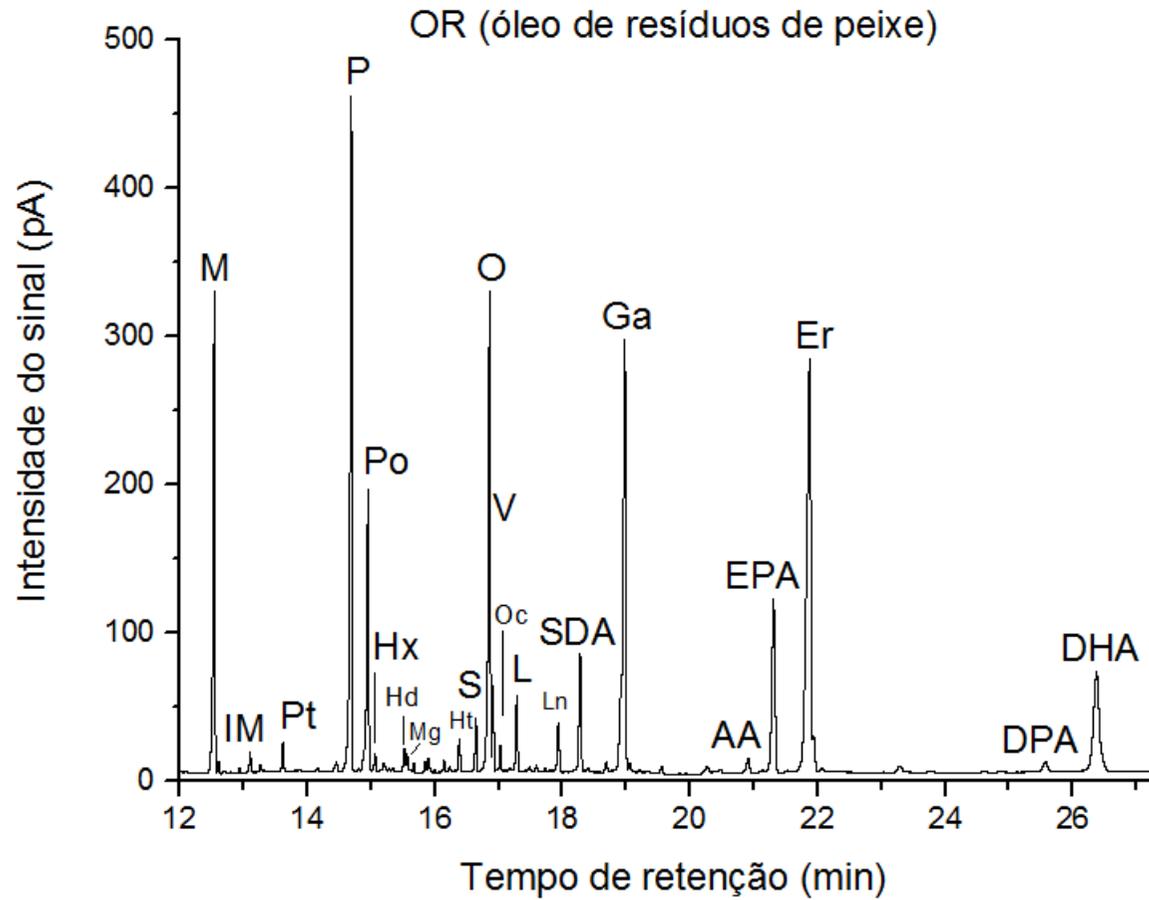
O isolamento dos PUFA no óleo de peixe, os quais possuem grande valor comercial como suplementos nutricionais; pode gerar como remanescente uma mistura de ácidos graxos bastante adequada para a produção de biodiesel, devido a maior quantidade de ácidos graxos saturados (SFA) e monoinsaturados (MUFA), acompanhado de baixos teores de ácidos graxos di-insaturados (DUFA) e tri-insaturados (TUFA).

Figura 3.9 – Cromatograma do óleo de filé de peixe (OF).



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 3.10 – Cromatograma do óleo de filé de peixe (OR).



Fonte: Elaborada pela Autora.

Tabela 3.4 – Composição em ácidos graxos dos óleos de resíduos de peixe (OR) e do óleo de filé de peixe (OF) da espécie *Clupea harengus*.

Ácidos graxos		Composição em ácidos graxos (%)	
Simbologia	Notação	OR	OF
C14:0	M	10,34 ± 0,68 ^a	9,71 ± 0,33 ^a
12-Me-C13:0	IM	0,38 ± 0,02 ^a	0,37 ± 0,01 ^a
C15:0	Pt	0,56 ± 0,03 ^a	0,53 ± 0,02 ^a
C16:0	P	15,42 ± 0,76 ^a	15,25 ± 0,46 ^a
C16:1(9) ω7	Po	6,41 ± 0,35 ^a	6,41 ± 0,19 ^a
C16:1	Hx	0,39 ± 0,03 ^a	0,36 ± 0,01 ^a
C16:2	Hd	0,51 ± 0,03 ^a	0,51 ± 0,03 ^a
C17:0	Mg	0,44 ± 0,02 ^a	0,35 ± 0,06 ^a
C16:4 (6,9,12,15) ω3	Ht	0,63 ± 0,02 ^a	0,71 ± 0,05 ^a
C18:0	S	1,05 ± 0,02 ^a	0,89 ± 0,02 ^b
C18:1 (9) ω9	O	10,62 ± 0,28 ^a	8,93 ± 0,10 ^b
C18:1 (11) ω7	V	1,55 ± 0,03 ^a	1,42 ± 0,03 ^b
C18:1(13)	Oc	0,49 ± 0,02 ^a	0,47 ± 0,01 ^a
C18:2(9,12) ω6	L	1,51 ± 0,03 ^a	1,46 ± 0,01 ^a
C18:3 (9,12,15) ω3	Ln	1,11 ± 0,03 ^a	1,21 ± 0,07 ^a
18:4 (6,9,12,15) ω3	SDA	2,81 ± 0,06 ^b	3,14 ± 0,05 ^a
C20:1(9) ω11	Ga	13,44 ± 0,28 ^a	13,33 ± 0,19 ^a
20:4 (5,8,11,14) ω6	AA	0,48 ± 0,01 ^b	0,51 ± 0,01 ^a
20:5 (5,8,11,14,17) ω3	EPA	6,03 ± 0,11 ^b	6,70 ± 0,07 ^a
22:1 (13) ω9	Er	18,95 ± 1,38 ^a	19,90 ± 0,79 ^a
22:5 (7,10,13,16,19) ω3	DPA	0,52 ± 0,04 ^a	0,57 ± 0,02 ^a
22:6 (4,7,10,13,16,19) ω3	DHA	6,33 ± 0,47 ^b	7,28 ± 0,28 ^a

Fonte: Elaborada pela Autora. Nota: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey (p = 0,05).

Tabela 3.5 – Composição percentual em área normalizada de ácidos graxos para óleos de resíduos de peixe (OR) e de filé de peixe (OF).

Tipos de ácidos graxos		Teor percentual em área normalizada (%)	
Classe lipídica	Notação	Óleo de resíduos (OR)	Óleo de filé (OF)
Saturados	SFA	28,19 ± 1,48 ^a	27,10 ± 0,86 ^a
Insaturados	UFA	71,81 ± 1,49 ^a	72,90 ± 0,85 ^a
Monoinsaturados	MUFA	51,86 ± 1,02 ^a	50,81 ± 0,66 ^a
Di-insaturados	DUFA	2,02 ± 0,06 ^a	1,97 ± 0,03 ^a
Tri-insaturados	TUFA	1,11 ± 0,03 ^b	1,21 ± 0,07 ^a
Poli-insaturados	PUFA	19,95 ± 0,47 ^b	22,09 ± 0,21 ^a
Ômega-3	ω3-PUFA	17,44 ± 0,51 ^b	19,61 ± 0,21 ^a
EPA+DPA+DHA	EPA+DPA+DHA	12,88 ± 0,62 ^b	14,55 ± 0,37 ^a

Fonte: Elaborada pela Autora.

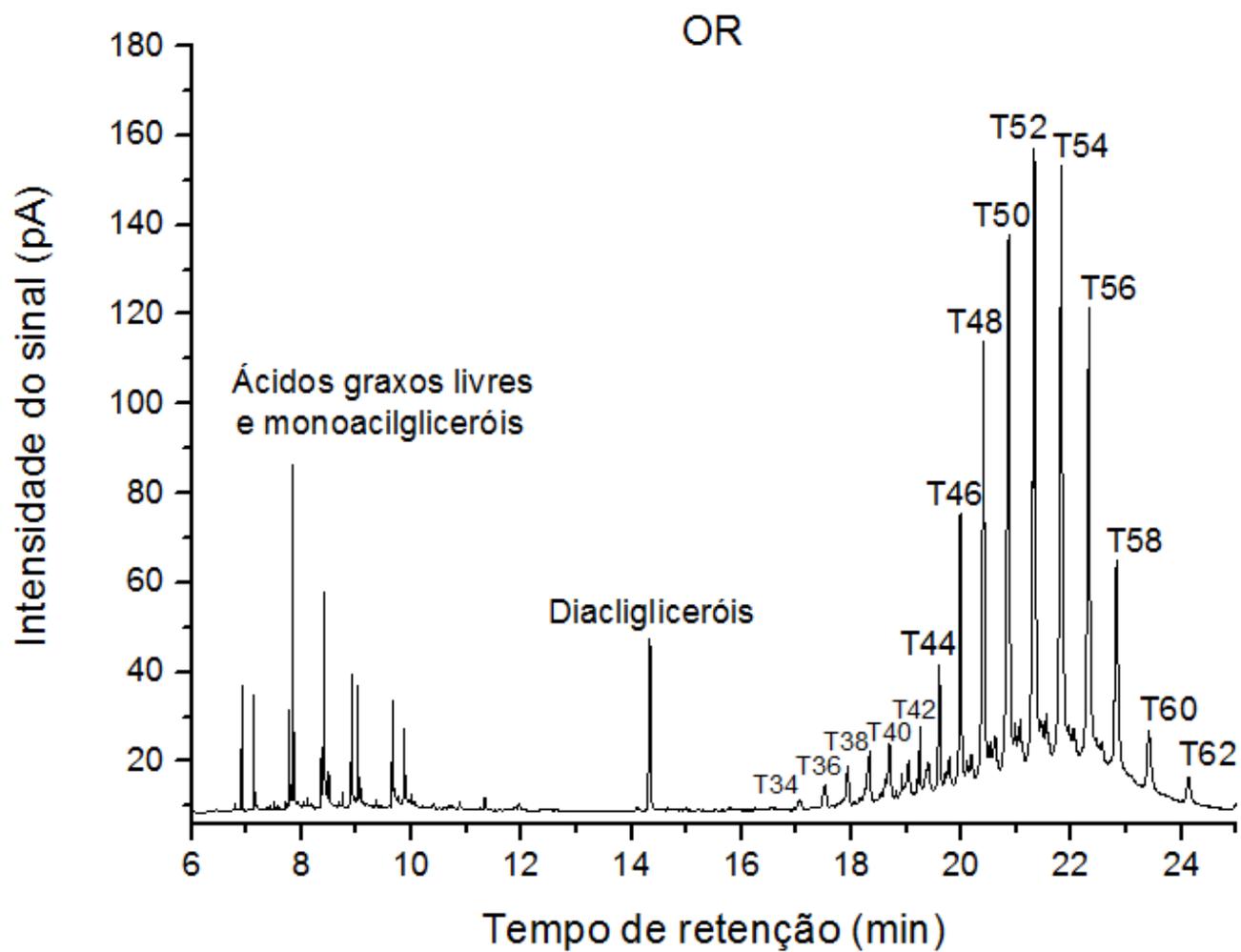
Nota: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p = 0,05$).

3.3.4 Análise de triacilgliceróis

A composição triacilglicerídica dos óleos OR e OF é mostrada na Figura 3.11, Figura 3.12, e Tabela 3.6. Pode-se observar que a análise por cromatografia gasosa separou as espécies moleculares pela somatória do número de átomos de carbono das cadeias de ácidos graxos dos triacilgliceróis.

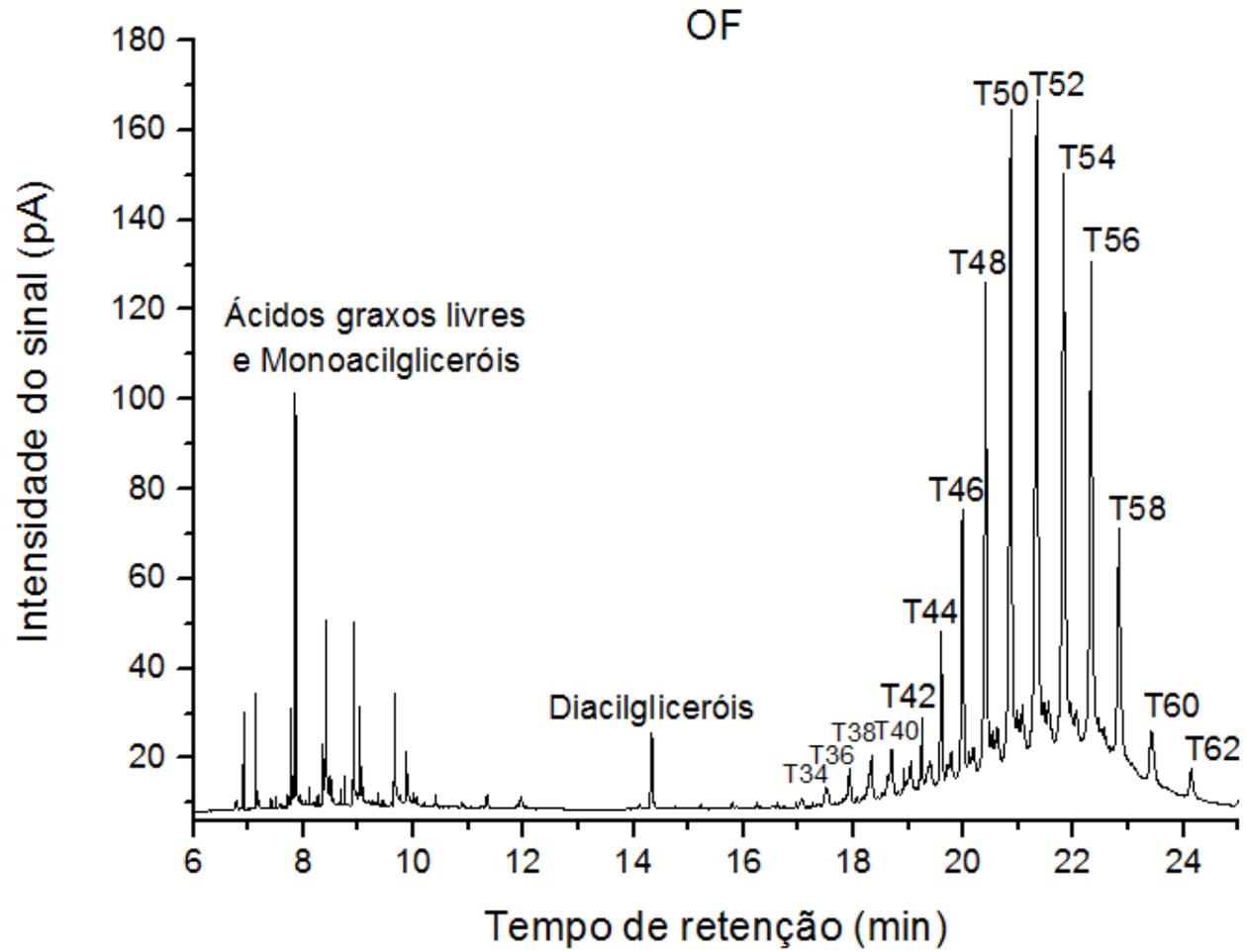
Assim, grupos moleculares de triacilgliceróis separadas por cromatografia gasosa são constituídos de diversas espécies moleculares formadas por combinações de ácidos graxos. Por exemplo, um triacilglicerol como o T52 é formado por espécies moleculares contendo o comprimento da cadeia carbônica de 52 carbonos, tais como POO, OOP, OPO (sendo P, o ácido palmítico e O, o ácido oléico) (SCRIMGEOUR, 2005).

Figura 3.11 – Cromatograma dos triacilgliceróis do óleo de resíduos de peixe.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 3.12 – Cromatograma dos triacilgliceróis constituintes do óleo de filé de peixe.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Tabela 3.6 – Composição em triacilgliceróis constituintes do óleo de resíduos de peixe (OR) e óleo de filé (OF).

Triacilglicerol	Teor (%)	
	Óleo de resíduos (OR)	Óleo de filé (OF)
TAG		
T34	0,84 ± 0,20	0,64 ± 0,16
T36	1,26 ± 0,35	0,95 ± 0,02
T38	1,63 ± 0,07	1,12 ± 0,20
T40	1,93 ± 0,58	1,09 ± 0,52
T42	0,96 ± 0,12	0,97 ± 0,03
T44	2,80 ± 0,20	2,63 ± 0,16
T46	5,98 ± 0,30	5,75 ± 0,16
T48	10,74 ± 0,22	10,63 ± 0,21
T50	15,63 ± 0,16	16,27 ± 0,50
T52	18,84 ± 0,50	19,87 ± 0,37
T54	17,71 ± 0,24	18,11 ± 0,54
T56	12,04 ± 0,02	12,99 ± 0,47
T58	6,39 ± 0,01	6,17 ± 0,32
T60	2,27 ± 0,02	1,99 ± 0,18
T62	0,95 ± 0,08	0,83 ± 0,00

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: Os teores são dados como média das três replicatas, e respectivos desvios padrão.

Os principais triacilgliceróis nos óleos de resíduos e filé peixe (Tabela 3.6) foram, respectivamente, em ordem decrescente: T52 (18,84%, 19,87%); T54 (17,71%, 18,11%); T50 (15,63%, 16,27%); T56 (12,04%, 12,99%); e T48 (10,74%, 10,63%). A causa é a elevada concentração de ácidos graxos de cadeia média tais como C14 e C16, os quais se combinam com ácidos C18, C20 e C22 para originar esses triacilglicerídeos. Também é importante notar que triacilgliceróis de cadeia longa estão presentes, tais como T60 (2,27%, 1,99%) e T62 (0,95%, 0,83%).

Entretanto, no óleo de peixe, tais triacilgliceróis de cadeia longa são formados pela presença de ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, por exemplo, o EPA (C20:5) ou DHA (C22:6); juntamente a ácidos graxos saturados de cadeia média, como mirístico (C14:0) ou palmítico (C16:0); e ácidos graxos

monoinsaturados como palmitoléico (C16:1), oléico (C18:1), gadoléico (C20:1) e erúcido (C22:1).

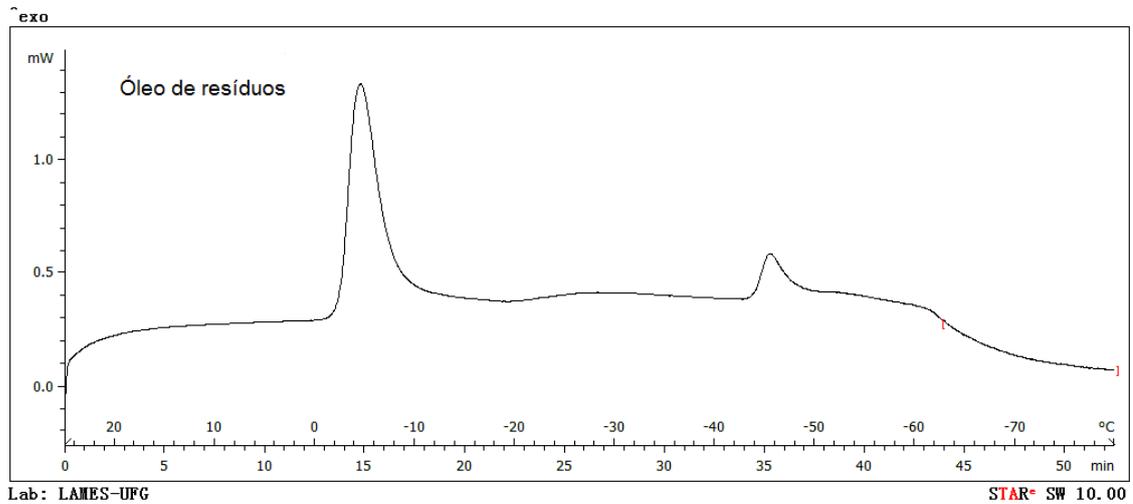
Desta forma, assumindo uma distribuição aleatória dos ácidos graxos (ANTONIOSI-FILHO, 1995), nos principais triacilgliceróis contendo ácidos graxos poli-insaturados, é grande a probabilidade de haver a presença de ácidos graxos saturados e/ou monoinsaturados, formando triacilgliceróis de alta similaridade em termos de propriedade físico-químicas. Isso significa que o fracionamento na forma desses triacilgliceróis, para isolamento de frações mais insaturadas, é de difícil realização.

3.3.5 *Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

As curvas de resfriamento dos óleos de resíduos e filé por DSC (Differential Scanning Calorimetry) possuem dois picos de eventos exotérmicos, correspondendo ao congelamento dos óleos. Pode-se observar que o óleo de resíduos (Figura 3.13) possui temperaturas dos picos em $-4,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-45,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, que correspondem às temperaturas de cristalização. As temperaturas de cristalização do óleo de filé (Figura 3.14) foram de $-3,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-45,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

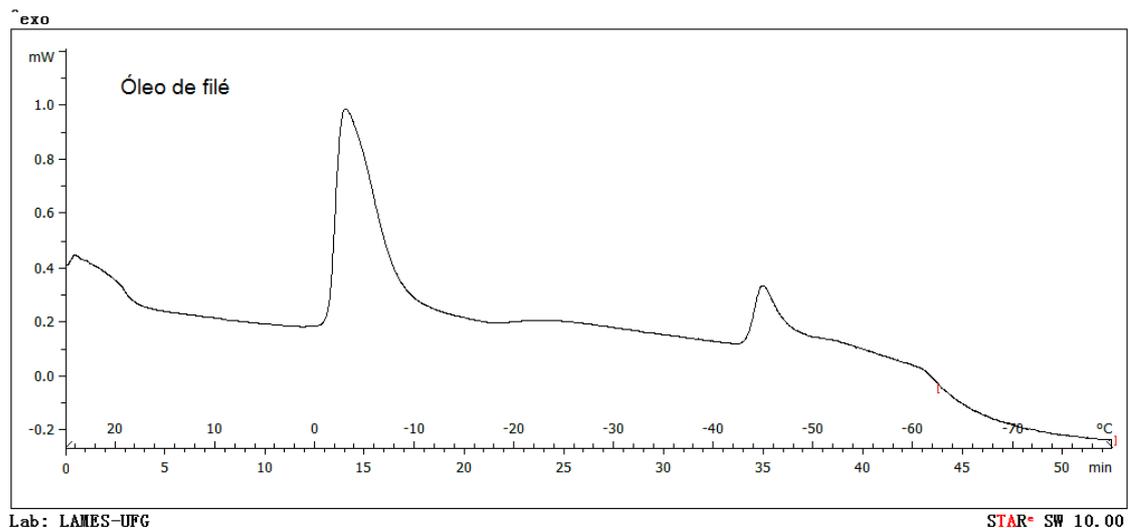
Em ambos os óleos, o primeiro pico possui visivelmente maior área que o segundo pico. Assim, conclui-se que grande parte da massa dos óleos congelaria totalmente, se submetida ao procedimento de winterização. Nesse caso, todo o óleo congelaria por arrastamento e, portanto, não haveria a possibilidade de separação e concentração de PUFA por essa técnica.

Figura 3.13 – Curva de DSC do óleo de resíduos de peixe.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 3.14 – Curva de DSC do óleo de filé de peixe.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Com base nos resultados obtidos por DSC, as amostras de óleos de filé e de resíduos de peixe foram submetidas à temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24h, período no qual as amostras foram totalmente congeladas/cristalizadas. Não houve a separação de fases líquida e sólida, corroborando assim para a afirmação de que a distribuição aleatória dos ácidos graxos dificultaria a separação de fases para amostras de óleos.

3.4 Conclusão

O aproveitamento de passivos ambientais, como os resíduos de pescado, é necessário para que a produção de pescado mundial ocorra de maneira sustentável; e conseqüentemente, promova a inclusão social, a geração de riqueza, e a redução dos impactos ambientais.

Assim, após a extração do óleo de *Clupea harengus* e sua caracterização, as análises indicaram que os resíduos possuem teores de óleo mais elevados que o filé. A elevada acidez e a cor escura dos óleos extraídos indicaram que os mesmos, antes de serem destinados ao consumo, devem ser submetidos ao refino com etapas de neutralização e branqueamento.

O elevado índice de iodo implica em baixa estabilidade oxidativa, o que indica que o uso desses óleos como nutracêuticos deve ser feito em cápsulas impermeáveis ao oxigênio, e preferencialmente escuras, para evitar com que a luz promova a foto-oxidação da matéria graxa.

Os elevados teores de ácidos graxos saturados e monoinsaturados, aliado aos adequados teores de ácidos graxos di-insaturados e tri-insaturados; fazem com que a separação desses, dos ácidos graxos poli-insaturados, represente uma excelente alternativa para a produção de nutracêuticos com a fração poli-insaturada, e de biodiesel com as demais frações.

