



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**FRACIONAMENTO DE ÓLEO DE PEIXE
COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

Ana Paula Antunes Corrêa
Engenheira de Alimentos

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
Orientador

Profa. Dra. Lireny A. Guaraldo Gonçalves
Co-orientadora (DTA-FEA)


PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por **Ana Paula Antunes Corrêa**, aprovada pela Comissão Julgadora em 09 de setembro de 2003.

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Campinas, 09 de setembro de 2003.

Campinas-SP
Agosto de 2003


Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral
Presidente da Banca

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICAMP

C817f Corrêa, Ana Paula Antunes
 Fracionamento de óleo de peixe com dióxido de
 carbono supercrítico / Ana Paula Antunes Corrêa.—
 Campinas, SP: [s.n.], 2003.

 Orientador: Fernando Antonio Cabral
 Co-orientador: Lireny Aparecida Guaraldo Gonçalves
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

 1.Ácidos graxos Omega-3. 2.Extração com fluido
 supercritico. 3.Dióxido de Carbono. 4.Óleo de peixe.
 I.Cabral, Fernando Antonio. II.Gonçalves, Lireny
 Aparecida Guaraldo. III.Universidade Estadual de
 Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.
 IV.Título.

BANCA EXAMINADORA

Tese aprovada em _____ de _____ de 2003.

Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral

(ORIENTADOR – DEA/FEA/UNICAMP)

Prof. Dr^a. Alessandra Lopes de Oliveira

(MEMBRO – USP – Pirassununga/SP)

Prof. Dr Rahoma Sadeg Mohamed

(MEMBRO – FEQ//UNICAMP)

Prof. Dr. Antonio José de Almeida Meirelles

(Membro – DEA/FEA/UNICAMP)

***Dedico a minha dissertação
ao progresso do ensino
e da pesquisa no Brasil.***

CÉU, SOL, SUL, TERRA E COR

J. Moreci Teixeira

*Eu quero andar nas coxilhas
sentindo as flechilhas das ervas do chão
ter os pés roseteados de campo,
ficar mais trigueiro do que sol de verão*

*Fazer versos,
cantar as belezas desta natureza sem
par*

*e mostrar para quem quiser ver
o lugar para viver sem chorar.*

*É o meu Rio Grande do Sul,
Céu, Sol, Sul, Terra e Cor*

*Onde tudo que se planta cresce
e o que mais floresce é o amor.*

*Eu quero me banhar nas fontes
e olhar horizontes com Deus
e sentir que as cantigas nativas
continuam vivas para os filhos meus.*

*Ver os campos florindo e
crianças sorrindo e felizes a cantar,
e mostrar para quem quiser ver
o lugar para viver sem chorar.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo dom da vida e pela minha vinda a Campinas que proporcionou tantas oportunidades de crescimento profissional e pessoal;

À minha família, pelo amor, apoio e confiança, fundamentais para o meu bem estar durante o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Fernando Antonio Cabral, pela sua orientação e constante presença no desenvolvimento deste trabalho e a sua amizade e profissionalismo dos quais pude compartilhar;

À Prof^a. Dr^a. Lireny Aparecida Guaraldo Golçalves, pela disponibilidade, apoio e participação neste trabalho;

Ao Prof. Dr. Renato Grimaldi e a equipe do laboratório de óleos e gorduras, pela colaboração e boa vontade;

Aos colegas do Lasefi pelo coleguismo e ao Ari, pela ajuda e apoio na montagem do equipamento de extração supercrítica;

Ao Thiago Yuzo Matsuo, pela sua dedicação e responsabilidade;

À Alessandra Lopes de Oliveira, pela receptividade e disponibilidade em me ajudar na operação do equipamento experimental;

Aos professores membros da banca examinadora, pelos questionamentos, sugestões e correções pertinentes;

Ao CNPq pelo apoio financeiro através de bolsa de estudos que viabilizou a realização deste projeto de pesquisa;

À FAPESP pelo auxílio a pesquisa, concedendo recursos para a construção do sistema de extração supercrítica;

Aos amigos, Angela, Júnior, Kelly, Nádia e Sorriso por esses anos agradáveis de convívio, com quem pude dividir os meus momentos de alegria e tristeza;

À Delia Tapia, minha colega de mestrado e moradia, pela amizade, carinho e respeito;

À Nirse Ruscheinsky, pela sua amizade, disponibilidade e companheirismo;

Aos amigos, Camila Peixoto, César, Chiquinho, Dudu, Eliane Colla, Eliza Kim , Jack, Léo, Lu (makarena), Maria e Victor Hugo, Olga e Raggi pela amizade e convivência;

Aos amigos do Grupo de Oração Universitário (GOU), em especial ao Pepe, Justo, Sandra, Mario, Lucas e Thaís pela amizade incondicional de irmãos.