Entretanto, as análises de TAG por cromatografia gasosa, e as análises por DSC, indicaram que o fracionamento de TAG não seria adequado visando a obtenção de concentrados poli-insaturados na forma de triacilgliceróis.

Uma estratégia, poderia ser a liberação dos ácidos graxos constituintes das moléculas de triacilgliceróis, na forma de ácidos graxos livres, com o posterior congelamento desses e fracionamento em porções de diferentes graus de insaturação. Essa estratégia pode vir a atender as necessidades tanto do mercado de suplementos alimentares, interessado nas frações mais insaturadas; quanto de biodiesel, que necessita de frações com adequados teores de ácidos poli e tri-insaturados.

3.5 Referências

ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **ABNT NBR 10441:2007**. Produtos de petróleo — Líquidos transparentes e opacos — Determinação da viscosidade cinemática e cálculo da viscosidade dinâmica, 2007.

ANP. **Resolução ANP n. 45, de 25.8.2014**. Disponível em: <[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp_45_2014.xml?fn=document-frameset.htm\\$f=templates\\$3.0](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/resolucoes_anp/2014/agosto/ranp_45_2014.xml?fn=document-frameset.htm$f=templates$3.0)>. Acesso em: 21 jun. 2016.

ANTONIASSI, R.; FREITAS, S. C. **Árvore do conhecimento**. Tecnologia de alimentos: processamento. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CON T000gc8yujq302wx5ok01dx9lcx1g7v3u.html>. Acesso em: 24 abr. 2017.

ANTONIOSI-FILHO, N. R. **Análise de óleos e gorduras vegetais utilizando métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais**. 1995. 339 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Carlos, São Carlos, SP, 1995.

ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada no. 270 de 22/09/2005**. Disponível em: <<http://www.azeiteonline.com.br/wp-content/uploads/2011/04/anvisa-resolucao-rdc270-de-22-09-2005.pdf>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

AOCS. **AOCS Official Method Cd 3d-63**. Disponível em: <<https://aocs.personifycloud.com/PersonifyEbusiness/Store/ProductDetails?productId=111545>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

ATABANI, A. E. et al. A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, n. 4, p. 2070–2093, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2012.01.003>>. Acesso em: 1 jan. 2016.

BELLAVER, C.; ZANOTTO, D. L. **Parâmetros de qualidade em gorduras e subprodutos protéicos de origem animal**. Conferência APINCO, São Paulo: 2004, p. 5–14.

BENITES, C. I.; SOUZA-SOARES, L. A. Farinhas de silagem de resíduo de pescado co-secas com farelo de arroz: Uma alternativa viável. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 227, p. 447–450, 2010.

BERY, C. Estudo da viabilidade do óleo de vísceras de peixes marinhos (Seriola Dumerlii (Arabaiana), Thunnus ssp (Atum), Scomberomorus cavala (Cavala) e Carcharrhinus spp (Cação) comercializados em Aracaju-SE para a produção de biodiesel. **Geintec**, v. 2, p. 297–306, 2012.

CASTRO, B. C. S. **Otimização das condições da reação de transesterificação e caracterização dos Rejeitos dos Óleos de Fritura e de Peixe para obtenção de Biodiesel**. 2009. 119 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

CEN (European Committee for Standardization). **EN 14112:2003**. Fatty Acid Methyl Esters (FAME) — Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test), 2003.

CHOWDHURY, R. et al. Association between fish consumption, long chain omega 3 fatty acids, and risk of cerebrovascular disease: systematic review and meta-analysis. **Bmj**, v. 345, n. October, p. e6698-, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3484317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

COSTA NETO, P. R. et al. Produção de biocombustível alternativo ao óleo diesel através da transesterificação de óleo de soja usado em frituras. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 531–537, 2000.

CREXI, V. T. et al. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: Chemical hydrolysis and urea complexation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 329–334, 2012.

CREXI, V. T. et al. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 945–950, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.050>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

FAO. **Comércio global de peixes atinge níveis recordes**. Disponível em: <<https://www.fao.org.br/cgpanr.asp>>. Acesso em: 18 jun. 2015a.

FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2014**. Disponível em: <<http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/231544/>>. Acesso em: 18 jun. 2015b.

FELTES, M. M. C. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 14, n. 6, p. 669–677, 2010.

FILHO, J. B. DA S. **Produção de biodiesel etílico de óleos e gorduras residuais (OGR) em reator químico de baixo custo**. 2010. 57 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Manaus, PR, 2010.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid Preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 4, p. 475–476, 1973.

HIGUCHI, L. H. **Produção, caracterização nutricional e utilização de farinhas e óleos de resíduos de peixes neotropicais em dietas para Tilápia do Nilo**. 2015. 105 f. Tese (Doutorado) - Centro de Aquicultura da UNESP, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2015. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/132803/000855033.pdf?sequencia=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

HORROCKS, L. A.; YEO, Y. K. Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). **Pharmacological research**, v. 40, n. 3, p. 211–225, 1999.

- HUNT, M. Women's Health Care: the Potential of Long-Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids. **Journal of Women's Health Care**, v. 3, n. 1, p. 1–3, 2014. Disponível em: <<http://www.omicsgroup.org/journals/womens-health-care-the-potential-of-longchain-omega-polyunsaturated-fatty-acids-2167-0420.1000142.php?aid=24051>>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- INOUE, G. H. **Variação da viscosidade cinemática de óleos vegetais brutos em função da temperatura**. Disponível em: <http://oleo.ufla.br/anais_02/artigos/t142.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- JENSEN, N. .; FISKEINDUSTRI, E.; DENMARK, E. **Quality of fishmeal: Specifications and uses in aquaculture and fur farming**, 1990, p. 127–141.
- KINSELLA, J. E. Food components with potential therapeutic benefits: the n-3 polyunsaturated fatty acids of fish oils. **Food Technology and Biotechnology**, v. 40, n. 2, p. 89–97, 1986.
- KURATKO, C. N. et al. The relationship of docosahexaenoic acid (DHA) with learning and behavior in healthy children: A review. **Nutrients**, v. 5, n. 7, p. 2777–2810, 2013.
- KURATKO, C. N.; NOLAN, C. C.; SALEM, N. Long-chain omega-3 fatty acids and cardiovascular health. **Nutrafoods**, v. 13, n. 2, p. 49–60, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13749-014-0020-7>>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- LIMA, A. L. et al. Parâmetros da reação de transesterificação etílica com óleo de milho para produção de biodiesel. **Ecletica Química**, v. 35, n. 4, p. 101–106, 2010.
- LÚCIA, V. et al. Characterization of a hydrolyzed oil obtained from fish waste for nutraceutical application. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 321–325, 2015.
- MANSOORI, A. et al. Docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation improves body composition without influence of the PPAR γ Pro12Ala polymorphism in patients with type 2 diabetes: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **J. Nutrigenet Nutrigenomics**, v. 8, n. 4–6, p. 195–204, 2015. Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/Abstract/442792>>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- MARTIN, C. A. et al. Ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 6, p. 761–770, 2006.
- MARTINS, G. I. **Potencial de extração de óleo de peixe para a produção de biodiesel**. 2012. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, 2012. Disponível em: <http://tede.unioeste.br/tede//tde_arquivos/16/TDE-2013-01-28T163734Z-902/Publico/Gislaine.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2015.
- METROHM. **Metrohm Ion Analysis**. Manual técnico 8.873.8001 EN, 2008.
- MOHANARANGAN, A. B. **Extraction of omega-3 fatty acids from Atlantic herring (*Clupea harengus*)**. 2012. 187 f. Dissertação (Master of Applied Science) -

Department of Process Engineering and Applied Science, Dalhousie University, Nova Scotia, 2012.

MOKSNESS, E.; KJORSVIK, E.; OLSEN, Y. Culture of Cold-Water Marine Fish. 1. ed. [S.l.]: **Blackwell Publishing**, 2004. p. 178–179.

MOYER, M. W. **Fish Oil Supplement Research Remains Murky**. Nature, 25 set. 2012. Disponível em: <<http://www.nature.com/news/fish-oil-supplement-research-remains-murky-1.11484>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

MPA. **Petrobrás começa a produzir no Ceará biodiesel com resíduos de pescado**. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/ultimas-noticias/2190-petrobras-comeca-a-produzir-no-ceara-biodiesel-com-residuos-de-pescado>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

NASCIMENTO, M. DA G.; COSTA NETO, P. R. DA; MAZZUCO, L. M. Óleos e Gorduras. In: **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. Quarta Edição (Primeira Edição Digital), 1999. p. 593–629.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Office of Dietary Supplements -Omega-3 Fatty Acids and Health**. Disponível em: <<https://ods.od.nih.gov/factsheets/Omega3FattyAcidsandHealth-HealthProfessional/>>. Acesso em: 23 fev. 2016.

PACHECO, S. G. A.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 927–932, 2009.

PORTAL BRASIL. **Petrobrás vai produzir biodiesel a partir de óleo de peixe**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/01/petrobras-vai-produzir-biodiesel-a-partir-de-oleo-de-peixe>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

PUSCEDDU, M. M. et al. n-3 PUFAs have beneficial effects on anxiety and cognition in female rats: Effects of early life stress. **Psychoneuroendocrinology**, v. 58, p. 79–90, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25965872>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 755–760, 2006.

RESEARCH, G. O. M. **Atlantic Herring**. Disponível em: <<http://www.gma.org/herring/>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.006>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

SANTOS, A. P. B.; PINTO, A. C. Biodiesel: Uma Alternativa de Combustível Limpo. **Química Nova na Escola**, v. 31, n. 1, p. 58–62, 2009. Disponível em:

<http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc31_1/11-EEQ-3707.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2015.

SCRIMGEOUR, C. Chemistry of Fatty Acids. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**, p. 1–43, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/047167849X.bio005>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, U. N. Omega-3 fatty acid concentrates: Nutritional aspects and production technologies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 9, n. 6, p. 230–240, 1998.

SIMMER, K. Fish-oil supplementation: the controversy continues. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 103, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/103/1/1.extract>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

SNYDER, R. J.; SCHREGEL, W. D.; WEI, Y. Effects of thermal acclimation on tissue fatty acid composition of freshwater alewives (*Alosa pseudoharengus*). **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 38, n. 2, p. 363–373, 2012.

SOUZA, S. M. G. DE. Review: Essential fatty acids: importance of fish oils and aquaculture. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 189–196, 2010. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v13n3422a.pdf>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

SOUZA, S. M. G. DE; ANIDO, R. J. V.; TOGNON, F. C. Ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 na nutrição de peixes – fontes e relações. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 6, n. 1, p. 63–71, 2007.

SWANSON, D.; BLOCK, R.; MOUSA, S. A. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: Health benefits throughout life. **Advances in Nutrition: An International Review Journal**, v. 3, n. 1, p. 1–7, 2012.

TOCHER, D. R.; SARGENT, J. R. Analyses of lipids and fatty acids in ripe roes of some Northwest European marine fish. **Lipids**, v. 19, n. 7, p. 492–499, 1984.

YOUNG, F. V. K. **The chemical & physical properties of crude fish oils for refiners & hydrogenators**. Fish Oil Bulletin. Liverpool, Inglaterra: [s.n.], 1986. Disponível em: <<http://www.iffonet.net/system/files/FOB17.PDF>>. Acesso em: 19 jun. 2015.

4. CAPÍTULO 4

OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES REACIONAIS PARA HIDRÓLISE QUÍMICA DO ÓLEO DE PEIXE VISANDO A OBTENÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES

Ingryd Cristina de Oliveira, Nelson Roberto Antoniosi Filho

Laboratório de Métodos de Extração e Separação. Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Samambaia, CEP: 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil.

nelson@quimica.ufg.br

ingryd.oliveira.br@gmail.com

RESUMO

O planejamento fatorial conduz à região dos fatores importantes na qual se obtém a melhor resposta possível. Nesse sentido, esse trabalho visou compreender a reação de hidrólise, e encontrar o caminho da maior liberação de ácidos graxos livres, através das técnicas de desenho e análise estatística de experimentos. Na obtenção de ácidos graxos livres a partir de óleo de peixe, foram avaliadas a temperatura, a concentração do catalisador básico, e o tempo de reação; buscando como respostas o rendimento químico mássico, e o índice de acidez. O desenho experimental 2^3 foi desenvolvido utilizando software Matlab® versão R2015a, e as planilhas eletrônicas no Excel. A condição ótima encontrada para a maior liberação e obtenção de ácidos graxos livres mostrou ser dependente do tipo de parâmetro avaliado, sendo que para a avaliação do rendimento em massa, as melhores condições são: temperatura reacional de 90 °C; catalisador KOH na concentração de 25% m/m; e tempo de reação de 60 min. Entretanto, na avaliação do índice de acidez, o qual indica diretamente a presença de ácidos graxos livres, as melhores condições são: temperatura reacional de 90 °C; catalisador KOH na concentração de 22% m/m; e tempo de reação de 120 min. Essa é a condição experimental considerada mais adequada, pelo fato do índice de acidez ser mais relevante que o conteúdo em massa, o qual não fornece informações sobre a composição dos produtos constituintes da reação.

Palavras-chave: Hidrólise química; Ácidos graxos livres; Planejamento fatorial 2^3 ; *Clupea harengus*; Índice de acidez.

4.1 Introdução

É indiscutível a importância da aplicação das técnicas de desenho experimental no desenvolvimento das fases iniciais de um processo de pesquisa. Pode-se obter melhoras no rendimento, diminuição de não conformidades, redução do tempo de desenvolvimento, e redução de gastos. Além disso, há a possibilidade de encontrar uma condição ótima em que a resposta desejada apresente-se em seu melhor estado, dentro dos fatores avaliados (Barros Neto, Scarminio e Bruns, 2010; Box, Heinter e Hunter, 1978; Montgomery, 2004).

Nesse contexto, a otimização de uma determinada reação, como a de hidrólise, pode ser uma estratégia eficiente na obtenção de ácidos graxos livres a partir de um determinado óleo ou gordura. Os óleos ou gorduras são constituídos majoritariamente na forma de triacilgliceróis (TAG) - cerca de 98% do conteúdo - e a parte remanescente é feita de diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis (MAG), ácidos graxos livres (FFA, free fatty acids), fosfolipídeos, glicolipídeos, e esteróis (METIN e HARTEL, 2005).

Os triacilgliceróis são constituídos por três ácidos graxos ligados a uma molécula de glicerol. A saponificação, seguida de acidificação, produz a hidrólise dos TAG, liberando glicerol e moléculas do grupo mais abundante de lipídeos nos seres vivos: os ácidos graxos (WAITZBERG, 2006).

Os produtos da reação de hidrólise, ácidos graxos e glicerol, são importantes matérias-primas base para indústria oleoquímica, gerando alimentos, sabões, detergentes, cosméticos, fármacos, e outros (SALIMON, ABDULLAH e SALIH, 2011).

Entretanto, mesmo que a saponificação tenha sido descoberta e descrita em detalhes por Chevreul em 1823 (CHEVREUL, 1823), pouco se estudou sobre suas condições reacionais ideais (BOTTINO; VANDENBURG; REISER, 1967; CREXI, VALÉRIA T. *et al.*, 2012; LÚCIA *et al.*, 2015; PADILHA, M. E. D. S.; AUGUSTO-RUIZ, 2007; RICE; WATKINS; HILL, 1999; SALIMON; ABDULLAH; SALIH, 2011; SHIMADA *et al.*, 1995; TRENTINI; RASPE; SILVA, 2014).

Além disso, a maioria das publicações na área da hidrólise química, reproduz na totalidade ou com pequenas modificações, o processo descrito por Wanasundara e Shahidi (WANASUNDARA, UDAYA N.; SHAHIDI, 1999). Em seu destacado artigo,

Wanasundara e Shahidi (1999) propõem a hidrólise alcalina feita com solução etanólica de KOH, remoção da matéria insaponificável com hexano, acidificação da fase aquosa com HCl, separação da solução de FFA com hexano, secagem com Na₂SO₄, e recuperação dos FFA por rotaevaporação (WANASUNDARA, SHAHIDI, 1999).

Mas enquanto a presença de álcool favorece a reação de transesterificação, a saponificação (ou hidrólise do triacilglicerol) é favorecida pela presença de água no meio reacional (SANTOS, PINTO, 2009). Esse fato é uma indicação que a água talvez seja melhor componente no meio reacional da saponificação que o álcool.

A água, especialmente à temperaturas mais elevadas, hidrolisa os ésteres de ácidos graxos (triacilgliceróis e/ou biodiesel), formando ácidos carboxílicos que são neutralizados pelo catalisador básico, formando sais de ácidos graxos (sabões) (RINALDI et al., 2007).

Um meio reacional contendo quantidades significativas em água (maiores que 5% em massa), e temperaturas mais elevadas (igual ou maiores que 60 °C), interrompe a agregação das gotas de óleo, e favorece uma redução na viscosidade da emulsão, formando uma maior área superficial entre os substratos da reação e obtendo maiores rendimentos em ácidos graxos livres (TRENTINI, RASPE e SILVA, 2014).

Dessa forma, considerando a importância mercadológica, nutricional, e medicinal dos ácidos graxos livres, o objetivo desse estudo foi a otimização das condições reacionais na hidrólise química de óleo de resíduos de peixe *Clupea harengus* para a obtenção de ácidos graxos livres. Para isso, utilizou-se água como meio reacional na etapa de saponificação, na proporção arbitrária de 1:1 m/m, catalisador nas porcentagens de 22% e 25%, temperaturas de 60 °C e 90 °C, e tempos de reação de 1 h e 2 h (CREXI, VALÉRIA T. et al., 2012; GANGA et al., 1998; LÚCIA et al., 2015; PAIM et al., 2012). As respostas avaliadas foram o rendimento químico e o índice de acidez.

4.2 Parte Experimental

4.2.1 Obtenção dos ácidos graxos livres

O óleo de peixe foi obtido conforme descrito no CAPÍTULO 3, a partir dos resíduos do peixe da espécie *Clupea harengus*. O procedimento de obtenção dos ácidos graxos livres é descrito a seguir, levando em consideração o catalisador KOH (22%/25%), temperatura (60 °C/90 °C), e tempo (1h/2h), de tal forma que seja de fácil execução e reprodução.

Assim, na Tabela 4.1 constam os níveis e fatores do planejamento fatorial completo 2^3 para o rendimento químico da reação de hidrólise do óleo de peixe, em função: da temperatura, T; da concentração do catalisador KOH, C; e do tempo utilizado, H, durante a etapa de saponificação. Os níveis foram escolhidos tendo como base trabalhos contendo hidrólise de óleo de carpa e de sardinha (CREXI, VALÉRIA T. *et al.*, 2012; GANGA *et al.*, 1998).

Tabela 4.1 – Níveis e fatores do Planejamento 2^3 .

Fatores	Níveis	
	-	+
Temperatura (°C)	60	90
Catalisador (% m/m óleo)	22	25
Tempo (min)	60	120

Fonte: Elaborada pela Autora.

A primeira etapa da obtenção dos ácidos graxos livres é a de saponificação. Nela emprega-se um balão de duas vias, onde foram adicionados 10 g de óleo de resíduos de peixe, catalisador na concentração de 22% ou 25%, equivalendo respectivamente, à 2,59 ou 2,94 g de KOH P. A. 85% em lentilhas da QUEMIS® (CAS N^o. 1310-58-3), dissolvidos em 10 mL de água destilada.

O óleo é então hidrolisado, sendo submetido ao aquecimento na temperatura de 60 °C ou 90 °C, por 1 h ou 2 h, em sistema de refluxo usando agitador com aquecimento GEHAKA® AA-840, banho de glicerina, e condensador VIDROLABOR®. A temperatura foi monitorada por um termômetro posicionado em uma das vias do

balão de 500 mL de capacidade (Figura 4.1). Ao fim da reação de hidrólise obtem-se sabão de ácidos graxos e potássio.

Figura 4.1 – Saponificação promovida em sistema de refluxo.



Fonte: Elaborada pela Autora.

A segunda etapa é a de acidificação. Após retirar o balão do sistema de refluxo, o sabão é submetido ao gotejamento de uma solução contendo 2,2 mL ou 2,5 mL de H_3PO_4 concentrado 98% BAKER[®] em 10 mL de água destilada. Após isso, é submetida a agitação por 10 minutos em agitador magnético. Essa etapa tem como objetivo a precipitação do potássio na forma de fosfatos, e a conversão dos sabões de ácidos graxos em ácidos graxos livres. Durante essa etapa, ocorre mudança na coloração da mistura, e o pH do sabão acidificado passa a ser de 6 a 5.

A terceira etapa é a de extração dos ácidos graxos livres com o solvente hexano. A extração líquido-líquido é realizada em um funil de separação, e utilizando três porções de 40 mL de hexano. A fração orgânica, que contém os ácidos graxos livres dissolvidos em hexano, passa por uma filtração simples com Na_2SO_4 P. A. SYNTH[®], e é deslocada para um balão de fundo redondo. Logo após, o hexano é recuperado por rotaevaporação à 60 °C e aproximadamente 600 mmHg. A mistura de ácidos graxos livres obtida apresentou pH 5.

4.2.2 *Rendimento*

O Rendimento foi calculado levando em consideração a massa final (m_f) obtida, fração de ácidos graxos, em relação à massa inicial de óleo de peixe (m_i) utilizada para produção da fração de ácidos graxos livres (Equação 4.1).

Equação 4.1 – Cálculo de rendimento.

$$R = \frac{m_f \times 100}{m_i}$$

4.2.3 *Índice de acidez*

O índice de acidez é o número de miligramas de hidróxido de potássio ou sódio, necessário para neutralizar os ácidos livres em 1 grama de amostra. O índice de acidez foi feito baseando-se na norma Cd3d-63, AOCS Official Method, aplicável a gorduras, óleos vegetais e marinhos (brutos e refinados), além de vários produtos derivados deles.

4.2.4 *Tratamento dos dados*

Os algoritmos foram executados no ambiente Matlab[®] versão R2015a (The MathWorks, Natick, MA). A análise de variância foi feita por meio de planilhas de cálculo no Excel da Microsoft[®]. A construção desses cálculos e interpretação dos dados foi feita baseando-se na literatura (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; BOX; HEINTER; HUNTER, 1978; BREITKREITZ; SOUZA; POPPI, 2014; MONTGOMERY, 2004, 2009).

4.3 Resultados

A Figura 4.2 apresenta a comparação entre o óleo proveniente de resíduos de peixe e a fração de ácidos graxos resultante do processo de hidrólise, saponificação, e acidificação do óleo de peixe.

Figura 4.2 – Comparação visual entre o óleo proveniente de resíduos de peixe (à esquerda) e os ácidos graxos resultantes do processo de hidrólise do óleo de peixe (à direita).



Fonte: Elaborada pela Autora.

4.3.1 Cálculos e interpretação dos efeitos em relação ao rendimento

A análise de planejamento e otimização da obtenção de ácidos graxos livres foi executada com base no rendimento da conversão de óleo a ácidos graxos. Para cada variável quantitativa, foram avaliados dois níveis. Como pode ser observado na Tabela 4.2, o planejamento 2^3 com duas replicatas foi feito para avaliação dos resultados do rendimento, e é composto por 8 experimentos que foram feitos e repetidos aleatoriamente.

As oito combinações de tratamento podem ser representadas geometricamente através de um cubo, como mostra a Figura 4.3. Observando somente o desenho fatorial, a melhor condição, de maior rendimento (76%) é aquela em que as variáveis temperatura e catalisador estão em seus maiores níveis, e a variável tempo apresenta-se no seu menor nível.

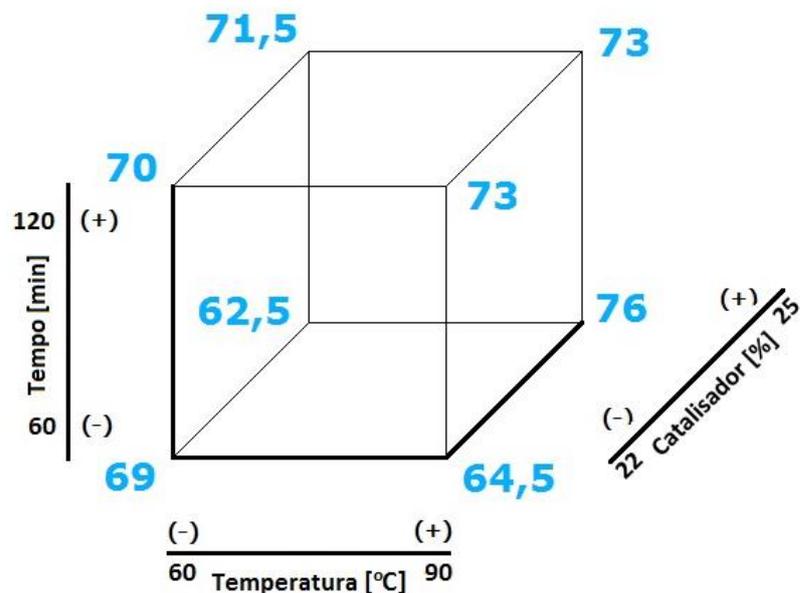
Tabela 4.2 – Matriz de planejamento

Experimentos n	Temperatura T	Catalisador C	Tempo H	Respostas		
				y ₁	y ₂	y _m
1	-	-	-	70	68	69
2	+	-	-	68	61	64,5
3	-	+	-	60	65	62,5
4	+	+	-	77	75	76
5	-	-	+	71	69	70
6	+	-	+	71	75	73
7	-	+	+	70	73	71,5
8	+	+	+	74	72	73

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: y₁ e y₂ são as respostas para o rendimento percentual obtido em relação à massa inicial de óleo de peixe, e y_m é a média entre y₁ e y₂.

Figura 4.3 – Desenho fatorial 2³ para a otimização da obtenção de ácidos graxos em relação ao rendimento.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Os cálculos dos efeitos, e os erros dos efeitos, são mostrados na Tabela 4.3.

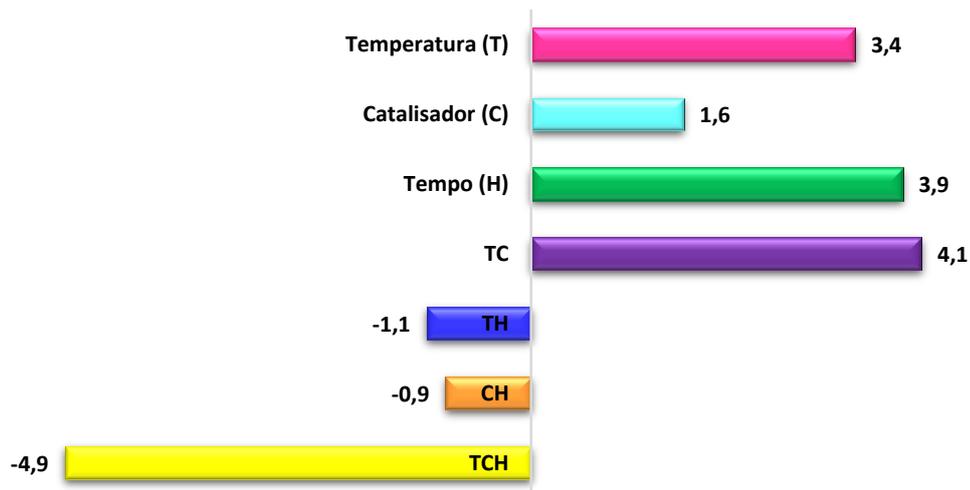
Tabela 4.3 – Tabela dos efeitos do planejamento em relação ao rendimento.

Efeito	Valor	Erros dos efeitos (módulo)
Média	69,9	0,7
Temperatura (T)	3,4	1,3
Catalisador (C)	1,6	1,3
Tempo (H)	3,9	1,3
Interação entre efeitos (TC)	4,1	1,3
Interação entre efeitos (TH)	-1,1	1,3
Interação entre efeitos (CH)	-0,9	1,3
Interação entre efeitos (TCH)	-4,9	1,3

Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 4.4 – Gráfico de efeitos para o planejamento em relação ao rendimento.

Efeitos para o planejamento do rendimento



Fonte: Elaborada pela Autora.

Através dos resultados dos cálculos dos efeitos, e dos erros dos efeitos, presentes na Tabela 4.3 e Figura 4.4, pode-se afirmar que: exceto T, H, TC, e TCH,

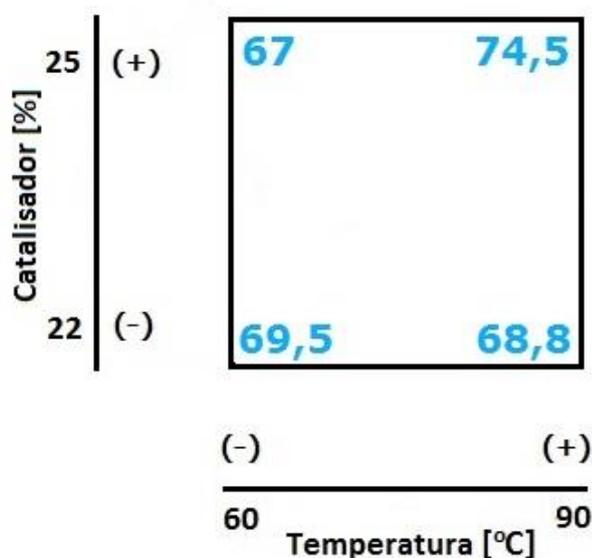
os outros efeitos podem ser gerados por ruídos. Assim, os efeitos dos fatores principais foram de temperatura ($T = 3,4$) e de tempo ($H = 3,9$).

O tempo parece não ter interação com os outros fatores, já que TH e CH não possuem valores relevantes. O aumento do tempo de reação de 60 para 120 minutos, possui um efeito discretamente positivo sobre o rendimento final, e dessa forma, na melhor condição (Figura 4.3), este fator encontra-se em seu menor nível (+,+,-). Isso talvez possa ser explicado pela grande formação de espuma observada no ponto em que as variáveis encontram-se em seu maior nível (+,+,+), o que atrapalha a formação de uma superfície de contato adequada entre o catalisador e os substratos.

O efeito do catalisador é praticamente sem importância quando avaliado isoladamente, entretanto, os maiores efeitos estimados são os de interação entre o catalisador e a temperatura ($TC = 4,1$; $TCH = -4,9$). Assim sendo, os efeitos temperatura e catalisador não podem ser avaliados separadamente, devido ao grande sinergismo entre estes.

A Figura 4.5 é relativa a interação entre o catalisador e a temperatura. Nela, pode-se observar que a mudança de temperatura levou a conclusões diferentes, dependendo da concentração de catalisador utilizada.

Figura 4.5 – Quadro de interações entre fatores temperatura e catalisador do planejamento em relação ao rendimento.



Se o experimento for conduzido com o catalisador em concentração de 22%, a melhor temperatura seria de 60 °C (acréscimo de 0,7% no rendimento); se em concentração de 25%, a temperatura indicada passaria a ser 90 °C (acréscimo de 7,5% no rendimento) (Figura 4.5). Isso porque uma maior quantidade de catalisador necessitaria ser dissolvida no meio, o que é auxiliado pelo aumento de temperatura.

Os maiores rendimentos (74,5%, em média) são obtidos com o catalisador em concentração de 25% e com temperatura a 90 °C. Fixando as variáveis catalisador e temperatura em seus maiores níveis, a escolha do tempo de reação em 60 minutos leva à um rendimento de cerca de 76% contra 73% para 120 minutos (Figura 4.3).

Para avaliar se os efeitos são estatisticamente significativos, uma outra alternativa é estimar os erros associados a estes valores e construir um intervalo de confiança utilizando a distribuição t-Student. A partir dos resultados dos erros dos efeitos é possível construir intervalos de confiança, empregando os valores da distribuição t de Student, com o número de graus de liberdade igual ao da estimativa da variância experimental (8) e o nível de confiança desejado, para classificá-los como significativos ou não.

Caso o intervalo de confiança contenha o zero, o efeito não é significativo (MONTGOMERY, 2009). Normalmente o intervalo é construído empregando 95% de confiança e, neste caso, para uma distribuição bi-caudal, o valor de $t_{0.025,8}$ é de 2,306 (SOCR, 2016).

Os intervalos obtidos foram: Média global = [68,4; 71,5]; Efeito T = [0,3; 6,5]; Efeito C = [-1,5; 4,7]; Efeito H = [0,8; 7,0]; Efeito de interação TC = [1,0; 7,2]; Efeito de interação TH = [-4,2; 2,0]; Efeito de interação CH = [-4,0; 2,2]; Efeito de interação TCH = [-8,0; -1,8]. Assim, os efeitos principais importantes são T e H, e os efeitos de interação importantes são TC e TCH pois, para um intervalo de confiança de 95%, não incluem o zero.

4.3.2 *Análise de variância ANOVA em relação ao rendimento*

A Tabela 4.4 é relativa a análise de variância entre as oito combinações de tratamentos, e dentro desses tratamentos (erro). Cada linha na tabela de ANOVA testa a hipótese nula de que as médias populacionais de cada nível do fator são iguais.

Tabela 4.4 – Tabela ANOVA de análise de variância para o planejamento em relação ao rendimento.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F_0	Valor P
Entre os tratamentos	287,44	7	41,06	5,71	0,0017
Dentre os tratamentos	57,50	8	7,19		
Total	344,94	15			

Fonte: Elaborada pela Autora.

A observação que a média quadrática entre os 8 tratamentos (41,06) é cerca de 6 vezes maior que a média quadrática dentre os tratamentos, ou também chamada de média quadrática dos erros (7,19), indica que não é possível que as médias dos tratamentos sejam iguais.

Em termos formais, pode-se calcular o quociente $F, F_0 = 41,06/7,19 = 5,71$, e comparar este valor com um ponto percentual adequado (por exemplo $\alpha=0.05$) da tabela F (“F Table”, 2015) e distribuição $F_{7, 8}$. Ou seja, $F_{0.05, 7, 8} = 3.50$, e então, $F_0 = 5,71 > 3,50$. Assim, a hipótese nula de que os tratamentos seriam iguais é descartada e prova-se que eles são distintos; quer dizer, as oito diferentes combinações entre temperaturas, percentual de catalisador, e tempo de reação, afetam significativamente o rendimento medido. O valor de P muito baixo (0,0127), confirma essa constatação.

Mas dos sete graus de liberdade, entre as oito combinações de tratamento no desenho 2^3 ; três graus se associam com as variáveis principais T, C, e H, e quatro graus se associam com as interações TC, TH, CH e TCH. A análise de variância presente na Tabela 4.5, destrincha a tabela ANOVA, e confirma a magnitude dos efeitos.

Pela tabela, conclui-se que os efeitos significativos são mesmo a temperatura, o tempo, e as interações TC e TCH . Isso, porque esses fatores possuem valores de F_0 maiores que o $F_{0.05, 1, 8}$ tabelado = 5,32 (“F Table”, 2015), e valores de P muito pequenos, menores que 0,05.

Tabela 4.5 – Tabela ANOVA detalhada para planejamento em relação ao rendimento.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F_0	Valor P
Temperatura (T)	45,56	1	45,56	6,34	0,0359
Catalisador (C)	10,56	1	10,56	1,47	0,2600
Tempo (H)	60,06	1	60,06	8,36	0,0202
TC	68,06	1	68,06	9,47	0,0152
TH	5,06	1	5,06	0,70	0,4257
CH	3,06	1	3,06	0,43	0,5322
TCH	95,06	1	95,06	13,23	0,0066
Erro puro	57,50	8	7,19		
Total	344,94	15			

Fonte: Elaborada pela Autora.

4.3.3 Modelo de regressão em relação ao rendimento

O modelo de regressão linear completo é um modelo estatístico que descreve como a resposta varia linearmente com os níveis dos fatores e, inclusive, as interações entre esses fatores. Ele é descrito pela Equação 4.2.

Equação 4.2 – Modelo de regressão linear completo.

$$\hat{y} = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{123}x_1x_2x_3$$

O modelo ajustado é então representado pela Equação 4.3.

Equação 4.3 – Modelo ajustado em relação aos resultados do rendimento.

$$\hat{y} = 69.94 (0,34) + 1.69 (0,67) x_1 + 1.94 (0,67) x_3 + 2.06 (0,67) x_1x_2 - 2.44 (0,67) x_1x_2x_3$$

O coeficiente b_0 representa a média global. Os coeficientes b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} , b_{23} , e b_{123} , representam a variação da resposta por unidade de cada um dos fatores e interações; por este motivo, eles são a metade dos efeitos calculados anteriormente, e as variáveis x_1 , x_2 , e x_3 representam T, C, e H, respectivamente.

A avaliação da qualidade do ajuste do modelo linear aos dados experimentais é feita através da avaliação do gráfico de resíduos, e da análise da variância (ANOVA). Os resíduos são as diferenças entre os valores experimentais e aqueles previstos pelo modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010). No gráfico dos resíduos (Figura 4.6), os resíduos possuem valores pequenos e estão distribuídos ao redor do zero, com valores positivos tão frequente quanto negativos, o que mostra a adequação do modelo.

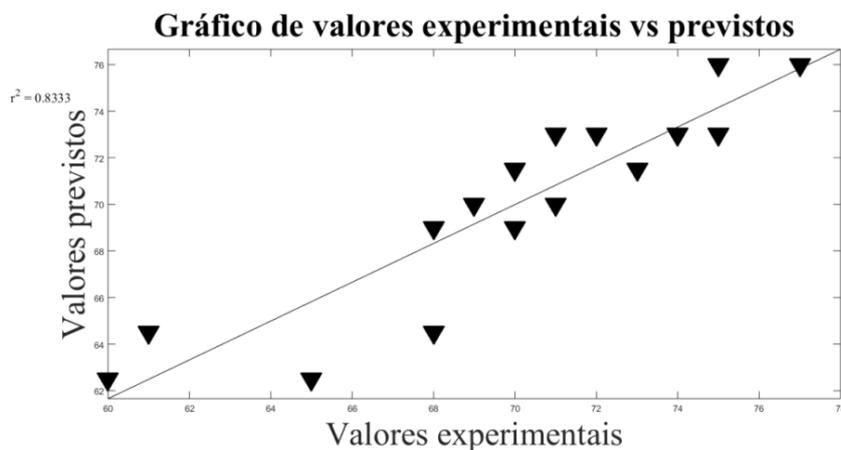
Figura 4.6 – Gráfico dos resíduos.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Isso é confirmado no gráfico de valores experimentais versus previstos (Figura 4.7), em que há concordância entre eles.

Figura 4.7 – Gráfico dos valores experimentais versus previstos.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Os resultados da ANOVA para o modelo linear são mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Tabela ANOVA para modelo linear em relação ao rendimento.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Valor P
Regressão	268,75	4	67,19	9,7003	0,0013
Resíduos	76,19	11	6,93		
Falta de ajuste	18,69	3	6,23	0,8668	0,4970
Erro puro	57,50	8	7,19		
Total	344,94	15			
% de variação explicada	77,91				
% máxima de variação explicável	83,33				

Fonte: Elaborada pela Autora.

Como pode ser observado, o valor F calculado pela divisão da média quadrática da Regressão pela média quadrática dos Resíduos (9,7003) é maior que o tabelado ($F_{0.05, 4, 11} = 3,3567$), e o valor P é menor que $P < 0,05$, assim, o modelo é significativo.

Já o valor F calculado pela divisão das médias quadráticas da Falta de ajuste e Erro puro (0,8668) é menor que o tabelado ($F_{0.05, 3, 8} = 4,0662$); e o valor P é maior que $P < 0,05$, ou seja, o modelo não possui falta de ajuste significativo.

As superfícies de resposta são mostradas na Figura 4.8 e Figura 4.9, mantendo-se x_2 fixo em -1 e 1, respectivamente. Os pontos experimentais são mostrados em cada caso.

Figura 4.8 – Superfície de resposta, tendo x2 substituído por -1.

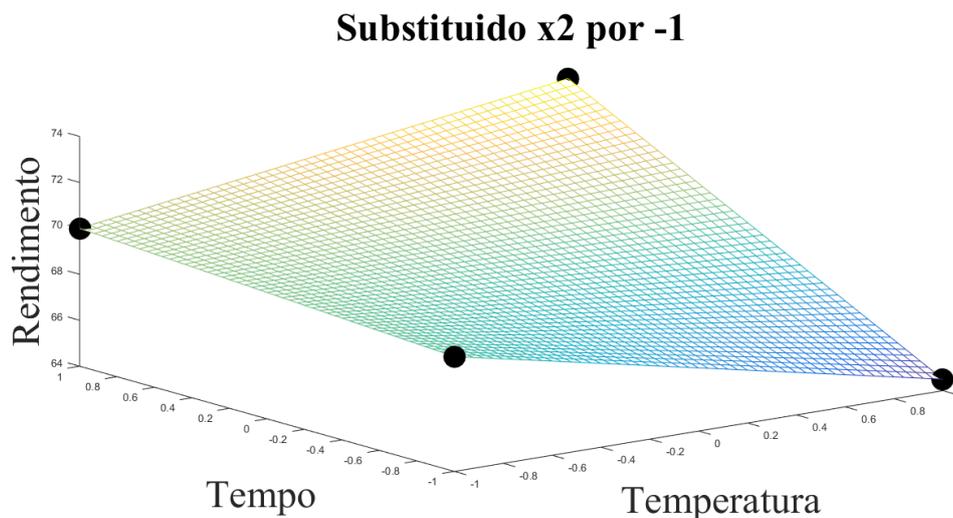
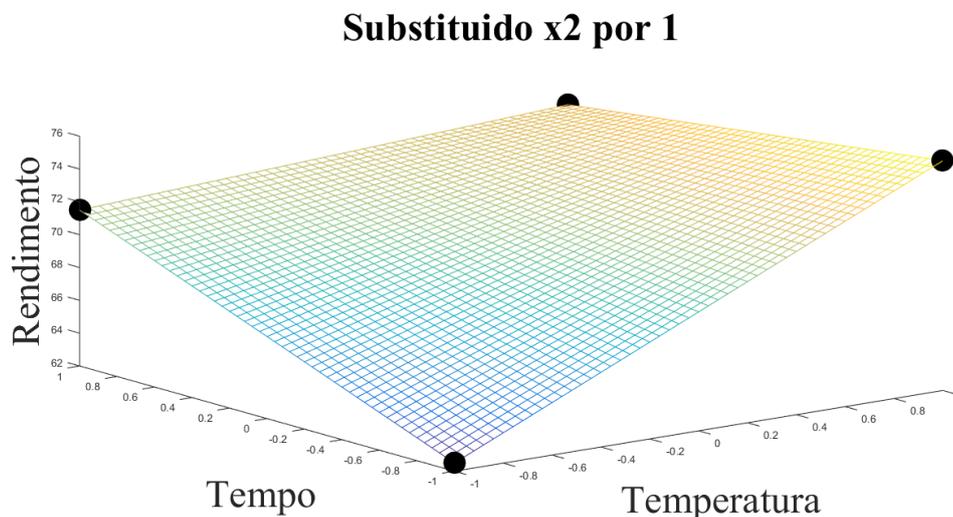


Figura 4.9 – Superfície de resposta tendo x2 substituído por 1.



Comparando as superfícies, percebe-se que com a variável catalisador em seu menor nível (22%), melhores rendimentos necessitam de um maior tempo de reação (120 min). Já com o catalisador na concentração de 25%, o tempo de reação pode ser menor.

A temperatura de 90 °C favorece a reação de hidrólise química. Por esses motivos, analisando somente os resultados de rendimento, seria interessante que a hidrólise química fosse feita a 90 °C, com concentração do catalisador de 25%, e tempo de reação de 1 h.

Para ter uma visão mais precisa, deve-se também analisar os resultados do índice de acidez, relacionados diretamente com o teor de ácidos graxos livres presentes na amostra. A composição final do produto da hidrólise é geralmente formada pelos ácidos graxos livres que foram liberados; e resquícios de triacilgliceróis, diacilgliceróis e monoacilgliceróis. Isso, porque as reações são consecutivas e reversíveis, tal como acontece durante a fabricação do biodiesel na reação de transesterificação (VILELA, 2010).

4.3.4 Análise de planejamento e otimização da obtenção de ácidos graxos livres de acordo com o índice de acidez (teor de ácidos graxos livres)

O planejamento 2^3 com duas replicatas foi feito para avaliação dos resultados do índice de acidez. A matriz de planejamento pode ser vista na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Matriz de planejamento.

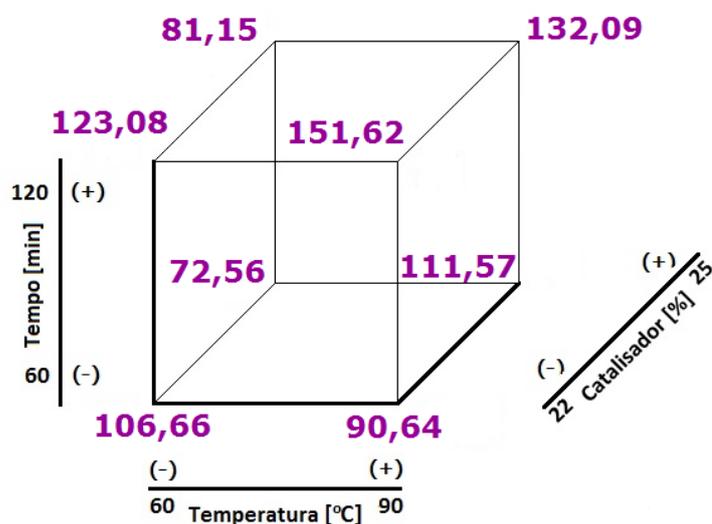
Experimentos n	Temperatura T	Catalisador C	Tempo H	Respostas		
				y ₁	y ₂	y _m
1	-	-	-	107,04	106,27	106,66
2	+	-	-	90,85	90,43	90,64
3	-	+	-	72,67	72,45	72,56
4	+	+	-	111,90	111,23	111,57
5	-	-	+	122,71	123,45	123,08
6	+	-	+	151,72	151,52	151,62
7	-	+	+	81,23	81,07	81,15
8	+	+	+	131,47	132,71	132,09

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: Sendo y₁ e y₂ são as respostas para o índice de acidez, e y_m é a média entre as duplicatas.

As oito combinações de tratamento podem ser representadas geometricamente através de um cubo, como mostra a Figura 4.10.

Figura 4.10 – Cubo dos efeitos para o planejamento em relação ao índice de acidez.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Observando somente o desenho fatorial, a condição de maior rendimento (151,62 mg KOH/g amostra) seria a que as variáveis temperatura e tempo estão em seus maiores níveis, e a variável catalisador apresenta-se no seu menor nível. Os cálculos dos efeitos e os erros dos efeitos são mostrados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 – Tabela dos efeitos do planejamento em relação ao índice de acidez.

Efeito	Valor	Erros dos efeitos (módulo)
Média	108,67	0,12
Temperatura (T)	25,62	0,23
Catalisador (C)	-18,66	0,23
Tempo (H)	26,63	0,23
Interação entre efeitos (TC)	19,36	0,23
Interação entre efeitos (TH)	14,12	0,23
Interação entre efeitos (CH)	-12,07	0,23
Interação entre efeitos (TCH)	-8,16	0,23

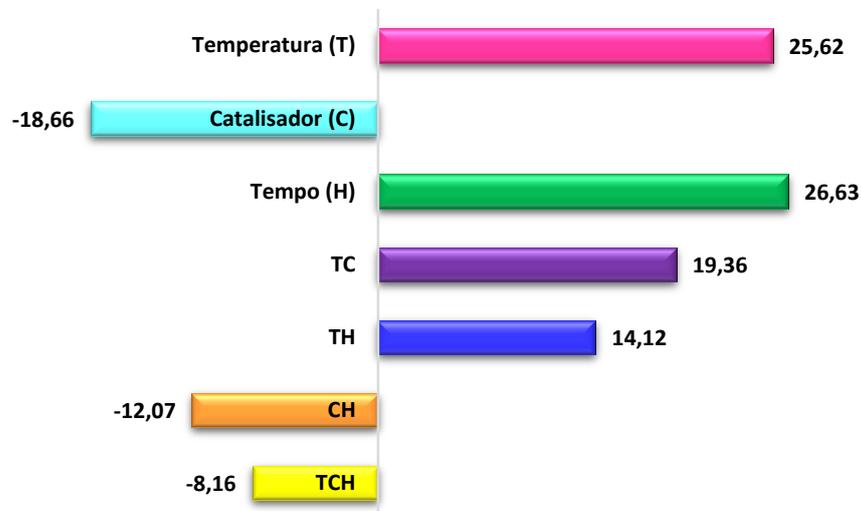
Fonte: Elaborada pela Autora.

Através dos resultados dos cálculos dos efeitos e os erros dos efeitos na Tabela 4.8 e Figura 4.11, pode-se afirmar que todos os efeitos (principais e de interação) são significativos. Desta forma, pode-se afirmar que há grande interação entre os efeitos de temperatura, catalisador, e tempo.

Pela Figura 4.11 e Figura 4.10, é fácil perceber como o maior tempo de reação favorece melhores respostas, já que os três maiores índices de acidez pertencem à região do cubo em que o tempo está em seu maior nível: (+, -, +), (+, +, +), e (-, -, +). Além disso, ao fixar o catalisador em um só nível (Figura 4.10), e escolhendo uma das temperaturas, o aumento de tempo, favorece o aumento do índice de acidez.

Figura 4.11 – Efeitos para o planejamento em relação ao índice de acidez.

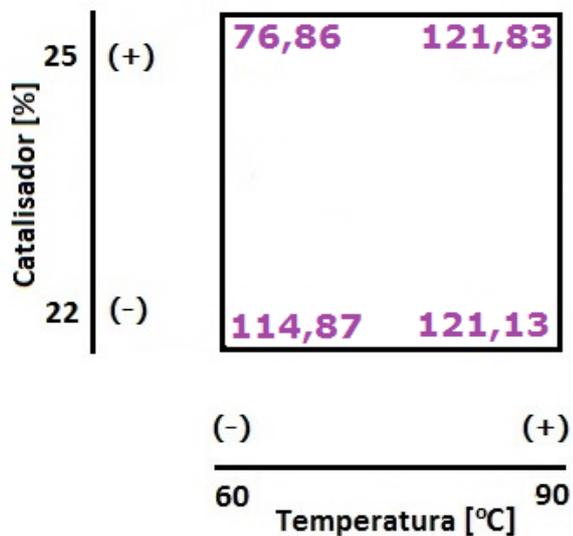
Efeitos para o planejamento do índice de acidez



Fonte: Elaborada pela Autora.

O acréscimo da temperatura, de 60 °C para 90 °C (Figura 4.12) é positivo para o acréscimo do índice de acidez, independentemente da porcentagem de catalisador.

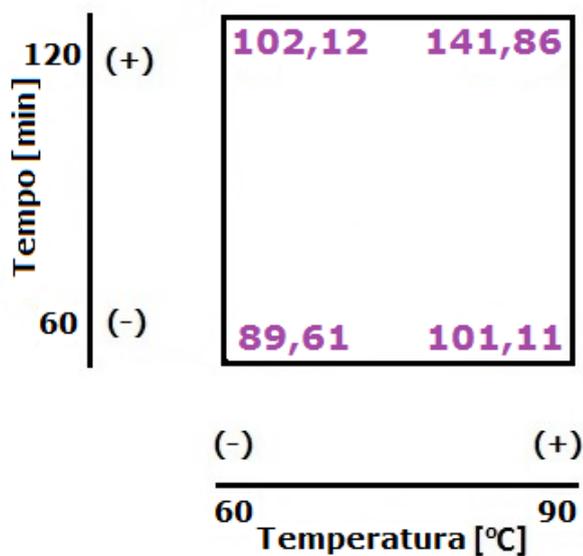
Figura 4.12 – Quadro de interações entre fatores temperatura e catalisador do planejamento em relação ao índice de acidez.



Fonte: Elaborada pela Autora.

O maior tempo de reação (120 min) (Figura 4.13), favorece a hidrólise do óleo de peixe e a liberação dos ácidos graxos livres, tanto na temperatura de 90 °C como na temperatura de 60 °C.

Figura 4.13 – Quadro de interações entre fatores temperatura e tempo do planejamento em relação ao índice de acidez.



Fonte: Elaborada pela Autora.

O quadro de interações na Figura 4.14 confirma o fato de que o maior tempo de reação é benéfico para o incremento do índice de acidez, em ambas as concentrações de catalisador.

Figura 4.14 – Quadro de interações entre fatores tempo e catalisador em relação ao índice de acidez.

Tempo [min]	120 (+)	137,35	106,62
	60 (-)	98,65	92,07
		(-) 22	(+) 25
		Catalisador [%]	

Fonte: Elaborada pela Autora.

Para avaliar se os efeitos são estatisticamente significativos, uma outra alternativa é estimar os erros associados a estes valores e construir um intervalo de confiança utilizando a distribuição t-Student.

A partir dos resultados dos erros dos efeitos, é possível a aplicação do teste t de Student, com o número de graus de liberdade igual ao da estimativa da variância experimental (8) e o nível de confiança desejado, para classifica-los como significativos ou não.

Caso o intervalo de confiança contenha o zero, o efeito não é significativo (MONTGOMERY, 2009). Normalmente o intervalo é construído empregando 95% de confiança e, neste caso, para uma distribuição bi-caudal, o valor de $t_{0,025,8}$ é de 2,306 (SOCR, 2016).

Os intervalos obtidos foram: Média global = [108,40; 108,94]; Efeito T = [25,08; 26,15]; Efeito C = [-19,19; -18,12]; Efeito H = [26,10; 27,16]; Efeito de interação TC = [18,82; 19,89]; Efeito de interação TH = [13,59; 14,66]; Efeito de

interação CH = [-12,61; -11,54]; Efeito de interação TCH = [-8,69; -7,62]. Todos os efeitos principais e efeitos de interação são importantes, pois para um intervalo de confiança de 95%, não incluem o zero.

4.3.5 Análise de variância ANOVA para o índice de acidez

A Tabela 4.9 é relativa à análise de variância entre as oito combinações de tratamentos e dentro desses tratamentos (erro). Cada linha na tabela de ANOVA testa a hipótese nula de que as médias populacionais de cada nível do fator são iguais.

Tabela 4.9 – Tabela ANOVA de análise de variância para o planejamento em relação ao índice de acidez.

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F_0	Valor P
Entre os tratamentos	9999,30	7	1428,47	6687,99	0,0000
Dentre os tratamentos	1,71	8	0,21		
Total	10001,01	15			

Fonte: Elaborada pela Autora.

A observação que a média quadrática entre os 8 tratamentos (1428,47) é incrivelmente maior que a média quadrática dentre os tratamentos, ou também chamada de média quadrática dos erros (0,21), indica que não é possível que as médias dos tratamentos sejam iguais.

Em termos mais formais, pode-se calcular o quociente F ($F_0 = 1428,47/0,21 = 6687,99$), e comparar este valor com um ponto percentual de 99,9% de confiança (por exemplo, $\alpha = 0.001$) da tabela F ("F Table", 2015) e distribuição $F_{7, 8}$. Ou seja, $F_{0.001, 7, 8} = 12,40$, e então, $F_0 = 6687,99 \gg 12,40$.

Assim, a hipótese nula de que os tratamentos seriam iguais é descartada, e se prova que eles são distintos; quer dizer, as oito diferentes combinações entre temperaturas, percentual de catalisador, e tempo de reação afetam significativamente o índice de acidez obtido. O valor de P nulo (0,0000) confirma essa constatação.

Dos sete graus de liberdade, entre as oito combinações de tratamento no desenho 2^3 , três graus se associam com as variáveis principais T , C , e H ; e quatro graus se associam com as interações TC , TH , CH , e TCH . A análise de variância presente na Tabela 4.10, destrincha a tabela ANOVA e confirma a magnitude dos efeitos.

Tabela 4.10 – Tabela ANOVA detalhada para planejamento em relação ao índice de acidez.

Fator	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média quadrática	F_0	Valor P
Temperatura (T)	2625,03	1	2625,03	12290,16	0,0000
Catalisador (C)	1392,41	1	1392,41	6519,15	0,0000
Tempo (H)	2836,63	1	2836,63	13280,87	0,0000
TC	1498,46	1	1498,46	7015,69	0,0000
TH	797,78	1	797,78	3735,14	0,0000
CH	582,98	1	582,98	2729,47	0,0000
TCH	266,02	1	266,02	1245,47	0,0000
Erro puro	1,71	8	0,21		
Total	10001,01	15			

Fonte: Elaborada pela Autora.

Pela Tabela 4.10, conclui-se que todos os efeitos são mesmo significativos. Isso porque esses fatores possuem valores de F_0 maiores que o $F_{0,001, 1, 8}$ tabelado = 25,41 (“F Table”, 2015) e os valores de P são nulos.

4.3.6 Modelo de regressão para o índice de acidez

O modelo de regressão linear completo é um modelo estatístico que descreve como a resposta varia linearmente com os níveis dos fatores, inclusive, as interações entre esses fatores. O modelo ajustado em relação ao índice de acidez foi descrito pela Equação 4.4.

Equação 4.4 – Modelo ajustado em relação aos resultados do índice de acidez.

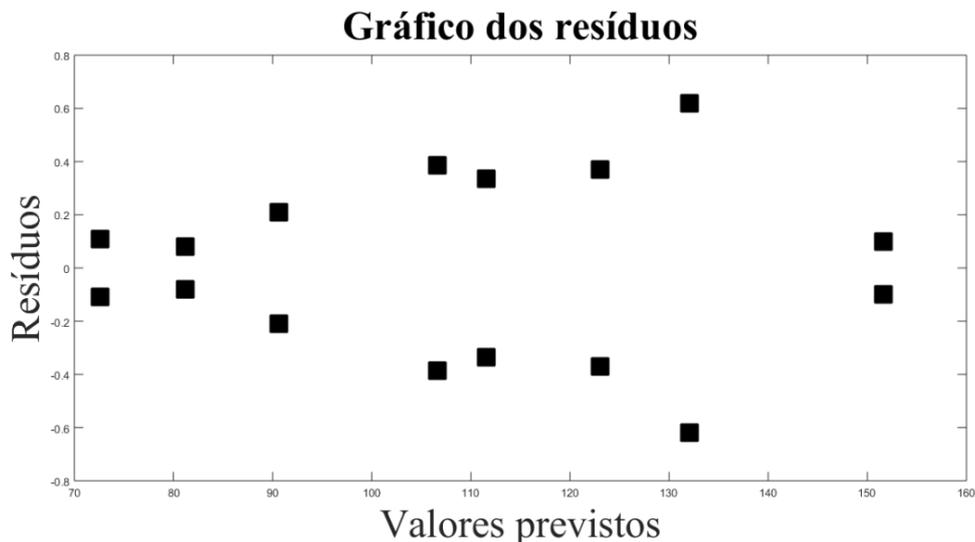
$$\hat{y} = 108,67 (0,06) + 12,81 (0,12) x_1 - 9,33 (0,12) x_2 + 13,32 (0,12) x_3 + 9,68 (0,12) x_1x_2 + 7,06 (0,12) x_1x_3 - 6,04 (0,12) x_2x_3 - 4,08 (0,12) x_1x_2x_3$$

O coeficiente b_0 representa a média global. Os coeficientes b_1 , b_2 , b_3 , b_{12} , b_{13} , b_{23} , e b_{123} representam a variação da resposta por unidade de cada um dos fatores e interações, e por este motivo, eles são a metade dos efeitos calculados anteriormente e as variáveis x_1 , x_2 , e x_3 representam T, C, e H respectivamente.

A avaliação da qualidade do ajuste do modelo linear aos dados experimentais é feita através da avaliação do gráfico de resíduos e da análise da variância (ANOVA). Os resíduos são as diferenças entre os valores experimentais e aqueles previstos pelo modelo (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

No gráfico dos resíduos (Figura 4.15), os resíduos possuem valores pequenos e estão distribuídos ao redor do zero, com valores positivos tão frequente quanto negativos, o que mostra a adequação do modelo.

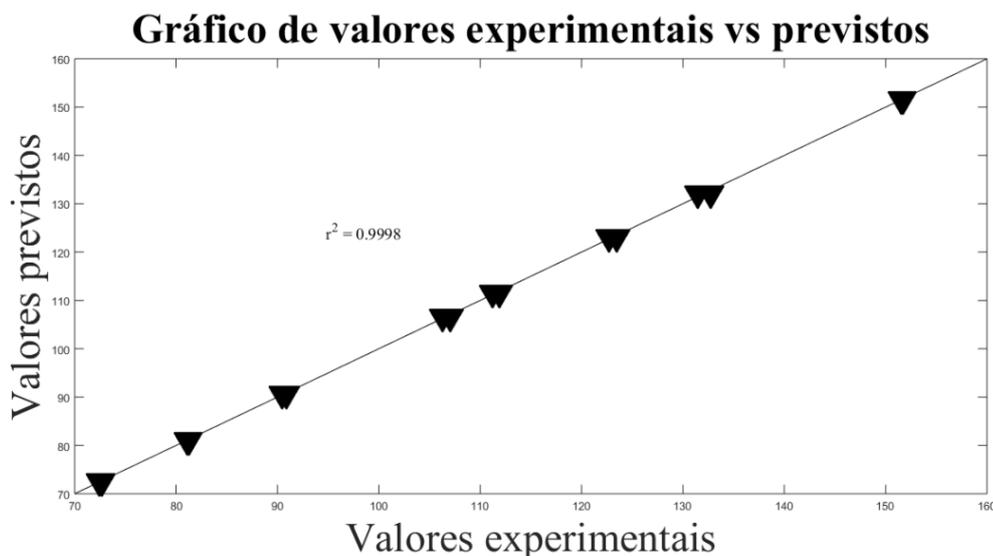
Figura 4.15 – Gráfico dos resíduos no planejamento do índice de acidez.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Isso é confirmado no gráfico de valores experimentais versus previstos (Figura 4.16), em que há concordância entre eles.

Figura 4.16 – Gráfico de valores experimentais versus previstos.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Os resultados da ANOVA para o modelo linear são mostrados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Tabela ANOVA para modelo linear em relação ao índice de acidez.

Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	F	Valor P
Regressão	9999,30	7	1428,47	6687,99	0,0000
Resíduos	1,71	8	0,21		
Falta de ajuste	–	–	–	–	–
Erro puro	1,71	8	0,21		
Total	10001,00	15			
% de variação explicada	99,98				
% máxima de variação explicável	99,98				

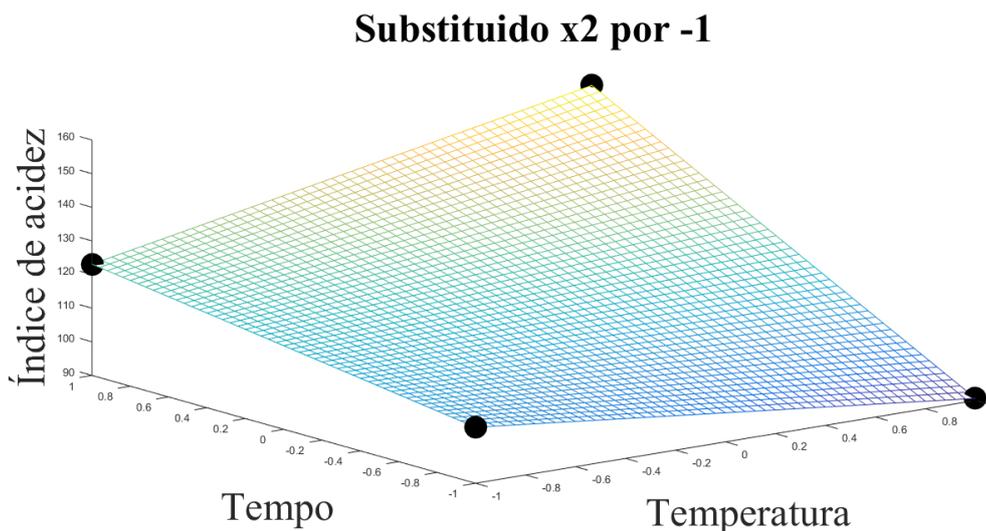
Fonte: Elaborada pela Autora.

Como pode ser observado, o valor F calculado pela divisão da média quadrática da regressão pela média quadrática dos resíduos (6687,99) é maior que o tabelado ($F_{0,001, 7, 8} = 12,40$), e o valor P é nulo, e assim, o modelo é significativo. Além disso, não possui falta de ajuste.

As superfícies de resposta são mostradas na Figura 4.17 e

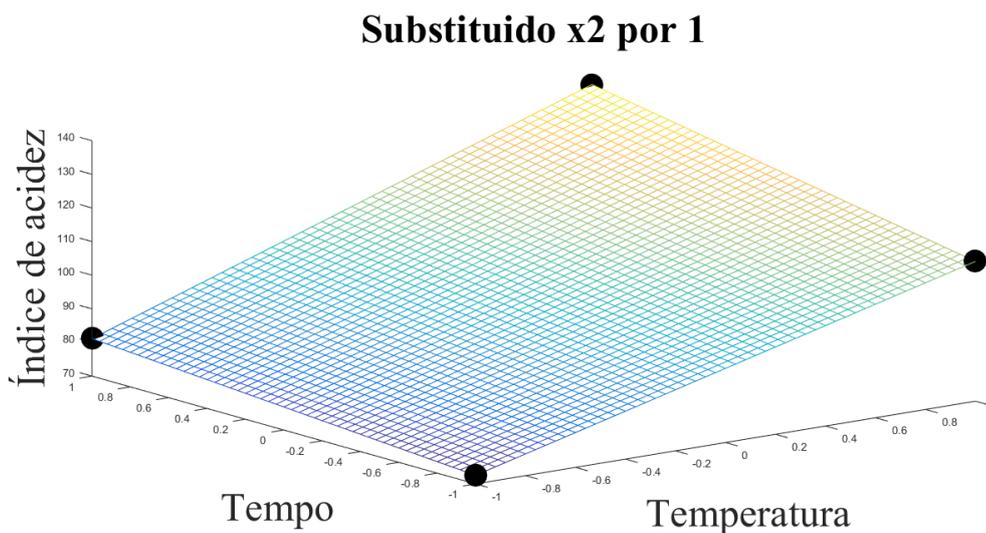
Figura 4.18, mantendo-se x_2 fixo em -1 e 1, respectivamente. Os pontos experimentais são mostrados em cada caso.

Figura 4.17 – Superfície de resposta para o modelo linear completo, em função do índice de acidez.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 4.18 – Superfície de resposta para o modelo linear completo, em função do índice de acidez.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Pelas superfícies (Figura 4.17 e Figura 4.18) pode-se confirmar visualmente que em ambas as condições (x2 substituído por -1, ou x2 substituído por +1), os maiores índices de acidez são obtidos nos experimentos em que tempo e temperatura estão em seus maiores níveis (+, -, +) e (+, +, +).

Aumentar o tempo de reação e a temperatura parece ser o caminho para uma hidrólise mais efetiva, já o aumento da concentração de catalisador básico, nesse caso, não foi sinônimo de liberação de ácidos graxos livres.

Sendo assim, a condição ótima encontrada através do índice de acidez para a obtenção de ácidos graxos livres é aquela em que temperatura é de 90 °C; o catalisador está na concentração de 22% m/m; e o tempo de reação é de 120 min.

4.4 Conclusão

Analisar uma reação somente por um parâmetro, como por exemplo, o rendimento em massa, pode levar ao pesquisador a conclusões equivocadas. Isso porque geralmente o óleo não é totalmente convertido em ácidos graxos livres. Ou seja, o rendimento mássico não é diretamente relacionado com a liberação de ácidos graxos livres.

Na reação de hidrólise de óleos, visando a liberação de ácidos graxos livres, um outro parâmetro pode levar à melhores resultados: o índice de acidez. Além de ser diretamente associado à quantidade de ácidos graxos livres na amostra em questionamento, esse ensaio é de fácil execução, independentemente das normas utilizadas.

Assim, esse trabalho que visou o entendimento da reação de hidrólise de óleo de peixe, definiu as variáveis de importância nesse tipo de reação. A condição ótima encontrada através do índice de acidez para a obtenção de ácidos graxos livres é aquela em que temperatura é de 90 °C, catalisador na concentração de 22% m/m, e tempo de reação de 120 min.

As técnicas de desenho e análise de experimentos são de enorme importância para as conclusões sobre o tema em estudo. Depois de se conduzir a experiência, realizar a análise estatística, e investigar os pressupostos subjacentes; elas possibilitaram o entendimento do processo executado e delinear as próximas etapas a serem atingidas. A próxima etapa do trabalho é a obtenção dos ácidos graxos livres através da condição ótima, assim como sua posterior purificação e caracterização.

4.5 Referências

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. Porto Alegre: Bookman, 2010.

BOTTINO, N. R.; VANDENBURG, G. A.; REISER, R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. **Lipids**, v. 2, n. 6, p. 489–493, 1967.

BOX, G. E. P.; HEINTER, W. G.; HUNTER, J. S. **Statistics for experimenters : an introduction to design, data analysis and model building**. New York: John Wiley & Sons, Inc, 1978.

BREITKREITZ, M. C.; SOUZA, A. M. DE; POPPI, R. J. A didactic chemometrics experiment for design of experiments (DOE): evaluation of experimental conditions in the spectrophotometric determination of Iron II with o -phenanthroline. A tutorial, part III. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564–573, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140092%5Cnhttp://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20140092>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

CHEVREUL, M. E. La saponification. **Recherches chimiques sur les corps gras d'origine animale**. Paris: Levrault, 1823, p. 372–389. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?id=94_H7hfQfS0C&pg=PA473&hl=fr&source=gs_selected_pages#v=onepage&q&f=false>. Acesso em: 28 jan. 2016.

CREXI, V. T. et al. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: Chemical hydrolysis and urea complexation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 329–334, 2012.

F Table. Disponível em: <<http://www.stat.purdue.edu/~jtroisi/STAT350Spring2015/tables/FTable.pdf>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

GANGA, A. et al. Concentration and stabilization of n-3 polyunsaturated fatty acids from sardine oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 6, p. 733–736, 1998.

LÚCIA, V. et al. Characterization of a hydrolyzed oil obtained from fish waste for nutraceutical application. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 321–325, 2015.

MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**. Sétima ed. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc, 2009, 656 f.

MONTGOMERY, D. C. **Diseño y análisis de experimentos**. Segunda ed. México: Limusa Wiley, 2004, 686 f. Disponível em: <<http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=juiga.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=001087>>. Acesso em: 28 jan. 2016.

PADILHA, M. E. D. S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 285–290, 2007.

PAIM, R. M. et al. Concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos a partir de óleo de carpa (*Cyprinus Carpio*) utilizando o método da complexação com uréia. **Vetor**, v. 22, n. 1, p. 18–37, 2012.

RICE, K. E.; WATKINS, J.; HILL, C. G. Hydrolysis of menhaden oil by a *Candida cylindracea* lipase immobilized in a hollow-fiber reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 63, n. 1, p. 33–45, 1999.

SALIMON, J.; ABDULLAH, B.; SALIH, N. Hydrolysis optimization and characterization study of preparing fatty acids from *Jatropha curcas* seed oil. **Chemistry Central Journal**, v. 5, n. 1, p. 67, 2011.

SHIMADA, Y. et al. Enrichment of Arachidonic Acid : Selective Hydrolysis of a single-cell oil from *Mortierella* with *Candida cylindracea* lipase. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 11, p. 1323–1327, 1995.

SOCR (Statistics Online Computational Resource). **T-Distribution Table**. Disponível em: <<http://www.socr.ucla.edu/applets.dir/T-table.html>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

TRENTINI, C. P.; RASPE, D. T.; SILVA, C. DA. Obtenção de Ácidos Graxos Livres do Óleo de Macaúba (*Acrocomia Aculeata*) em Sistema Livre de Solvente Orgânico. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 35, n. 1, p. 15, 2014.

VILELA, L. A. N. **Valorização de óleos de peixe para a produção de biodiesel**. 2010. 51 f. Universidade do Porto, 2010. Disponível em: <<https://repositorio-aberto.up.pt/bitstream/10216/64598/1/000141317.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

WAITZBERG, D. L. **Ômega-3: o que existe de concreto?** Disponível em: <<http://www.nutritotal.com.br/publicacoes/files/644--MonografiaOmega3.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2016.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: Optimization of reaction conditions. **Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 41–49, 1999.

5. CAPÍTULO 5

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS LIVRES OBTIDOS DO FILÉ E DO RESÍDUO DO PEIXE *CLUPEA HARENGUS*

Ingyrd Cristina de Oliveira, Rubia Luchetti Camargo, Tatiana de Oliveira Zuppa Neto, Nelson Roberto Antoniosi Filho

Laboratório de Métodos de Extração e Separação. Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Campus II, Samambaia, CEP.: 74690-900, Goiânia, Goiás, Brasil.

nelson@quimica.ufg.br

ingryd.oliveira.br@gmail.com

RESUMO

Este estudo teve como objetivo a obtenção e caracterização dos ácidos graxos livres obtidos a partir de óleo de filé (FFAF) e de resíduos de peixe (FFAR), através de análises físico-químicas, térmicas, e cromatográficas, visando sua utilização como fonte de matéria-prima graxa para a produção de suplementos nutricionais e biodiesel. Os ácidos graxos livres (FFA) foram obtidos através de hidrólise química dos óleos de resíduos (OR) e filé (OF) com catalisador KOH em rendimentos, respectivos, de 78% m/m e 46% m/m. OR possui maior teor de componentes saponificáveis que OF, gerando maiores quantidades de ácidos graxos livres, o que demonstra o potencial oleoquímico desse resíduo. A conversão em ácidos graxos livres foi obtida com sucesso, demonstrado pelo aumento expressivo no índice de acidez de 7,68 mg KOH/g no OR para 172,22 mg KOH/g no FFAR; e de 8,73 mg KOH/g no OF para 103,53 mg KOH/g no FFAF. A hidrólise causou a diminuição dos teores de elementos químicos de importância nutricional (tais como Ca, K, Mg, e P), mas não afetou significativamente o conteúdo de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados. As curvas de DSC dos ácidos graxos livres apresentaram quatro picos relativos a eventos exotérmicos de congelamento/cristalização. As temperaturas de congelamento/cristalização dos FFAR foram: 15,5 °C; -13,0 °C; -15,0 °C; e -50,5 °C. Já para os FFAF, essas temperaturas de congelamento/cristalização são de: 4,0 °C; -11,0 °C; -19,5 °C; e -49,0 °C. Assim, os ácidos graxos livres obtidos, diferentemente dos óleos, possuem potencial em serem fracionados por resfriamento à temperaturas de cerca de -10 °C a -20 °C.

Palavras-chave: Ácidos graxos livres; Hidrólise química; Óleo de peixe *Clupea harengus*; Biodiesel; ácidos graxos poli-insaturados ômega 3.

5.1 Introdução

Recentemente, os suplementos alimentares de conteúdo ômega-3 têm ganhado popularidade na prevenção de desordens como: depressão; bipolaridade; declínio cognitivo; esquizofrenia; doenças cardiovasculares; problemas de origem inflamatória; além de problemas sociais como o aumento da agressividade (MPA, 2014; SOUZA, 2010).

Apesar de óleos de peixes e de microalgas serem fontes ricas em acilglicerídeos contendo ácidos graxos poli-insaturados, a absorção desses pelo organismo é realizada de maneira mais eficiente na forma de ácidos graxos livres (SHAHIDI, F; WANASUNDARA; WANASUNDARA, 1996).

Além disso, mesmo que os óleos provenientes de pescado sejam ótimas fontes de ácidos graxos poli-insaturados, como geralmente são obtidos industrialmente por processos hidrotérmicos e mecânicos, fornecem um óleo bruto de baixa qualidade. Este óleo demanda então, de purificação visando sua utilização em fins mais nobres, como a suplementação na alimentação humana (MORAIS e SILVA, 2001).

Dentre os mercados que fazem uso de óleos graxos, o de biodiesel também tem ganhado crescente destaque, pois possui menor impacto negativo no meio ambiente quando comparados aos combustíveis de fonte fóssil. Entretanto, a produção de biodiesel em larga escala a partir de oleaginosas convencionais como a soja e a canola, necessita de grandes áreas cultiváveis, ocasionando desmatamentos, em detrimento da produção de alimentos e da biodiversidade local (MENEZES, 2015).

Além disso, aproximadamente 80% do custo de produção do biodiesel é relacionado à matéria graxa, sendo o restante devido a gastos com mão de obra, insumos de energia, catalisador, etc. (LIMA et al., 2010). Assim, uma interessante estratégia para a minimização de custos, seria a utilização de matérias-primas de origem em resíduos, tais como: os óleos de frituras (COSTA NETO et al., 2000, ALMEIDA et al., 2015); os separados a partir de tratamento de efluentes; ou aqueles extraídos de resíduos da indústria pesqueira (BERY, 2012, CASTRO, 2009, FELTES et al., 2010).

Considerando que a indústria pesqueira gera grandes quantidades de resíduos ricos em óleo; e que a produção de pescado pode aliar a produção de alimentos, suplementos, e energia na forma de biodiesel; este trabalho teve como objetivo a obtenção de ácidos graxos livres a partir de óleo resíduos de peixe da espécie *Clupea harengus*, e sua caracterização, com o intuito de vir a se tornar uma matéria-prima em potencial na produção de suplementos alimentares e/ou biodiesel.

5.2 Parte Experimental

5.2.1 Obtenção do ácido graxo proveniente de resíduos de peixe *Clupea harengus*

Em estudo anterior, a melhor condição para a obtenção de ácidos graxos livres foi investigada (CAPÍTULO 4), encontrando as variáveis nos níveis que a temperatura é de 90 °C, catalisador na concentração de 22% m/m, e tempo de reação de 2 h.

A primeira etapa para a obtenção dos ácidos graxos livres foi a saponificação do óleo de peixe. Nela empregou-se um reator MARCONI® modelo MA 127/88/150 (Figura 5.1), onde foram adicionados 340 g de óleo de resíduos de peixe, implementando-se aquecimento até 90 °C. Quando o óleo atingiu 90 °C, acrescentou-se o catalisador básico na concentração de 22%, equivalendo a 88 g de hidróxido de potássio 85% em lentilhas (QUEMIS®, CAS N°. 1310-58-3), dissolvidos em 150 mL de água destilada (2:1 $m_{\text{óleo}}/V_{\text{água}}$). A reação prosseguiu sob agitação de 250 RPM durante 120 min.

Figura 5.1 – Saponificação do óleo de peixe em reator MARCONI®.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Ao fim da reação, obteve-se um sabão contendo ácidos graxos e potássio, de pH 14. Após esse tempo, o conteúdo do reator foi transferido para um béquer de 2 L da UNIGLASS[®], onde foi observada a separação de duas fases: uma camada superior e sólida, formada de sais de ácidos graxos; e uma inferior e líquida, formada de água e matéria insaponificável. A fase inferior foi retirada e desprezada. Tais etapas são apresentadas na Figura 5.2.

Figura 5.2 – Produtos de Saponificação.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Em detalhe: a) aspecto do sabão formado após a saponificação com solução aquosa básica de KOH; b) aspecto do sabão ainda no reator; c) formação de duas fases após a saponificação, uma superior formada de sabão, e uma inferior formada de matéria insaponificável e água.

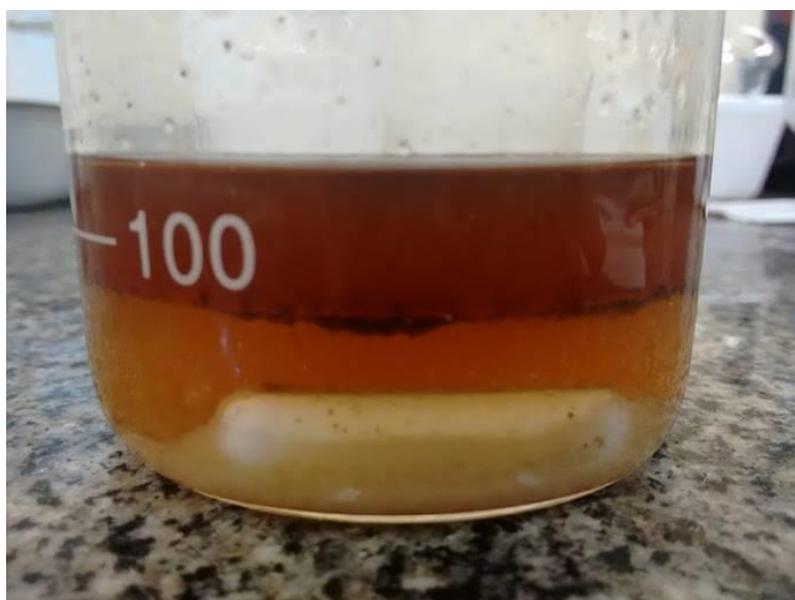
A segunda etapa do processo é a acidificação do sabão. Essa etapa tem como objetivo a conversão dos sais graxos de potássio em ácidos graxos livres. Para isso, a mistura saponácea foi submetida à agitação em agitador magnético FISATOM[®] modelo 7524, e ao gotejamento de 50 mL ácido orto-fosfórico P.A. 85% (CAS N^o. 7664-38-2, lote 19211), com o auxílio de uma pipeta graduada de 20 mL da PYROBRAS[®].

A quantidade de ácido foi determinada visualmente pela destruição dos núcleos de sabão, a observação de duas fases, e a obtenção de um pH 1,0 (utilizou-

se fitas de papel tornassol pH-Fix 0-14 Ref. 92110 MACHEREY-NAGEL®). Após a acidificação, a mistura foi submetida à agitação por 30 min em agitador magnético.

O conteúdo do béquer (Figura 5.3) foi transferido para um funil de separação Marconi de capacidade de 2 L. Houve a separação completa em duas fases: uma superior de aspecto âmbar, formada de ácidos graxos livres; e uma inferior, de aspecto amarelado, contendo: glicerol; sais de fosfato de potássio; e excesso de água e ácido. A camada inferior foi retirada e desprezada.

Figura 5.3 – Aspecto após a acidificação do sabão.

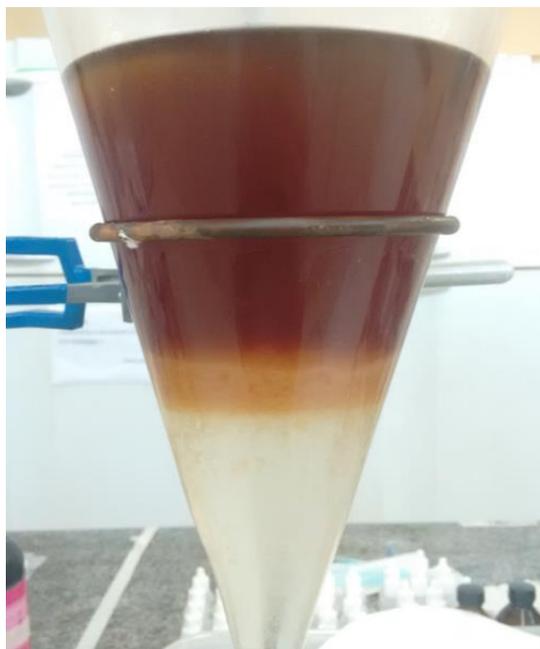


Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: Na figura, pode-se ver a separação de duas fases após o procedimento de acidificação. A camada superior, de aspecto âmbar, é formada de ácidos graxos livres. A camada inferior, de aspecto amarelado, contém: glicerol; sais de fosfato de potássio; e excesso de água e ácido.

A terceira etapa é a de purificação dos ácidos graxos livres (Figura 5.4). A camada superior, de aspecto âmbar, foi lavada com 170 mL de água quente (aproximadamente 90 °C) por 11 vezes, até que o pH atingido pela água de lavagem permanecesse constante em 6,0 por mais três lavagens. A etapa de lavagem do óleo e/ou biodiesel com água aquecida é importante na purificação da matéria-prima, pois remove fosfolipídeos, ceras, substâncias coloidais, e íons metálicos (MENEZES, 2015).

Figura 5.4 – Lavagem da fase de ácidos graxos com água quente para retirada dos fostatos residuais.



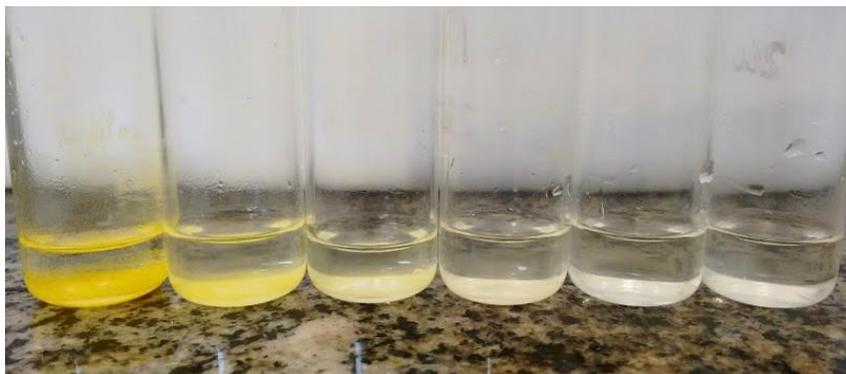
Fonte: Elaborada pela Autora.

Além disso, concomitantemente, foi feito na água de lavagem o teste qualitativo da presença de fosfato (Figura 5.5). Nesse teste foi empregado um pequeno tubo de ensaio, onde 1 mL da água de lavagem entrou em contato com 1 mL de solução de ácido nítrico 6 mol/L, e 1 mL de solução de molibdato de amônio 0,1 mol/L.

A presença de fosfato foi evidenciada pela formação de um precipitado de fosfomolibdato de amônio, de coloração fortemente amarela, separado por centrifugação. A ausência de precipitado e da cor amarela demonstrava visualmente que as espécies de fosfato haviam diminuído. Na Figura 5.5, da esquerda para a direita, apresenta-se os resultados que evidenciaram a diminuição da concentração de fosfato na fração de ácidos graxos lavada com água quente.

A quarta etapa é a recuperação dos ácidos graxos livres. A mistura de ácidos graxos foi submetida à secagem com sulfato de sódio anidro (Figura 5.6), e concomitante filtração simples realizada com um funil de vidro e papel quantitativo GE 42 de 24 cm de diâmetro (CAT N° 1442-240), com o filtrado sendo deslocado para um balão de fundo redondo de 500 mL da PHOX[®]. Logo após, a rotaevaporação foi realizada a 60 °C e ~ 600 mmHg, utilizando um evaporador rotativo QUIMIS[®]. A mistura de ácidos graxos livres obtida apresentou pH 6.

Figura 5.5 – Teste para fosfatos na água de lavagem dos ácidos graxos livres.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 5.6 – Filtração simples com sulfato de sódio anidro.



Fonte: Elaborada pela Autora.

O mesmo procedimento também foi realizado para a obtenção de ácidos graxos a partir do óleo de filé.

5.2.2 *Rendimento*

Os rendimentos em ácidos graxos foram determinados a partir da relação entre as massas de ácidos graxos livres, e as massas de óleos utilizadas para obter os ácidos graxos livres; do óleo de resíduos e do óleo de filé de *Clupea harengus*.

5.2.3 *Propiedades físico-químicas*

Os óleos de filé e de resíduos de peixe, e as amostras de ácidos graxos livres do filé e de resíduos foram caracterizados através dos ensaios de índice de saponificação (AOAC Official Method 920160); índice de acidez (AOCS Official Method Cd3d-63); índice de iodo (EN 14111); massa específica a 15 °C (NBR 14065); viscosidade cinemática a 40 °C (NBR10441); e estabilidade oxidativa (EN14112).

5.2.4 *Análise de elementos químicos*

A determinação de elementos químicos foi realizada por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES), segundo a norma ASTM D5185 - Método de teste padrão para a determinação multielementar de óleos lubrificantes usados, não usados, e Óleos base por Espectrometria de Emissão Atômica de Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES).

Todos os recipientes utilizados foram submetidos ao procedimento de descontaminação por contato com ácido nítrico 10% (VETEC[®]) por 48 horas, e posterior tríplice lavagem com água (18,2 MΩ cm⁻¹ de resistividade) purificada por sistema Milli-Q[®].

Para quantificação foi utilizado ICP-OES da Thermo Fisher Scientific, modelo iCAP 6300 Duo, com detector simultâneo CID (Charge Injection Device) e medida espectral de 166 a 847 nm. O gás utilizado para formação do plasma e purga da ótica foi argônio 5.0. Os acessórios para introdução da amostra de óleo de peixe foram tubos de viton, nebulizador tipo "V-groove", câmara de nebulização ciclônica com restrição interna e tubo central de 1 mm.

Os parâmetros instrumentais do ICP-OES foram: modo de observação do plasma axial; rotação da bomba de 25 RPM; potência na fonte de 1250 W; vazão do gás auxiliar de 1,5 L/min; e pressão do gás de nebulização de 0,16 Mpa.

Os comprimentos de onda foram escolhidos levando em consideração as linhas de maior intensidade de emissão corrigida, e de menor número de interferentes, sendo: Ag (328,068 nm); Al (396,152 nm); B (249,773 nm); Ba (233,527 nm); Ca (3158 nm); Cd (228,802 nm); Cr (283,563 nm); Cu (324,754 nm); Fe (259,940 nm); K (766,490 nm); Mg (285,213 nm); Mn (257,610 nm); Mo (281,615nm); Na (588,995 nm); Ni (221,647 nm); P (213,6 nm); Pb (220,353 nm); Si (251,611 nm); Sn (283,999 nm); Ti (334,941 nm); V (309,311 nm); Zn (206,2 nm); e Y (371,030 nm).

Os padrões organometálicos utilizados foram o multielementar S21+K e monoelementar de Y da Conostan[®]. As amostras e soluções de calibração foram preparados por diluição com o solvente PremisolvTM da Conostan[®] e utilizando Ítrio (Y) como padrão interno.

As amostras de óleo de filé, óleo de resíduos, ácidos graxos de filé, e ácidos graxos livres de resíduos foram pesadas (0,20 g) em balões volumétricos de 25 mL de capacidade, tendo sido acrescentados (0,20 g) de padrão interno Y (Conostan[®]), e a massa total foi completada em 20 g com solvente PremisolvTM da Conostan[®].

5.2.5 *Composição em ácidos graxos*

Para a análise cromatográfica do perfil de ácidos graxos livres obtidos a partir dos resíduos e os obtidos a partir do filé de peixe, fez-se a transesterificação do óleo de peixe de acordo com uma adaptação para microescala (ANTONIOSI-FILHO, 1995) do método desenvolvido por Hartman e Lago (HARTMAN, L.; LAGO, 1973), visando analisar os ácidos graxos livres na forma de ésteres metílicos de ácidos graxos (Fatty Acid Methyl Esters - FAME). Os procedimentos dos processos de transesterificação e análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME) estão descritos no CAPÍTULO 3.

5.2.6 *Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)*

Visando avaliar a possibilidade da obtenção de frações de ácidos graxos com diferentes graus de insaturação, avaliou-se as temperaturas dos eventos de fusão das amostras de ácidos graxos livres do filé e dos resíduos, por DSC de resfriamento. Tais análises foram realizadas em equipamento modelo 822^e da Mettler Toledo[®]. Cada amostra foi colocada em banho de água a 80 °C, e arrefecida naturalmente para assegurar total homogeneidade e destruição dos núcleos de cristalização.

Foi realizada uma curva dinâmica com intervalo de 25 °C a -70 °C. A razão de resfriamento ou de aquecimento foi de 2 °C/min. Foi utilizada uma atmosfera de ar a uma vazão de 50 mL/min e um cadinho de alumínio com tampa perfurada. Todas as amostras foram pesadas em cerca de 5 mg.

5.3 Resultados

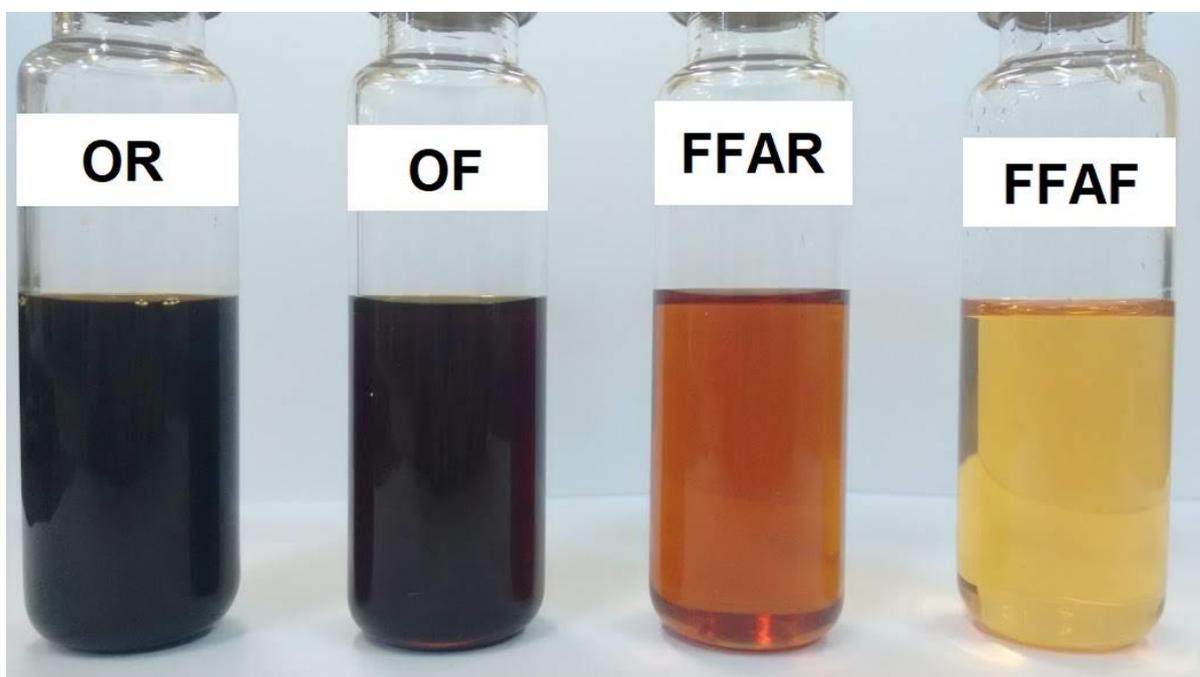
5.3.1 Rendimento

Os ácidos graxos a partir do óleo de resíduos foram obtidos com 78% ($m_{\text{FFA}}/m_{\text{óleo}}$) de rendimento, enquanto que os ácidos graxos a partir do óleo de filé foram obtidos com 46% ($m_{\text{FFA}}/m_{\text{óleo}}$) de rendimento. Isso indica que o óleo do filé apresentava maiores quantidades de componentes lipídicos não saponificáveis, quando comparado ao óleo de resíduos.

5.3.2 Propiedades físico-químicas

O aspecto visual dos óleos e dos seus ácidos graxos livres, obtidos através da hidrólise, é mostrado na Figura 5.7.

Figura 5.7 – Aspecto visual dos óleos de resíduos e filé de peixe, e ácidos graxos obtidos através da hidrólise desses óleos.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Na figura: OR= óleo de resíduos de peixe; OF= óleo de filé de peixe; FFAR= ácidos graxos a partir da hidrólise de OR; e FFAF= ácidos graxos a partir da hidrólise de OF.

Os resultados das análises físico-químicas são descritos na Tabela 5.1. Pode-se observar que, como consequência da conversão dos óleos a ácidos graxos, o índice de acidez dos ácidos graxos livres obtidos a partir do óleo de resíduos foi cerca de 22 vezes o valor do índice de acidez desse óleo antes da hidrólise; e o índice de acidez da amostra de ácidos graxos livres obtidos a partir do óleo de filé foi cerca de 12 vezes superior ao do óleo de origem.

Tabela 5.1 – Resultados das análises físico-químicas.

Análises Físico-químicas	Resultados em função da amostra			
	OR	FFAR	OF	FFAF
Índice de Acidez (mg KOH/g)	7,68 ± 0,02 ^d	172,22 ± 0,35 ^a	8,73 ± 0,01 ^c	103,53 ± 0,20 ^b
Índice de Iodo (gl/100 g)	125,46 ± 0,09 ^b	122,43 ± 0,08 ^c	125,95 ± 0,06 ^a	126,00 ± 0,07 ^a
Massa Específica (Kg/m ³)	890,22 ± 0,13 ^a	883,85 ± 0,18 ^c	888,92 ± 0,02 ^b	882,88 ± 0,02 ^d
Viscosidade Cinemática (mm ² /s)	39,96 ± 0,07 ^a	15,50 ± 0,06 ^c	34,05 ± 0,11 ^b	14,54 ± 0,12 ^d
Período de Indução (h)	2,87 ± 0,03 ^a	0,86 ± 0,03 ^c	2,71 ± 0,00 ^b	0,71 ± 0,02 ^d

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: OR = óleo de resíduos de peixe; FFAR = ácidos graxos livres de resíduos de peixe; OF = óleo de filé de peixe; e FFAF = ácidos graxos livres de filé de peixe. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p = 0,05$), $n = 3$.

Os valores de massa específica, viscosidade, e tempo de indução, avaliados pelo teste de Tukey, foram significativamente diferentes ($p = 0,05$) para as situações avaliadas e se apresentaram em uma mesma ordem decrescente de valor: óleo de resíduos > óleo de filé > ácidos graxos livres de óleo de resíduos > ácidos graxos livres de óleo de filé.

Vale observar que a conversão de óleo a ácidos graxos livres diminui a estabilidade oxidativa da amostra a valores que obrigatoriamente exigirão a tomada de providências, para que tais matérias graxas sejam usadas como nutracêuticos. Isso inclui estabilização das amostras via encapsulamento isento de ar e em cápsula escura, bem como uma possível adição de antioxidantes às amostras.

5.3.3 Análise de elementos químicos

O teor dos elementos químicos encontrados e seus respectivos desvios padrão são informados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Teores de elementos químicos.

Elemento			Resultado (mg/kg)			
Nome	Símbolo	LQ (mg/kg)	OR	FFAR	OF	FFAF
Prata	Ag	0,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Alumínio	Al	1,4	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Boro	B	1,1	18,6±0,4 ^a	17,6±0,3 ^a	18,2±0,8 ^a	18±3,9 ^a
Bário	Ba	0,1	0,6±0,1 ^a	0,6±0,1 ^a	0,6±0 ^a	0,7±0,1 ^a
Cálcio	Ca	0,8	31±1,4 ^a	11±0,8 ^b	10,6±0,6 ^b	7,6±1,0 ^c
Cádmio	Cd	0,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Crômio	Cr	0,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Cobre	Cu	0,7	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Ferro	Fe	0,1	1,7±0,1 ^a	0,3±0,1 ^b	0,2±0,1 ^b	0,3±0,1 ^b
Potássio	K	2,3	69,8±0,1 ^a	26,6±0,4 ^c	43,8±0,8 ^b	20,5±0,1 ^d
Magnésio	Mg	0,2	27,7±0,7 ^a	0,6±0,1 ^c	4,2±0,1 ^b	1,1±0,4 ^c
Manganês	Mn	0	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Molibdênio	Mo	0,5	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Sódio	Na	9,2	107,9±3,2 ^c	406,4±3 ^a	74±8,6 ^d	355,3±10,7 ^b
Níquel	Ni	0,3	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Fósforo	P	2,1	834±7,3 ^a	51,8±0,7 ^c	311,8±3,6 ^b	19,9±6,1 ^d
Chumbo	Pb	0,7	<LOQ	1±0,2 ^a	<LOQ	1±0,2 ^a
Silício	Si	1,2	2,6±0,9 ^b	4,9±0,2 ^a	2,1±0,2 ^b	4,3±0,4 ^a
Estanho	Sn	1	1±0,4 ^a	1,7±0,5 ^a	<LOQ	1±0,2 ^a
Titânio	Ti	0,1	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Vanádio	V	0,2	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Zinco	Zn	0,3	2,4±0,1 ^b	4,5±1 ^a	2,4±0,3 ^b	4±0,2 ^a

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: OR = óleo de resíduos de peixe; FFAR = ácidos graxos livres de resíduos de peixe; OF = óleo de filé de peixe; e FFAF = ácidos graxos livres de filé de peixe.

Observação: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p = 0,05$), $n = 3$.

Pela análise de elementos químicos, os elementos preponderantes para cada amostra foram, em ordem decrescente: OR (P, Na, K, Ca, Mg); FFAR (Na, P, K, B, Ca); OF (P, Na, K, B, Ca); e FFAF (Na, K, P, B, Ca).

Os teores dos elementos químicos macrominerais Ca, K, Mg, e P, importantes na nutrição, necessários em quantidades de mais de 100 mg/dia, decresceram após o processo de hidrólise do óleo.

Em contrapartida, os teores dos elementos Na, Si, e Zn cresceram após a formação dos ácidos graxos livres. O acréscimo de sódio pode ter sido causado pela secagem dos ácidos graxos livres com sulfato de sódio anidro, e o leve acréscimo de silício, pelo armazenamento em frascos de vidro (SiO₂) âmbar.

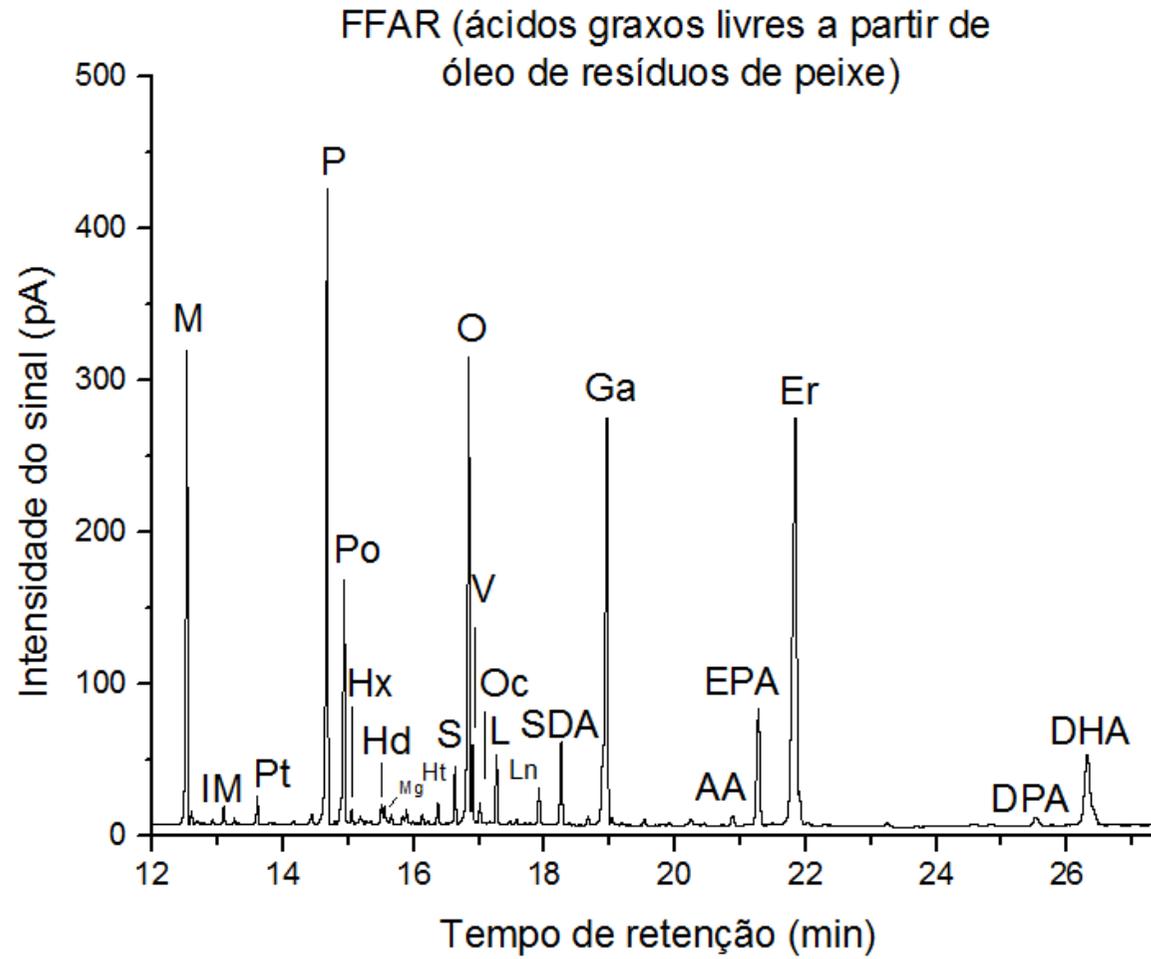
5.3.4 Composição em ácidos graxos

A composição em ácidos graxos é detalhada na Figura 5.8, na Figura 5.9, na Tabela 5.3, e na Tabela 5.4. Através da composição em ácidos graxos, pode-se notar que os ácidos graxos mais abundantes nas quatro amostras, em ordem decrescente de abundância, são: o erúcico (C22:1 ω 9); o palmítico (C16:0); o gadoléico (C20:1 ω 9); e o mirístico (C14:0) e o oléico (C18:1 ω 9) com teores similares. Dentre os ácidos poli-insaturados tipo ω 3 destacam-se o EPA e o DHA.

O óleo e os ácidos graxos livres a partir do filé (OF e FFAF) possuem significativamente maiores teores percentuais em ácidos graxos PUFA, ω 3-PUFA, e de somatório EPA+DPA+DHA do que o óleo e ácidos graxos livres a partir dos resíduos de peixe (OR e FFAR). Entretanto os teores totais em saturados e insaturados foram semelhantes.

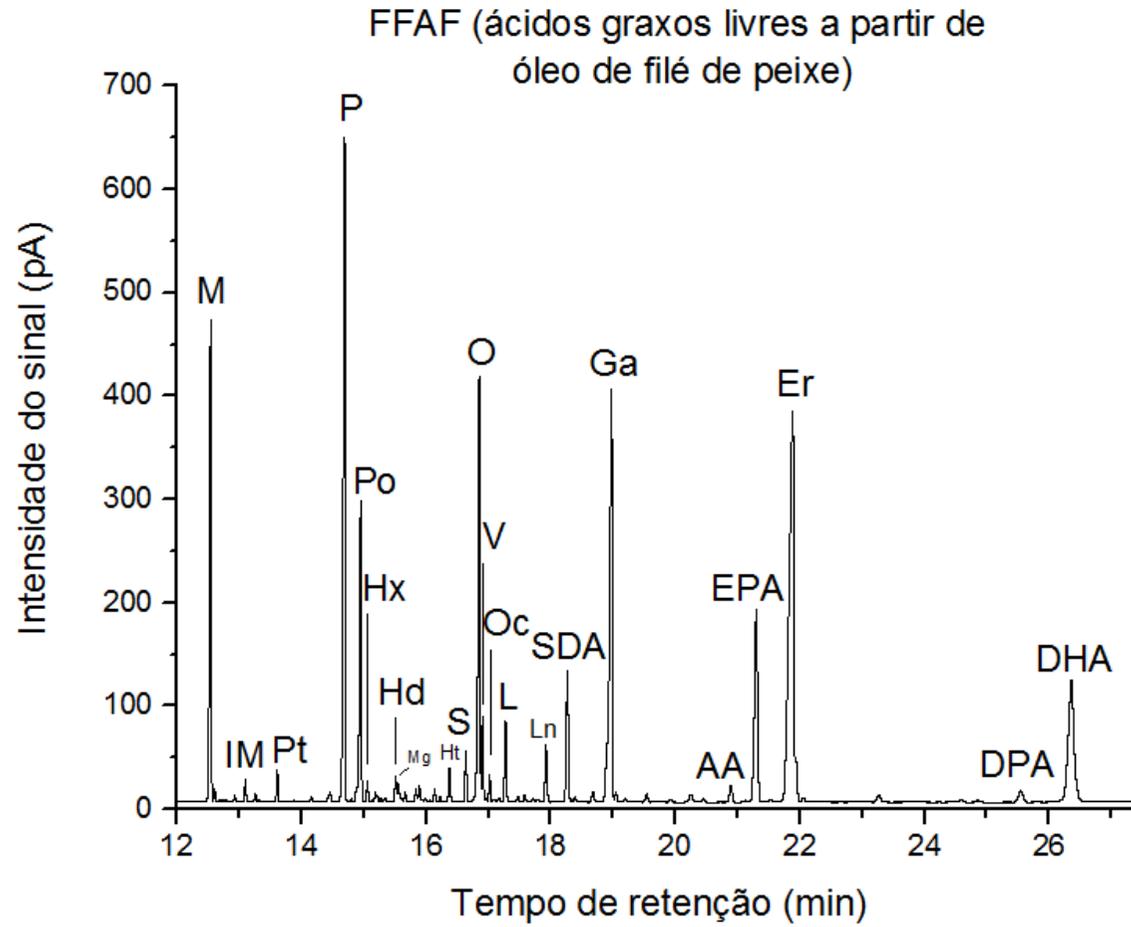
Além disso, tem-se que o procedimento de hidrólise não afetou o conteúdo de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados significativamente (Tabela 5.4). Como comparativo, no estudo de Ratnayake e colaboradores (RATNAYAKE *et al.*, 1988), o perfil de ácidos graxos do óleo de *Clupea harengus* encontrado foi de 28,7% de ácidos graxos saturados; 52,9% de monoinsaturados; 18,4% de total de poli-insaturados; 14,5% foram de graxos poli-insaturados ômega 3 (PUFAS ω -3); e 10,3% a somatória de ácidos graxos EPA, DPA, e DHA. Ou seja, o perfil de ácidos graxos obtido, e o teor de PUFA é semelhante.

Figura 5.8 – Cromatograma dos FFAR.



Fonte: Elaborada pela Autora

Figura 5.9 – Cromatograma dos FFAF.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Tabela 5.3 – Composição em ácidos graxos dos ácidos graxos livres de resíduos de peixe (FFAR) e dos ácidos graxos livres de filé de peixe (FFAF) da espécie *Clupea harengus* e seus respectivos óleos (OR e OF).

Ácidos graxos		Teor percentual em ácidos graxos (%)			
Simbologia	Notação	OR	FFAR	OF	FFAF
C14:0	M	10,34 ± 0,68 ^a	10,29 ± 0,88 ^a	9,71 ± 0,33 ^a	9,29 ± 0,22 ^a
12-Me-C13:0	IM	0,38 ± 0,02 ^a	0,36 ± 0,03 ^a	0,37 ± 0,01 ^a	0,37 ± 0,01 ^a
C15:0	Pt	0,56 ± 0,03 ^a	0,55 ± 0,04 ^a	0,53 ± 0,02 ^a	0,53 ± 0,01 ^a
C16:0	P	15,42 ± 0,76 ^a	14,88 ± 0,72 ^a	15,25 ± 0,46 ^a	14,95 ± 0,23 ^a
C16:1(9) ω7	Po	6,41 ± 0,35 ^a	6,34 ± 0,33 ^a	6,41 ± 0,19 ^a	6,09 ± 0,11 ^a
C16:1	Hx	0,39 ± 0,03 ^a	0,35 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,00 ^a
C16:2	Hd	0,51 ± 0,03 ^a	0,49 ± 0,01 ^a	0,51 ± 0,03 ^a	0,48 ± 0,01 ^a
C17:0	Mg	0,44 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,05 ^a	0,35 ± 0,06 ^a	0,41 ± 0,02 ^a
C16:4 (6,9,12,15) ω3	Ht	0,63 ± 0,02 ^a	0,66 ± 0,04 ^a	0,71 ± 0,05 ^a	0,62 ± 0,01 ^a
C18:0	S	1,05 ± 0,02 ^a	1,05 ± 0,02 ^a	0,89 ± 0,02 ^b	0,92 ± 0,00 ^b
C18:1 (9) ω9	O	10,62 ± 0,28 ^a	10,51 ± 0,08 ^a	8,93 ± 0,10 ^b	8,95 ± 0,05 ^b
C18:1 (11) ω7	V	1,55 ± 0,03 ^a	1,53 ± 0,03 ^a	1,42 ± 0,03 ^b	1,40 ± 0,01 ^b
C18:1(13)	Oc	0,49 ± 0,02 ^a	0,49 ± 0,03 ^a	0,47 ± 0,01 ^a	0,48 ± 0,00 ^a
C18:2(9,12) ω6	L	1,51 ± 0,03 ^{ab}	1,50 ± 0,03 ^{ab}	1,46 ± 0,01 ^b	1,53 ± 0,01 ^a
C18:3 (9,12,15) ω3	Ln	1,11 ± 0,03 ^a	1,12 ± 0,00 ^a	1,21 ± 0,07 ^a	1,19 ± 0,01 ^a
18:4(6,9,12,15) ω3	SDA	2,81 ± 0,06 ^b	2,86 ± 0,01 ^b	3,14 ± 0,05 ^a	3,04 ± 0,02 ^a
C20:1(9) ω11	Ga	13,44 ± 0,28 ^a	12,81 ± 0,49 ^a	13,33 ± 0,19 ^a	13,04 ± 0,15 ^a
20:4 (5,8,11,14) ω6	AA	0,48 ± 0,01 ^b	0,49 ± 0,02 ^b	0,51 ± 0,01 ^{ab}	0,52 ± 0,01 ^a
20:5 (5,8,11,14,17) ω3	EPA	6,03 ± 0,11 ^b	6,17 ± 0,18 ^b	6,70 ± 0,07 ^a	6,61 ± 0,06 ^a
22:1 (13) ω9	Er	18,95 ± 1,38 ^a	19,73 ± 1,02 ^a	19,90 ± 0,79 ^a	20,81 ± 0,48 ^a
22:5 (7,10,13,16,19) ω3	DPA	0,52 ± 0,04 ^a	0,54 ± 0,03 ^a	0,57 ± 0,02 ^a	0,58 ± 0,01 ^a
22:6 (4,7,10,13,16,19) ω3	DHA	6,33 ± 0,47 ^b	6,84 ± 0,34 ^b	7,28 ± 0,28 ^{ab}	7,85 ± 0,13 ^a

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p = 0,05$), $n = 3$.

Tabela 5.4 – Composição percentual em área normalizada por tipo de classes lipídicas de ácidos graxos.

Tipos de ácidos graxos		Teor percentual em área normalizada (%)			
Classe lipídica	Notação	OR	FFAR	OF	FFAF
Saturados	SFA	28,19 ± 1,48 ^a	27,57 ± 1,65 ^a	27,10 ± 0,86 ^a	26,46 ± 0,46 ^a
Insaturados	UFA	71,81 ± 1,49 ^a	72,43 ± 1,65 ^a	72,90 ± 0,85 ^a	73,54 ± 0,47 ^a
Monoinsaturados	MUFA	51,86 ± 1,02 ^a	51,76 ± 1,14 ^a	50,81 ± 0,66 ^a	51,13 ± 0,39 ^a
Di-insaturados	DUFA	2,02 ± 0,06 ^a	1,99 ± 0,04 ^a	1,97 ± 0,03 ^a	2,00 ± 0,01 ^a
Tri-insaturados	TUFA	1,11 ± 0,03 ^b	1,12 ± 0,00 ^a	1,21 ± 0,07 ^a	1,19 ± 0,01 ^a
Poli-insaturados	PUFA	19,95 ± 0,47 ^b	20,67 ± 0,51 ^b	22,09 ± 0,21 ^a	22,42 ± 0,18 ^a
Ômega-3	ω3-PUFA	17,44 ± 0,51 ^b	18,19 ± 0,50 ^b	19,61 ± 0,21 ^a	19,89 ± 0,18 ^a
EPA+DPA+DHA	EPA+DPA+DHA	12,88 ± 0,62 ^b	13,55 ± 0,54 ^b	14,55 ± 0,37 ^a	15,05 ± 0,19 ^a

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: OR = óleo de resíduos de peixe; FFAR = ácidos graxos livres a partir de OR; OF = óleo de filé de peixe; FFAF = ácidos graxos livres a partir de OF; PUFA = ácidos graxos com duas ou mais insaturações.

Observação: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p = 0,05$), $n = 3$.

Para fins como matéria-prima para biodiesel, os óleos e ácidos graxos livres de peixe deverão passar por um processo de separação dos ácidos graxos poli-insaturados, já que por exemplo, a norma europeia EN 14214 estipula o limite máximo aceitável no biodiesel de 12% para o teor de ácidos graxos tri-insaturados (tais como o linolênico), e de 1% para os ácidos graxos com mais de três duplas ligações (MENEZES, 2015).

Neste sentido, apesar de apresentar conteúdos aceitáveis de ácidos graxos tri-insaturados; os teores de poli-insaturados, de no mínimo 19,95%, encontram-se bem acima do máximo de 1% estabelecido pela norma. Assim, é necessário separar tais ácidos poli-insaturados dos demais, gerando assim uma fração rica em ácidos

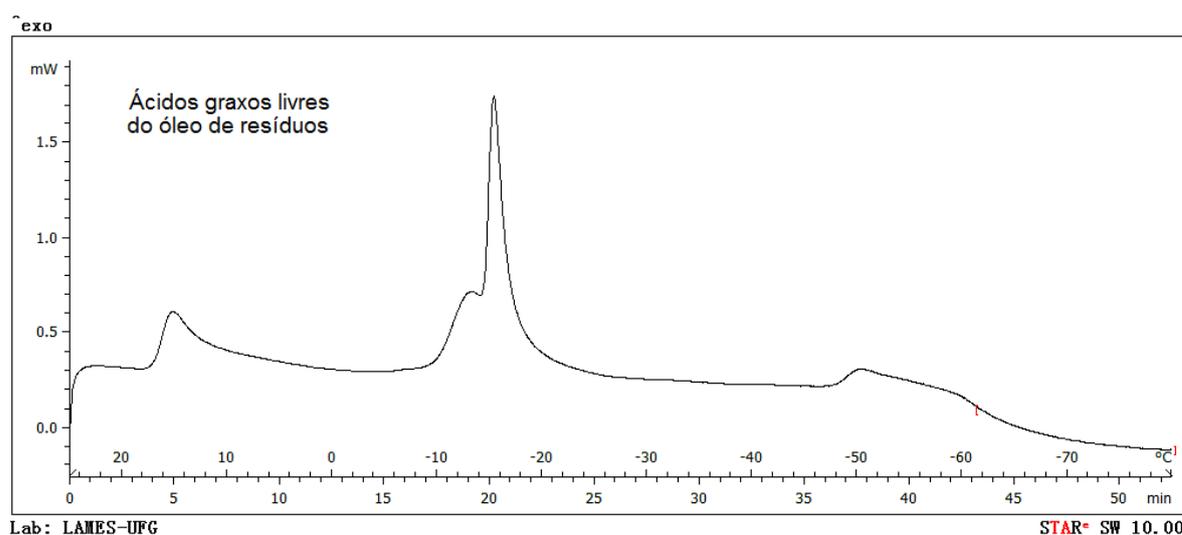
graxos de importância nutracêutica, bem como permitindo com que uma fração de maior estabilidade oxidativa seja usada para a produção de biodiesel.

5.3.5 Análise por calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As curvas de DSC de ácidos graxos livres obtidos a partir dos óleos de resíduos (Figura 5.10) e de filé (Figura 5.11) de *Clupea harengus* podem fornecer informações importantes para avaliar a possibilidade de fracionamento de ácidos graxos pelo grau de insaturação via resfriamento das amostras.

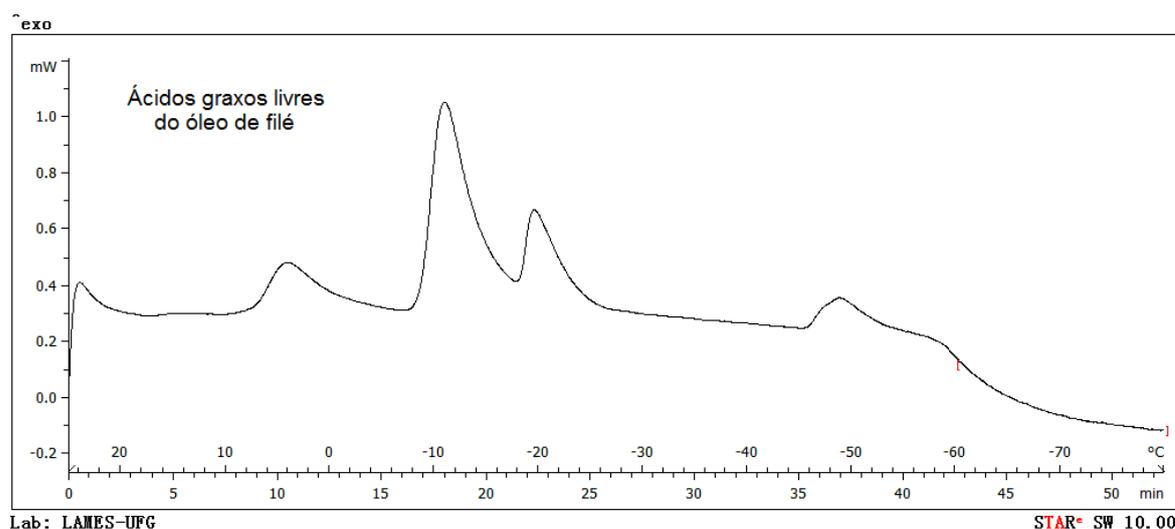
As curvas de DSC dos ácidos graxos livres apresentam quatro picos relativos a eventos exotérmicos de congelamento/cristalização. As temperaturas de congelamento/cristalização relativas aos picos de DSC de ácidos graxos livres obtidos a partir dos resíduos de peixe são de: 15,5 °C; -13,0 °C; -15,0 °C; e -50,5 °C (Figura 5.10). Já para os ácidos graxos livres obtidos a partir de óleo de filé, essas temperaturas de congelamento/cristalização são de: 4,0 °C; -11,0 °C; -19,5 °C; e -49,0 °C (Figura 5.11).

Figura 5.10 – Curva DSC dos ácidos graxos livres obtidos do óleo de resíduos de peixe.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Figura 5.11 – Curva DSC de ácidos graxos livres obtidos do óleo de filé de peixe.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Nos ácidos graxos, os fatores que afetam o ponto de fusão são: o tamanho da cadeia dos ácidos graxos (quanto maior a cadeia carbônica, maior ponto de fusão); o grau de insaturação (quanto mais insaturado, menor o ponto de fusão); e a isomeria (ácidos graxos *trans* possuem maior ponto de fusão que os *cis*) (INSUMOS, 2015).

Assim, é provável que a primeira temperatura de cristalização presente nas curvas de DSC seja relativa aos ácidos graxos saturados; as temperaturas intermediárias, relativas aos ácidos graxos monoinsaturados, di-insaturados, e tri-insaturados; e a última temperatura de cristalização, seja relativa aos ácidos graxos poli-insaturados (GALLO, 2015; KNOTHE, G; DUNN, 2009). Conseqüentemente, o resfriamento à temperaturas de até $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou abaixo, seja necessário na concentração de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3.

Isso acontece porque o aumento das insaturações nos ácidos graxos é acompanhado pela diminuição do ponto de fusão. Os ácidos graxos saturados são sólidos à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$), e por terem um fácil empacotamento intermolecular, causado pela ausência das insaturações, possuem alto ponto de fusão (IMAHARA, MINAMI, SAKA, 2006).

Já nos ácidos graxos insaturados, a presença de ligações duplas de conformação *cis* introduz um ângulo na estrutura dos ácidos graxos, diminuindo assim a ordem do empacotamento e o número de interações de van der Waals entre

as cadeias. Como consequência, menor energia é necessária para perturbar o empacotamento dos ácidos graxos. Por esta razão, os ácidos graxos insaturados possuem menores pontos de fusão que os saturados.

Assim, para fracionar ácidos graxos em função de seu grau de insaturação é necessário avaliar a ocorrência de processos de cristalização/congelamento das amostras nas temperaturas ao redor de $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, visando obter uma fração líquida rica em poli-insaturados para destinação como nutracêutico, e outra fração menos insaturada para destinação à produção de biodiesel.

5.4 Conclusão

O aproveitamento de passivos ambientais como os resíduos de pescado é garantia que o aumento da produção de pescado mundial seja de maneira responsável; e conseqüentemente, a inclusão social, a geração de riqueza, e a redução dos impactos ambientais.

Assim, após a extração do óleo de *Clupea harengus*, e sua caracterização, as análises indicaram que o óleo extraído dos resíduos possui maior potencial que o óleo extraído do filé na geração de ácidos graxos livres.

Apesar da conversão a ácidos graxos ter levado à diminuição dos teores de elementos químicos de importância nutricional, por outro lado, permitiu a geração de amostras que possuem potencial para serem fracionadas por resfriamento. Isso foi demonstrado pelo comportamento das curvas de DSC.

Espera-se assim, uma fração rica em ácidos como mirístico, palmítico, oléico, erúcido, e gadoleico (de interesse para a indústria de biodiesel); e uma fração de interesse nutracêutico, rica em ácidos poli-insaturados como DHA e EPA.

5.5 Referências

- ANTONIOSI-FILHO, N. R. **Análise de óleos e gorduras vegetais utilizando métodos cromatográficos de alta resolução e métodos computacionais**. 1995. 339 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Carlos, São Carlos, SP, 1995.
- GALLO, L. A. **Lipídeos**. Disponível em: <<http://docentes.esalq.usp.br/luagallos/lipideos.html>>. Acesso em: 27 jun. 2015.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid Preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practice**, v. 22, n. 4, p. 475–476, 1973.
- INSUMOS. Lipídios : Hidrogenação, Interesterificação e Fracionamento. **Revista Aditivos e Ingredientes**, p. 41–51, 2015. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/86.pdf>. Acesso em: 27 jun. 2015.
- KNOTHE, G.; DUNN, R. O. A Comprehensive Evaluation of the Melting Points of Fatty Acids and Esters Determined by Differential Scanning Calorimetry. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 86, p. 843–856, 2009.
- MENEZES, R. S. **Estudo do potencial de microalgas dulcícolas como matéria-prima para a cadeia de produção de biodiesel**. 2015. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO, 2015.
- MPA. **Primeiro Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. Disponível em: <http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2015.
- RATNAYAKE, W. M. N. et al. Preparation of omega-3 PUFA concentrates from fish oils via urea complexation. **Fat Science Technology**, v. 90, n. 10, p. 381–386, 1988. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/lipi.19880901002>>. Acesso em: 27 out. 2016.
- SHAHIDI, F.; WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; WANASUNDARA, U. N. **Seal blubber oil: a novel source of ω 3 fatty acids**. *Journal of Food Lipids*, v. 3, n. 4, p. 293–306, 1996.
- SOUZA, S. M. G. DE. Review: Essential fatty acids: importance of fish oils and aquaculture. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 189–196, 2010. Disponível em: <<http://www.ital.sp.gov.br/bj/artigos/html/busca/PDF/v13n3422a.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2016.

6. CAPÍTULO 6

UMA NOVA ESTRATÉGIA DE CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3 EM ÓLEO DE RESÍDUOS DE PEIXE: HIDRÓLISE QUÍMICA E CRISTALIZAÇÃO EM DUAS ETAPAS NA AUSÊNCIA DE SOLVENTES

Ingyrd Cristina de Oliveira, Nelson Roberto Antoniosi Filho

Laboratório de Métodos de Extração e Separação. Instituto de Química,
Universidade Federal de Goiás, Campus II, Samambaia, CEP.: 74690-900, Goiânia,
Goiás, Brasil.

nelson@quimica.ufg.br

ingryd.oliveira.br@gmail.com

RESUMO

A concentração de ácidos graxos poli-insaturados para obtenção de concentrados ômega-3 têm sido alvo de interesse da indústria farmacêutica. Diversas técnicas têm sido desenvolvidas com o objetivo de aliar a maior concentração de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e a maior recuperação final. Este estudo propõe como técnica de concentração de PUFA, a hidrólise química do óleo proveniente de resíduos de peixe *Clupea harengus*, e posterior separação por cristalização à baixas temperaturas com ausência de solventes. Para isso, foram feitos dois experimentos, um a cerca de cinco temperaturas de cristalização (0 °C, -5 °C, -10 °C, -15 °C, e -20 °C); e outro experimento consistindo em uma cristalização feita em duas etapas (10°C e -10 °C). Sobre o primeiro experimento, não houve diferenças significativas das frações líquidas obtidas pelos tratamentos de cristalização em relação à amostra inicial de ácidos graxos, obtida a partir óleo de resíduos de peixe (*Clupea harengus*). A maior porcentagem de recuperação foi alcançada na temperatura de -10 °C (67%). O segundo experimento, apresentou na fração líquida final L-10, 83,4% de ácidos graxos insaturados; 16,2% de ω 3-PUFA; e 11,8 % da somatória EPA+DHA. O rendimento global foi de (54 - 60%). Assim, o tratamento em duas etapas (10 °C e -10 °C) foi eficiente na concentração do total de insaturados (acréscimo de 15,2%); monoinsaturados (acréscimo de 23,8%); e di-insaturados (acréscimo de 34,8%). Houve a diminuição nos teores totais de saturados (decréscimo de 39,9%); mas também de tri-insaturados (decréscimo de 11,7%); poli-insaturados ômega-3 (decréscimo de 11,1%); e somatório de EPA+DHA (decréscimo de 9,5%). Apesar de ser uma estratégia incipiente, com o desenvolvimento, pode chegar a tornar-se uma técnica de concentração eficiente de PUFA e de consciência ambiental por fazer uso de um passivo ambiental.

Palavras-chave: Separação de ácidos graxos; Saturados e insaturados; Cristalização à baixas temperaturas; Óleo de peixe; Resíduos de pescado.

6.1 Introdução

Em seu processamento industrial, a filetagem descarta resíduos como: cabeças, rabos, barbatanas, espinhas, pele, e resíduos (AIDOS, 2001; MOHANARANGAN, 2012). Sendo conhecido que o beneficiamento das indústrias pesqueiras gera resíduos de mais de 70% em peso do total capturado, após a filetagem (BENITES; SOUZA-SOARES, 2010; SHAHIDI, FERREDOON., 2007).

Óleos de peixe, principalmente marinhos, tais como sardinha, atum, anchova, salmão, e arenque (MPA, 2014) são considerados a maior fonte comercial de ácidos graxos ômega-3 (CREXI, VALÉRIA TERRA *et al.*, 2010). Portanto, a utilização dos resíduos pesqueiros na produção de suplementos alimentares concentrados de ômega-3 é uma boa alternativa para o aproveitamento desse passivo ambiental (LÚCIA *et al.*, 2015); evitando o prejuízo da sanidade dos solos, saúde pública, e de recursos hídricos (PILOTTO, 2014).

Um peixe marinho comum, abundante, e subaproveitado é o arenque (*Clupea harengus*) (EDF, 2016; LAPLANTE; SOUCHET; BRYL, 2009). O *Clupea harengus* é a quarta espécie de peixe com maior representatividade mundial de captura, sendo equivalente a 1.849.969 toneladas capturadas (FAO, 2014a).

Existem numerosas técnicas de concentração de ácidos graxos ômega-3, tais como: a cromatografia (CHAKRABORTY; JOSEPH; JOSEPH, 2016; CHAKRABORTY; RAJ, 2007); a extração com fluído supercrítico (FIORI; MANFRINI; CASTELLO, 2014; HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014; RUBIO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2008, 2010, 2012); a hidrólise enzimática (BARBOSA *et al.*, 2013; MOHAMMADI *et al.*, 2014; MOHANARANGAN, 2012; PADILHA, M. E. D. S.; AUGUSTO-RUIZ, 2007; SCHMITT-ROZIERES; DEYRIS; COMEAU, 2000; VALVERDE *et al.*, 2013; WANASUNDARA, UDAYA N.; SHAHIDI, 1998); a complexação com uréia em meio etanólico (CREXI, VALÉRIA T. *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2006; PAIM *et al.*, 2012; SUNG; LEE, 2006; WANASUNDARA; PETERSON, 2011; WANASUNDARA, UDAYA N.; SHAHIDI, 1999).

Além dessas, existem a cristalização à baixas temperaturas com o uso de solventes (BROWN; KOLB, 1955a, b; MORALES-MEDINA *et al.*, 2016; MU *et al.*, 2016; WANASUNDARA, UDAYA N., 1996; WANASUNDARA, UDAYA N.; WANASUNDARA; SHAHIDI, 2005); a cristalização à baixas temperaturas ou

fracionamento na ausência de solventes (Dry Fractionation, aqui chamado de cristalização na ausência de solventes) (SOLEIMANIAN; SAHARI; BARZEGAR, 2015); e a associação entre técnicas (AARTHY *et al.*, 2016; CHAKRABORTY; PAULRAJ, 2008; GÁMEZ-MEZA *et al.*, 2003; LINDER; FANNI; PARMENTIER, 2005; PADILHA, M. E. S.; AUGUSTO-RUIZ, 2010; PATIL; NAG, 2011; XU *et al.*, 2000).

De todas essas técnicas, a complexação com uréia em meio etanólico é a mais utilizada. Ela possibilita uma melhor separação entre as espécies químicas espacialmente lineares, como os ácidos graxos livres saturados; de espécies químicas espacialmente não lineares, como os ácidos graxos insaturados, especialmente os poli-insaturados.

A desvantagem dessa metodologia é a formação do altamente carcinogênico carbamato de etila, o qual é reconhecidamente formado na reação entre uréia e etanol (CANAS; YURAWECZ, 1999). Assim, o uso de tal técnica pode levar a formação de frações de ácidos com a presença de um agente reconhecidamente carcinogênico, o que é inaceitável na produção de suplementos nutracêuticos.

A cristalização à baixas temperaturas é uma técnica usada desde aproximadamente 1940, no fracionamento de óleos (BROWN, 1941), e é indicada para ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) que podem ser oxidados a altas temperaturas, pois opera em condições brandas, evitando a degradação da amostra. Além disso, é um processo ambientalmente amigável, pois não utiliza solventes (SOLEIMANIAN, SAHARI, BARZEGAR, 2015a).

A cristalização na ausência de solventes é feita em duas etapas. Primeiro, faz-se a cristalização por resfriamento, formando duas fases, uma sólida contendo grande parte de ácidos graxos saturados; e uma líquida com conteúdo enriquecido em PUFA. Em seguida, faz-se a separação delas (SHAHIDI, WANASUNDARA, 1998) por filtração ou centrifugação (BIST; TAO; MOHTAR, 2009).

Os problemas associados a essa técnica (que atrapalham a separação do óleo resfriado, em nítidas frações de triacilgliceróis mais saturados, da fração mais insaturada) são: a formação de soluções sólidas (triacilgliceróis cristalizam juntos); e o arrastamento (parte líquida fica retida nas partículas sólidas da mistura de cristalização) (METIN, HARTEL, 2005, WANASUNDARA, WANASUNDARA, SHAHIDI, 2005, INSUMOS, 2015).

Isso acontece, em grande parte, porque os ácidos graxos assumem uma distribuição aleatória nos triacilgliceróis; ou seja, é grande a probabilidade de que as moléculas de triacilgliceróis sejam formadas de ácidos graxos poli-insaturados, juntamente com saturados e/ou monoinsaturados, formando triacilgliceróis de alta similaridade em termos de propriedade físico-químicas (ANTONIOSI-FILHO, 1995). Isso significa que o fracionamento desses triacilgliceróis para isolamento de frações mais insaturadas é de difícil realização.

Na prática, tal situação já foi observada em 1996, por Wanasundara (WANASUNDARA, 1996), que relata que o enriquecimento em ácidos graxos como o EPA e DHA, bem como o rendimento na cristalização com solventes, foram consideravelmente mais elevados sob a forma de ácidos graxos livres do que sob a forma de triacilgliceróis.

Assim, o objetivo desse estudo é a realização do procedimento de hidrólise dos triacilgliceróis de óleo de resíduos de peixe, e consequente conversão em ácidos graxos livres; visando o fracionamento de seus ácidos graxos pelo grau de insaturação, através da técnica de cristalização na ausência de solventes, com a temperatura de cristalização baseada em estudo prévio de resfriamento via calorimetria exploratória diferencial (DSC).

6.2 Parte Experimental

Foram feitas duas investigações iniciais para um possível desenvolvimento do método, uma acerca das temperaturas identificadas nas análises de DSC do item 5.3.5, e uma sobre cristalização em duas etapas.

6.2.1 *Investigação da temperatura de cristalização*

Cinco amostras de ácidos graxos livres provenientes de óleo de resíduos de peixe (FFAR) foram pesadas (7,00 g), em tubos transparentes de vidro de 20 mL de capacidade (os mesmos usados para headspace), e em duplicatas. Cada uma delas foi submetida a uma das seguintes temperaturas de cristalização: 0 °C; -5 °C; -10 °C; -15 °C; e -20°C. Varrendo assim, as proximidades das temperaturas de cristalização/congelamento indicadas pelas análises DSC (CAPÍTULO 5).

Anteriormente à cristalização, os ácidos graxos livres foram aquecidos em banho de água à temperatura de 80 °C, para a quebra da memória de cristalização (FATOUH *et al.*, 2003; LEE; FOGLIA, 2001; ZALIHA *et al.*, 2004). As amostras foram arrefecidas naturalmente até a temperatura ambiente, de aproximadamente 30 °C. Depois, cada amostra de ácidos graxos livres foi resfriada lentamente em banho refrigerado FRIGOMIX®B, com controlador de temperatura THERMOMIX® (B. Braun Biotech International) à taxa de 2 °C/20 min, até chegar em 4 °C (Figura 6.1).

Figura 6.1 – Amostras nos frascos de headspace submetidas ao resfriamento.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Nesse momento, foi transferida para um freezer GELBOX[®], para o qual a faixa de trabalho vai de 10 °C a -20 °C, e que oscila a temperatura em ± 2 °C. A temperatura continuou a ser diminuída na taxa de 2 °C a cada 20 min, até chegar na temperatura de interesse. Após a etapa de resfriamento e formação de esferulitos na amostra, a etapa de crescimento dos cristais ocorreu na temperatura de interesse, e no tempo de cristalização de 16 h.

Os tubos de vidro contendo as amostras congeladas foram centrifugados em centrífuga CELM[®] LS-3 Plus por 2 min a 3200 RPM (SOLEIMANIAN; SAHARI; BARZEGAR, 2015). A fração líquida, superior, foi pipetada para outro tubo transparente de headspeace com pipeta Eppendorf[®] de volume de 5 mL. A fração líquida foi pesada para cálculo do percentual de recuperação.

6.2.2 *Cristalização em duas etapas*

Outro experimento, foi o resfriamento de 40 g dos FFAR em tubo de falcon de 50 mL, resfriado da temperatura ambiente até 10 °C, na taxa de redução de 2 °C a cada 20 min, tendo permanecido nessa temperatura por 40 h. O início da cristalização pode ser visto na Figura 6.2.

Figura 6.1 – Início da cristalização, formação de cristais.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 3200 RPM por 2 min, sendo coletada a fração líquida superior. A fração sólida inferior passou a ser designada de S+10. A separação das frações pode ser vista na Figura 6.3.

Figura 6.3 – Separação entre a fração líquida, e a fração contendo cristais, após centrifugação.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Tal fração líquida superior coletada a 10 °C passou pela etapa de quebra de memória de cristalização, via aquecimento até 80 °C. Depois de arrefecida à temperatura ambiente, foi resfriada até -10 °C na taxa de redução de 2°C/20 min, tendo permanecido nessa temperatura por 16 h. Logo após a amostra foi centrifugada, e coletada a fração líquida superior, chamada de L-10. A fração inferior dessa etapa, que permaneceu sólida à -10 °C, foi chamada de S-10.

As análises das frações líquidas foram feitas através de cromatografia gasosa de alta resolução com detector de ionização por chama (HRGC-FID), de acordo com o procedimento cromatográfico descrito no CAPÍTULO 3. Os dados foram analisados em software Excel 2013 da Microsoft®.

6.3 Resultados

6.3.1 Investigação da temperatura de cristalização

Os resultados dos cinco tratamentos de resfriamento dos ácidos graxos livres obtidos a partir do óleo de resíduos de peixe (FFAR) podem ser vistos na Tabela 6.1. Os resultados se referem à amostra FFAR, e às frações líquidas obtidas por resfriamento da amostra FFAR em diferentes temperaturas.

Tabela 6.1 – Teores de ácidos graxos livres após a hidrólise (FFAR) e após cada tratamento de resfriamento/cristalização.

Respostas	Teores (%) de tipos de ácidos graxos nas amostras iniciais e nas frações líquidas obtidas em função da temperatura de cristalização/congelamento					
	FFAR	0 °C	-5 °C	-10 °C	-15 °C	-20 °C
Saturados	27,6 ± 1,6	26,6 ± 0,9	29,0 ± 1,2	27,6 ± 1,7	28,6 ± 2,2	27,0 ± 1,7
Insaturados	72,4 ± 1,7	73,4 ± 0,9	71,0 ± 1,2	72,4 ± 1,7	71,4 ± 2,2	73,0 ± 1,7
Monoinsaturados	51,8 ± 1,1	52,4 ± 0,7	50,8 ± 0,9	51,7 ± 1,3	50,8 ± 1,5	52,2 ± 1,1
Di-insaturados	2,0 ± 0,0	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,1 ± 0,0	2,0 ± 0,1
Tri-insaturados	1,1 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,0	1,2 ± 0,1
Poli-insaturados	20,7 ± 0,5 ^a	17,7 ± 0,4 ^b	16,9 ± 0,3 ^b	17,5 ± 0,5 ^b	17,4 ± 0,7 ^b	17,6 ± 0,6 ^b
ω3-PUFA	18,2 ± 0,5	18,4 ± 0,4	17,6 ± 0,3	18,2 ± 0,5	18,1 ± 0,7	18,3 ± 0,6
ΣEPA+DHA	13,0 ± 0,5	13,1 ± 0,4	12,3 ± 0,3	12,9 ± 0,5	12,8 ± 0,7	13,0 ± 0,5

Fonte: Elaborada pela Autora.

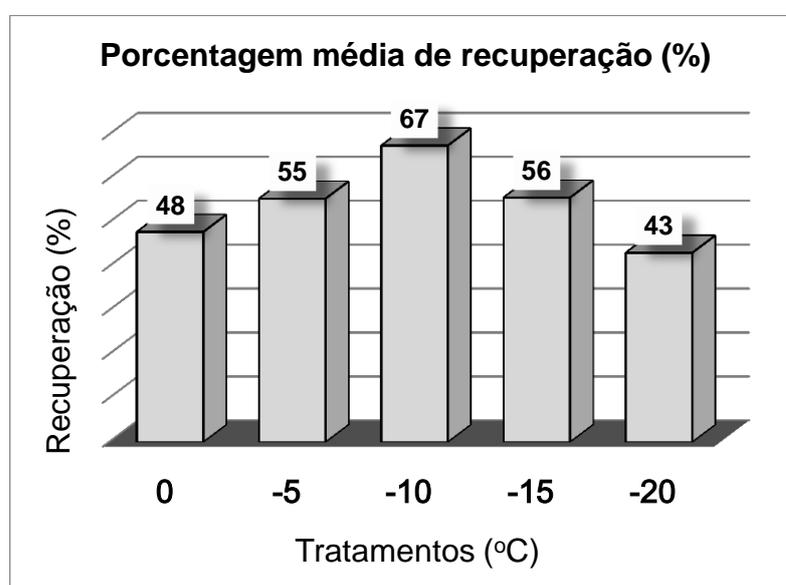
Nota: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p=0,05$). Nas linhas onde não aparecem letras sobrescritas, não existem diferenças significativas entre as amostras. Foram feitas três análises por HRGC-FID de cada amostra.

De acordo com a Tabela 6.1, exceto os teores totais de ácidos graxos poli-insaturados, os demais teores de ácidos graxos, não obtiveram diferenças significativas de acordo com o teste de Tukey. Ou seja, não houve diferenças significativas entre a amostra inicial de FFAR e as amostras líquidas obtidas em

cada tratamento de cristalização. Assim, a cristalização utilizando banho refrigerado e freezer, com a separação feita por centrifugação, não foi eficiente na concentração de ω 3-PUFA ou Σ (EPA+DHA), e ainda houve diminuição no teor total de PUFA.

A Figura 6.4 é relativa à recuperação mássica da fração líquida em relação à totalidade em massa de amostra inicial de FFAR. O melhor percentual de recuperação foi obtido à -10 °C, e os piores a 0 °C e -20 °C.

Figura 6.4 – Gráfico da porcentagem média de recuperação mássica da fração líquida.



Fonte: Elaborada pela Autora.

6.3.2 Cristalização em duas etapas

O resultado do tratamento de cristalização em duas etapas (10 °C e -10 °C) é mostrado na Tabela 6.2, a qual apresenta a composição de ácidos graxos para a amostra inicial FFAR e para as frações S+10, S-10, e L-10. A cristalização em duas etapas causou mudanças significativas no teor percentual de todos os ácidos graxos, ao comparar a amostra inicial com as frações obtidas pelo resfriamento/cristalização.

Tabela 6.2 – Composição em ácidos graxos dos ácidos graxos livres de resíduos de peixe (FFAR), e das frações obtidas para a cristalização em duas etapas.

Ácidos graxos		Teor percentual em ácidos graxos (%)			
Simbologia	Notação	FFAR	S+10	S-10	L-10
C14:0	M	10,29 ± 0,88 ^a	9,84 ± 0,26 ^a	10,01 ± 0,33 ^a	8,37 ± 0,22 ^b
12-Me-C13:0	IM	0,36 ± 0,03 ^a	0,34 ± 0,01 ^{ab}	0,38 ± 0,01 ^a	0,38 ± 0,00 ^a
C15:0	Pt	0,55 ± 0,04 ^b	0,63 ± 0,01 ^a	0,63 ± 0,02 ^a	0,44 ± 0,01 ^c
C16:0	P	14,88 ± 0,72 ^b	17,21 ± 0,45 ^a	13,58 ± 0,40 ^c	6,44 ± 0,23 ^d
C16:1(9) ω7	Po	6,34 ± 0,33 ^a	5,62 ± 0,11 ^{ab}	5,69 ± 0,19 ^{ab}	6,15 ± 0,15 ^a
C16:1	Hx	0,35 ± 0,01 ^b	0,41 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,00 ^a	0,37 ± 0,00 ^b
C16:2	Hd	0,49 ± 0,01 ^c	0,73 ± 0,03 ^b	0,91 ± 0,04 ^a	0,94 ± 0,03 ^a
C17:0	Mg	0,44 ± 0,05 ^a	0,24 ± 0,07 ^b	0,25 ± 0,06 ^b	0,15 ± 0,07 ^b
C16:4 (6,9,12,15) ω3	Ht	0,66 ± 0,04 ^a	0,37 ± 0,05 ^b	0,37 ± 0,05 ^b	0,39 ± 0,01 ^b
C18:0	S	1,05 ± 0,02 ^b	1,53 ± 0,02 ^a	1,54 ± 0,02 ^a	0,80 ± 0,01 ^c
C18:1 (9) ω9	O	10,51 ± 0,08 ^b	10,67 ± 0,19 ^b	10,97 ± 0,22 ^b	12,49 ± 0,24 ^a
C18:1 (11) ω7	V	1,53 ± 0,03 ^a	1,13 ± 0,03 ^b	1,14 ± 0,03 ^b	1,51 ± 0,01 ^a
C18:1(13)	Oc	0,49 ± 0,03 ^a	0,38 ± 0,02 ^b	0,43 ± 0,02 ^b	0,49 ± 0,00 ^a
C18:2(9,12) ω6	L	1,50 ± 0,03 ^b	1,35 ± 0,03 ^c	1,47 ± 0,01 ^b	1,74 ± 0,05 ^a
C18:3 (9,12,15) ω3	Ln	1,12 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,03 ^c	0,80 ± 0,07 ^c	0,99 ± 0,03 ^b
18:4(6,9,12,15) ω3	SDA	2,86 ± 0,01 ^a	1,73 ± 0,06 ^d	1,89 ± 0,05 ^c	2,25 ± 0,02 ^b
C20:1(9) ω11	Ga	12,81 ± 0,49 ^c	14,13 ± 0,22 ^b	14,59 ± 0,22 ^b	16,20 ± 0,14 ^a
20:4 (5,8,11,14) ω6	AA	0,49 ± 0,02 ^a	0,33 ± 0,01 ^b	0,31 ± 0,01 ^b	0,49 ± 0,01 ^a
20:5 (5,8,11,14,17) ω3	EPA	6,17 ± 0,18 ^a	3,82 ± 0,08 ^d	4,30 ± 0,08 ^c	5,17 ± 0,03 ^b
22:1 (13) ω9	Er	19,73 ± 1,02 ^c	23,38 ± 0,79 ^b	23,87 ± 0,62 ^b	26,87 ± 0,88 ^a
22:5 (7,10,13,16,19) ω3	DPA	0,54 ± 0,03 ^b	0,39 ± 0,02 ^c	0,72 ± 0,02 ^a	0,77 ± 0,01 ^a
22:6 (4,7,10,13,16,19) ω3	DHA	6,84 ± 0,34 ^a	4,98 ± 0,30 ^c	5,75 ± 0,16 ^b	6,61 ± 0,13 ^a
Classe de ácidos graxos		Teor percentual em ácidos graxos (%)			
SFA		27,57 ± 1,65 ^a	29,78 ± 0,43 ^a	26,39 ± 0,53 ^{ab}	16,57 ± 0,38 ^c
UFA		72,43 ± 1,65 ^b	70,22 ± 0,43 ^{bc}	73,61 ± 0,53 ^b	83,43 ± 0,38 ^a
MUFA		51,76 ± 1,14 ^c	55,73 ± 0,71 ^b	57,09 ± 1,17 ^b	64,08 ± 0,62 ^a
DUFA		1,99 ± 0,04 ^c	2,07 ± 0,04 ^c	2,38 ± 0,04 ^b	2,68 ± 0,07 ^a
TUFA		1,12 ± 0,00 ^a	0,80 ± 0,03 ^c	0,83 ± 0,07 ^c	0,99 ± 0,03 ^b
PUFA		20,67 ± 0,51 ^a	14,51 ± 0,12 ^d	16,62 ± 0,12 ^c	19,35 ± 0,16 ^b
ω3-PUFA		18,19 ± 0,50 ^a	12,11 ± 0,15 ^d	13,92 ± 0,10 ^c	16,17 ± 0,14 ^b
ΣEPA+DHA		13,01 ± 0,51 ^a	8,82 ± 0,28 ^d	10,07 ± 0,23 ^c	11,78 ± 0,14 ^b

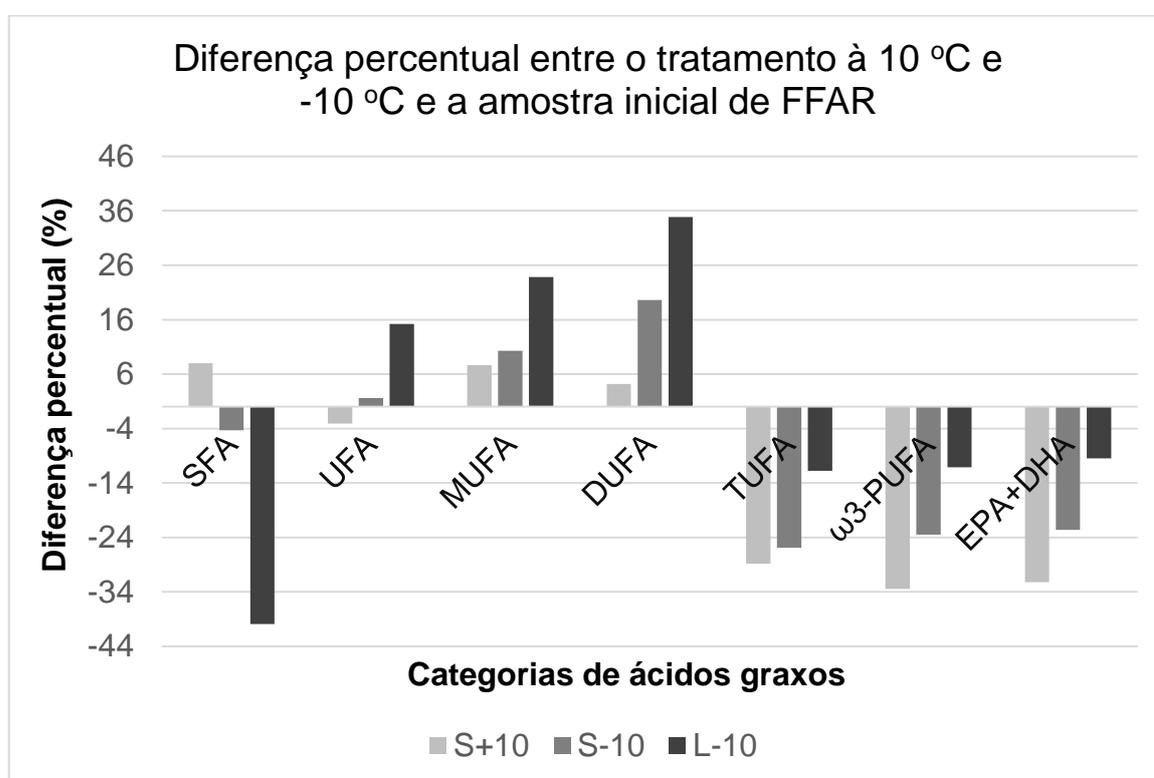
Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: Diferentes letras sobrescritas na mesma linha mostram que os valores são significativamente diferentes pelo teste de comparação de médias Tukey ($p = 0,05$). Foram feitas três análises de cada amostra por HRGC-FID.

Pode-se observar que o tratamento causou a diminuição dos ácidos graxos saturados, de 27,57% (FFAR) para 16,57% (L-10). Entretanto, a elevação do teor de ácidos graxos insaturados de 72,43% para 83,43% foi causada pelo acréscimo em MUFA e DUFA, e não pelo acréscimo em PUFA, ω 3-PUFA, ou no somatório de EPA e DHA.

Na Figura 6.5, pode-se observar que o tratamento em duas etapas (a 10 °C e a -10 °C) foi eficiente na concentração do total de ácidos graxos insaturados (acrécimo de 15,19%); monoinsaturados (acrécimo de 23,80%); e di-insaturados (acrécimo de 34,67%). Houve a diminuição nos teores totais de saturados (decrécimo de 39,90%); mas também de tri-insaturados (decrécimo de 11,61%); poli-insaturados ômega-3 (decrécimo de 11,11%); e somatório de EPA+DHA (decrécimo de 9,45%).

Figura 6.5 – Gráfico comparativo entre a amostra de ácidos graxos livres a partir de óleo de resíduos de peixe, e as frações resultantes do fracionamento após cristalização em diferentes temperaturas.



Fonte: Elaborada pela Autora.

Na fração L-10, obteve-se 83,43% de ácidos graxos insaturados; 16,17% de ω 3-PUFA; e 11,78% da somatória EPA+DHA. O rendimento global foi de 54 a 60%. Isso indicou a necessidade de um planejamento posterior, e utilização de equipamentos de centrifugação com resfriamento para a otimização, e melhor exploração das variáveis envolvidas na técnica de concentração de poli-insaturados por cristalização à baixas temperaturas.

Comparando aos dados da literatura, a Tabela 6.3 contém alguns trabalhos importantes. Nela constam: a descrição do ser marinho utilizado como matéria-prima; a técnica de concentração; os acréscimos percentuais de PUFA ω -3, e de somatório das quantidades de EPA e DHA; e o percentual de recuperação da fração insaturada.

Por exemplo, através da complexação com uréia (razão uréia/ácidos graxos de 2,63/1, temperatura de cristalização de 1 °C, e tempo de 24 h), aliada à posterior destilação da fração não complexada; conseguiu-se um percentual de acréscimo na porcentagem de ω -3 PUFA no óleo de *Clupea harengus* de 413%, e da somatória de EPA+DHA de 468%. Totalizando no óleo, ao final da complexação, 55,7% de EPA+DHA, e 74,4% de ω -3 PUFA (RATNAYAKE *et al.*, 1988). O rendimento global foi de 17 - 20%.

Dessa forma, apesar da possibilidade de formação do altamente tóxico carbamato de etila, e do rendimento ser baixo; a complexação com uréia proporcionou melhores fracionamentos de ácidos graxos, quando comparado com a cristalização por resfriamento na ausência de solventes.

Assim, comparando os resultados, a separação obtida no presente estudo ainda é incipiente, não superando os feitos da literatura. Mesmo assim, apontam um novo caminho que poderá ser desenvolvido via otimização, e melhor controle das variáveis, e talvez alcançar fracionamentos eficazes de ácidos graxos ômega-3.

Tabela 6.3 – Resultados da concentração de ω 3-PUFA encontrados na literatura, expressos em acréscimos percentuais de ω 3-PUFA e de somatório das quantidades de EPA e DHA, e o percentual de recuperação da fração insaturada.

Ano	Referência	Ser marinho	Técnica	Acréscimo (%)		R (%)
				ω 3-PUFA	Σ EPA+DHA	
2016	(THAMMAPAT; SIRIAMORNUN; RAVIYAN, 2016)	Peixe-gato da Ásia (<i>Pangasius bocourti</i>)	U	331	361	26
2015	(SOLEIMANIAN; SAHARI; BARZEGAR, 2015)	Peixe-lanterna (<i>Benthosema pterotum</i>)	C	55	71	51,5
2014	(HOMAYOONI; SAHARI; BARZEGAR, 2014)	Sardinha arco-íris (<i>Dussumieria acuta</i>)	CS	32	32	NR
			U	48	49	NR
2012	(PAIM <i>et al.</i> , 2012)	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	U	15	290	65
2012	(CREXI, VALÉRIA T. <i>et al.</i> , 2012)	Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)	U	54	85	NR
2010	(TALAB <i>et al.</i> , 2010)	Carpa prateada (<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>)	U	229	239	NR
2009	(CUNHA <i>et al.</i> , 2009)	Óleo branqueado de pescado (Indústria de farinha)	W	6	6	NR
2007	(MENDES; DA SILVA; REIS, 2007)	Microalga (<i>Cryptocodinium cohnii</i>)	W e U	204	204	32,5
2006	(LIU <i>et al.</i> , 2006)	Atum (<i>Thunnus albacares</i>)	U	NR	~ 156	25,1
1999	(WANASUNDARA, UDAYA N.; SHAHIDI, 1999)	Gordura de foca (<i>Phoca groenlandica</i>)	U	339	NR	24,5
1988	(RATNAYAKE <i>et al.</i> , 1988)	Arenque (<i>Clupea harengus</i>)	U e D	413	468	17-20
1996	(WANASUNDARA, UDAYA N., 1996)	Gordura de foca (<i>Phoca groenlandica</i>)	CS	232	~ 257	24,8

Fonte: Elaborada pela Autora.

Nota: C= Cristalização à baixas temperaturas na ausência de solventes; CS= Cristalização à baixas temperaturas com uso de solventes; D= Destilação; NR= Não é relatado no estudo; R= Recuperação; W= Winterização; U= Complexação com uréia.

6.4 Conclusão

Dentre as temperaturas investigadas nesse estudo (0 °C; -5 °C; -10 °C; -15 °C; e -20 °C), não houve diferenças significativas das frações líquidas obtidas pelos tratamentos de cristalização em relação à amostra inicial de ácidos graxos obtida a partir óleo de resíduos de peixe (*Clupea harengus*). A maior porcentagem de recuperação foi alcançada na temperatura de -10 °C (67%).

O tratamento em duas etapas (+10 °C e -10 °C) apresentou na fração líquida final L-10: 83,43% de ácidos graxos insaturados; 16,17% de ω 3-PUFA; e 11,78% da somatória EPA+DHA. O rendimento global foi de 54 - 60%.

Assim, o tratamento em duas etapas (10 °C e -10 °C) foi eficiente na concentração do total de insaturados (acrécimo de 15,19%); monoinsaturados (acrécimo de 23,80%); e di-insaturados (acrécimo de 34,67%).

Apesar da diminuição nos teores totais de saturados (decrécimo de 39,90%), também houve a diminuição de tri-insaturados (decrécimo de 11,61%); poli-insaturados ômega-3 (decrécimo de 11,11%); e somatório de EPA+DHA (decrécimo de 9,45%).

Indicou-se assim, a necessidade de um planejamento posterior, e a utilização de equipamentos mais sofisticados, no intuito de obter a otimização das variáveis envolvidas na técnica de cristalização à baixas temperaturas, e a separação entre concentrados poli-insaturados ômega-3 dos ácidos graxos saturados.

6.5 Referências

AARTHY, M. et al. A two step process for production of omega 3-polyunsaturated fatty acid concentrates from sardine oil using *Cryptococcus* sp. MTCC 5455 lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 125, p. 25–33, 2016.

AIDOS, I. **Production of high-quality fish oil from Herring Byproducts**. 2001. 201 f. Tese (Doutorado) - Wageningen University, Holanda, 2001. Disponível em: <<http://edepot.wur.nl/121318>>. Acesso em: 27 ago. 2016.

BARBOSA, O. et al. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 8, p. 2433–2462, 12 ago. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm400762h>>. Acesso em: 7 jun. 2016.

BENITES, C. I.; SOUZA-SOARES, L. A. Farinhas de silagem de resíduo de pescado co-secas com farelo de arroz: Uma alternativa viável. **Archivos de Zootecnia**, v. 59, n. 227, p. 447–450, 2010.

BIST, S.; TAO, B. Y.; MOHTAR, S. A. Purdue Research Foundation (Estados Unidos da América). **Method for separating saturated and unsaturated fatty acid esters and use of separated fatty acid esters**. US n. 20090199462 A1, 13 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.google.com/patents/US20050232956%5Cnhttp://www.google.com/patents/US20090199462>>. Acesso em: 24 ago. 2016.

BROWN, J. B. **Low-temperature crystallization of the fatty acids and glycerides**. Symposium on the molecular structure of fats and oils of the division of Biological Chemistry and the Division of Agricultural and Food Chemistry at the 101st Meeting of the American Chemical Society. St. Louis, Missouri: American Chemical Society, 1941. p. 333–354.

BROWN, J. B.; KOLB, D. K. Applications of low temperature crystallization in the separation of the fatty acids and their compounds. **Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids**, v. 3, n. c, p. 57–94, 1955a.

BROWN, J. B.; KOLB, D. K. Low temperature solubilities of fatty acids in selected organic solvents. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 32, p. 357–361, jun. 1955b.

CANAS, B. J.; YURAWECZ, M. P. Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids. **JAOCS**, v. 76, n. 4, 1999.

CHAKRABORTY, K.; JOSEPH, D.; JOSEPH, D. Concentration and stabilization of C20-22 n-3 polyunsaturated fatty acid esters from the oil of *Sardinella longiceps*. **Food Chemistry**, v. 199, p. 828–837, 2016.

CHAKRABORTY, K.; PAULRAJ, R. Enrichment of eicosapentaenoic acid from sardine oil with Δ^5 -olefinic bond specific lipase from *Bacillus licheniformis* MTCC

6824. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1428–1433, 2008.

CHAKRABORTY, K.; RAJ, R. P. Eicosapentaenoic acid enrichment from sardine oil by argentation chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n. 18, p. 7586–7595, 2007.

CREXI, V. T. et al. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: Chemical hydrolysis and urea complexation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 2, p. 329–334, 2012.

CREXI, V. T. et al. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. **Food Chemistry**, v. 119, n. 3, p. 945–950, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.07.050>>. Acesso em: 2 out. 2016.

CUNHA, D. C. et al. Winterization of fish oil with solvent. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 207–213, 2009.

EDF. Herring. Seafood Selector. Disponível em: <<http://seafood.edf.org/herring>>. Acesso em: 2 out. 2016.

FATOUH, A. E. et al. Chemical and thermal characteristics of buffalo butter oil fractions obtained by multi-step dry fractionation. **Lebensm.-Wiss. u.-Technol.**, v. 36, n. 1, p. 483–496, 2003.

FIORI, L.; MANFRINI, M.; CASTELLO, D. Supercritical CO₂ fractionation of omega-3 lipids from fish by-products: Plant and process design, modeling, economic feasibility. **Food and Bioproducts Processing**, v. 92, n. 2, p. 120–132, 2014.

GÁMEZ-MEZA, N. et al. Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. **Food Research International**, v. 36, n. 7, p. 721–727, 2003.

HOMAYOONI, B.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M. Concentrations of omega-3 fatty acids from rainbow sardine fish oil by various methods. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 2, p. 743–748, 2014.

LAPLANTE, S.; SOUCHET, N.; BRYL, P. Comparison of low-temperature processes for oil and coenzyme Q10 extraction from mackerel and herring. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 2, p. 135–141, 2009.

LEE, K.-T.; FOGLIA, T. A. Fractionation of menhaden oil and partially hydrogenated menhaden oil: Characterization of triacylglycerol fractions. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 78, n. 3, p. 297–304, 2001.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Proteolytic extraction of salmon oil and PUFA concentration by lipases. **Marine Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 70–76, 2005.

LIU, S. et al. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: Optimization of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v. 73, n. 3, p. 203–209, 2006.

LÚCIA, V. et al. Characterization of a hydrolyzed oil obtained from fish waste for nutraceutical application. **Food Science and Technology**, v. 35, n. 2, p. 321–325, 2015.

MENDES, A.; DA SILVA, T. L.; REIS, A. DHA concentration and purification from the marine heterotrophic microalga *Cryptocodinium cohnii* CCMP 316 by winterization and urea complexation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 45, n. 1, p. 38–44, 2007.

MOHAMMADI, M. et al. Improvement of the stability and selectivity of Rhizomucor miehei lipase immobilized on silica nanoparticles: Selective hydrolysis of fish oil using immobilized preparations. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 8, p. 1314–1323, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.05.007>>. Acesso em: 18 jun. 2015.

MOHANARANGAN, A. B. **Extraction of omega-3 fatty acids from atlantic herring (*Clupea harengus*)**. 2012. 187 f. Dissertação (Master of Applied Science) - Department of Process Engineering and Applied Science, Dalhousie University, Nova Scotia, 2012.

MORALES-MEDINA, R. et al. Mass transfer modeling of sardine oil polyunsaturated fatty acid (PUFA) concentration by low temperature crystallization. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 16–23, 2016.

MPA. **Primeiro Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura**. Disponível em: <http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2016.

MU, H. et al. Enrichment of DPA_n-6 and DHA from Schizochytrium sp. Oil by Low-Temperature Solvent Crystallization. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 55, n. 3, p. 737–746, 27 jan. 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.iecr.5b03766>>. Acesso em: 16 out. 2016.

PADILHA, M. E. D. S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Hidrólise enzimática do óleo de pescado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 285–290, 2007.

PADILHA, M. E. S.; AUGUSTO-RUIZ, W. Obtenção de ácidos graxos por cristalização do óleo de pescado fracionado por hidrólise enzimática. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 35–41, 2010.

PAIM, R. M. et al. Concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos a partir de óleo de carpa (*Cyprinus Carpio*) utilizando o método da complexação com uréia. **Vetor**, v. 22, n. 1, p. 18–37, 2012.

PATIL, D.; NAG, A. Production of PUFA concentrates from poultry and fish processing waste. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 4, p. 589–593, 2011.

RATNAYAKE, W. M. N. et al. Preparation of Omega-3 PUFA Concentrates from Fish Oils via Urea Complexation. **Fat Science Technology**, v. 90, n. 10, p. 381–386,

1988. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/lipi.19880901002>>. Acesso em: 3 dez. 2016.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.006>>. Acesso em: 3 dez. 2016.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. **Journal of Food Engineering**, v. 109, n. 2, p. 238–248, 2012.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis*-*Merluccius paradoxus*) by-products: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 2, p. 215–226, 2008.

SCHMITT-ROZIERES, M.; DEYRIS, V.; COMEAU, L.-C. Enrichment of polyunsaturated fatty acids from sardine cannery effluents by enzymatic selective esterification. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 3, p. 329–332, 2000.

SHAHIDI, F. **Maximizing the value of the marine by-products**. First ed. Cambridge, England and Boca Raton, USA: Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC, 2007. Disponível em: <[https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=WcFQAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Rustad,+T.,+2007.+Physical+and+Chemical+Properties+of+Protein+Seafood+by-products.+CRC+Press,+Boca+Rat%25C3%25B3n+\(USA\)&ots=j11YQiO7vz&sig=1J0JBOMod7zaxInd0biSMed6UU4#v=onepage&q&](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=WcFQAwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA3&dq=Rustad,+T.,+2007.+Physical+and+Chemical+Properties+of+Protein+Seafood+by-products.+CRC+Press,+Boca+Rat%25C3%25B3n+(USA)&ots=j11YQiO7vz&sig=1J0JBOMod7zaxInd0biSMed6UU4#v=onepage&q&)>. Acesso em: 20 out. 2016.

SOLEIMANIAN, Y.; SAHARI, M. A.; BARZEGAR, M. Influence of processing parameters on physicochemical properties of fractionated fish oil at low temperature crystallization. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 1, p. 2–19, 2015. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84922311123&partnerID=tZOtx3y1>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

SUNG, S.-K.; LEE, S. K. Dongbu Hannong Chemical Corporation Ltd (Seoul, Koréia). **Method for preparing unsaturated fatty acids**. EP 1 712 609 A1, 10 abril 2006. Disponível em: <<http://www.google.com.ar/patents/EP1712609A1?hl=pt-BR>>. Acesso em: 2 dez. 2016.

TALAB, H. A. et al. Extraction and purification of omega-3 fatty acids concentrate from Hypophthalmichthys molitrix oil. **Nutrition & Food Science**, v. 40, n. 2, p. 193–203, 2010.

THAMMAPAT, P.; SIRIAMORNUN, S.; RAVIYAN, P. Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) of Asian catfish oil by urea complexation : optimization of reaction conditions. **Songklanakarin J. Sci. Technol.**, v. 38, n. 2, p. 163–170, 2016.

VALVERDE, L. M. et al. Concentration of eicosapentaenoic acid (EPA) by selective alcoholysis catalyzed by lipases. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 9, p. 990–1004, 2013.

WANADSUNDARA, U. N.; PETERSON, R. Pos Pilot Plant Corporation (Saskatchewan, Canadá). **Process for separating saturated and unsaturated fatty acids**. Estados Unidos da América: US 8003813 B2., 23 ago. 2011.

WANASUNDARA, U. N. **Marine oils**: Stabilization, structural characterization e omega-3 fatty acid concentration. 1996. 292 f. Tese de doutorado (Doctor of Philosophy) - Departament of Biochemistry, Memorial University of Newfoundland, Canadá, 1996.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: Optimization of reaction conditions. **Food Chemistry**, v. 65, n. 1, p. 41–49, 1999.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Lipase-assisted concentration of n-3 polyunsaturated fatty acids in acylglycerols from marine oils. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 75, n. 8, p. 945–951, 1998. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11746-998-0271-9>>. Acesso em: 2 dez. 2016

WANASUNDARA, U. N.; WANASUNDARA, P.; SHAHIDI, F. Novel separation techniques for isolation and purification of fatty acids and oil by products. In: FERREDOON, S. **Bailey's industrial oil and fat products**. Sixth ed. Canadá: John Wiley & Sons, Inc, 2005. p. 585–621.

XU, X. et al. Production of structured lipids by lipase-catalyzed interesterification in a flat membrane reactor. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 77, n. 10, p. 1035–1041, 2000.

ZALIHA, O. et al. Crystallization properties of palm oil by dry fractionation. **Food Chemistry**, v. 86, n. 2, p. 245–250, 2004.

CONCLUSÃO GERAL

Os óleos provenientes do filé, e dos resíduos do peixe *Clupea harengus* foram obtidos e caracterizados. Ambos possuem alto teor de ácidos graxos insaturados (OR 71,8%; OF 72,9%) e de poli-insaturados ômega-3 (OR 17,4%; OF 19,6%), o que é extremamente favorável à produção de suplementos alimentares, mas pode dificultar a obtenção de um biodiesel de qualidade a partir do óleo bruto.

Sendo assim, é necessário o fracionamento dos ácidos graxos em duas frações: uma enriquecida em poli-insaturados (suplementos alimentares); e uma em saturados (biodiesel). Entretanto, a disposição aleatória dos ácidos graxos nos triacilgliceróis que compõem o óleo de peixe dificulta a separação física dos ácidos graxos em frações de maior, e menor insaturação.

Diante disso, neste estudo foi proposta a hidrólise química do óleo de resíduos de peixe em ácidos graxos livres. O procedimento de obtenção de ácidos graxos livres foi otimizado através do planejamento fatorial 2³. O índice de acidez se mostrou uma melhor forma de avaliação da geração de ácidos graxos livres do que o rendimento mássico.

A condição ótima encontrada para a maior liberação e obtenção de ácidos graxos livres é aquela em que temperatura é de 90 °C; o catalisador está na concentração de 22 % m/m; e o tempo de reação é de 2 h. Os ácidos graxos livres foram obtidos nessa condição, e caracterizados por análises: físico-químicas; de elementos químicos; cromatográficas; e térmicas.

A hidrólise química do óleo de peixe (resíduos e filé) foi efetiva, uma vez que o índice de acidez dos ácidos graxos livres obtidos a partir do óleo de resíduos foi cerca de 22 vezes o valor do óleo antes da hidrólise; e o índice de acidez dos ácidos graxos livres obtidos a partir do óleo de filé foi cerca de 12 vezes o do óleo de origem. Além disso, o conteúdo de ácidos graxos insaturados e poli-insaturados não foi afetado significativamente após a hidrólise.

As análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) indicaram quatro eventos exotérmicos de congelamento. Por conseguinte, é provável que a primeira temperatura de cristalização presente nas curvas de DSC, seja relativa aos ácidos graxos saturados; as temperaturas intermediárias, relativas aos ácidos graxos

monoinsaturados, di-insaturados, e tri-insaturados; e a última temperatura de cristalização, seja relativa aos ácidos graxos poli-insaturados.

Após a investigação de cinco temperaturas de interesse, foi proposta uma nova estratégia de concentração de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3: a hidrólise do óleo de resíduos de peixe, seguida pela cristalização à baixas temperaturas em duas etapas, sem o uso de solventes.

Esse resfriamento e fracionamento em duas etapas (10 °C e -10 °C) foi eficiente na concentração do total de insaturados (acréscimo de 15,2%), e diminuição nos teores totais de saturados (decréscimo de 39,9%), em relação ao óleo já hidrolisado. Entretanto, houve a diminuição de poli-insaturados ômega-3 (decréscimo de 11,1%). O concentrado obtido L-10 apresentou 83,4% de ácidos graxos insaturados; 16,2% de ω 3-PUFA; e 11,8% da somatória EPA+DHA. O rendimento global foi de 54 a 60%.

Dessa forma, a cristalização lenta dos ácidos graxos livres obtidos a partir do óleo de resíduos de peixe, pode vir a ser uma forma de separação de ácidos graxos pela insaturação, mas ainda é incipiente. As primeiras investigações iniciais confirmam isso. No entanto, necessitam-se de estudos posteriores e a utilização de equipamentos mais sofisticados para melhorar o procedimento de cristalização e separação, e otimizar os resultados da concentração de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 e o rendimento destes concentrados.

Com isso, conclui-se que pela aplicação e melhoramento das estratégias e técnicas empregadas nos estudos que compõe essa dissertação, a produção de suplementos alimentares e biodiesel, a partir de resíduos da indústria pesqueira, pode vir a ser uma realidade futuramente, agregando valor econômico a um passivo ambiental.