Aos colegas de mestrado (2001), pelo coleguismo, pela troca de favores e discussões.

“Não devemos permitir que alguém saia de nossa presença sem se sentir melhor e mais feliz”

Madre Tereza de Calcuta

RESUMO

Os ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (EPA, DHA) são compostos com propriedades terapêuticas no tratamento e prevenção de doenças coronárias, hipertensão, arteriosclerose e artrite, além de serem essenciais para o desenvolvimento e manutenção das funções do sistema nervoso central. Os óleos de peixes de origem marinha são as fontes mais ricas em ômega-3 e por isso têm sido usados com frequência para a obtenção de concentrados destes ácidos graxos. A deficiência de ômega-3 na dieta da população causada pela baixa ingestão destes ácidos graxos, através do consumo de peixes, torna interessante o enriquecimento de alimentos mais populares como a margarina, pães e produtos lácteos com esses ácidos graxos. A extração com fluido supercrítico é um processo de separação relativamente novo que traz vantagens em relação às técnicas convencionais. Para alimentos, o dióxido de carbono tem sido o solvente mais empregado, por ser inerte, relativamente barato e não inflamável e por possuir pressão e temperatura crítica moderadas (304,15 K, 7,38 MPa), evitando problemas de degradação térmica. Neste trabalho, estudou-se o fracionamento com dióxido de carbono supercrítico do óleo de peixe em diferentes condições de temperatura e pressão. Os experimentos foram realizados de 14,7 a 29,4 MPa e de 301,15 a 323,15 K. O procedimento experimental consistiu em promover o contato entre o óleo de peixe aderido à esferas de vidro e o CO₂ supercrítico, em um processo dinâmico, de forma a promover o equilíbrio de fases. O corpo do sistema permanecia imerso dentro de um banho termostatizado. O extrato do óleo de peixe (amostra da fase leve) foi coletado no final do extrator em condições de equilíbrio com a fase pesada e a sua composição em ácidos graxos foi determinada através de cromatografia em fase gasosa. A altas pressões (14,7 a 29,4 MPa), o extrato apresentou pouca diferença na sua composição em ácidos graxos em relação a fase pesada. A 7,8 MPa e 301,15 K um pequeno fracionamento foi obtido para o ácido docosahexaenóico (DHA). O ácido eicosapentaenóico (EPA) foi o ácido

graxo que mostrou maior resistência ao fracionamento em todas as condições estudadas. Logo, neste estudo o dióxido de carbono supercrítico não se mostrou efetivo para o fracionamento do óleo de peixe rico em ácidos graxos polinsaturados. Estas dificuldades podem ser atribuídas à complexidade da composição do óleo de peixe em triacilgliceróis, os quais apresentam-se distribuídos em muitas frações com baixa porcentagem mássica no óleo e por serem formados por ácidos graxos de diferentes tamanhos de moléculas.

Palavras Chaves: Ômega-3, dióxido de carbono supercrítico, fracionamento, óleo de peixe.

ABSTRACT

The omega-3 (EPA and DHA) polyunsaturated fatty acids are compounds with therapeutic properties, that may play an important role in the prevention and treatment of cardiovascular disease, hypertension, atherosclerosis, and arthritis. Furthermore, they are essential for development and maintenance of central nervous system. Because there is a gap between intake of n-3 fatty acids by fish consumption and the recommended amount, it would be useful to enrich ordinary foods as margarine, bread and dairy foods with this fatty acids. The marine fish oils are the richest source of n-3 and it has been used as raw material for preparation of this fatty acid concentrate. Supercritical fluid extraction is a relatively new separation process that may circumvent some of the problems associated with the use of conventional separation techniques. In foods processes, carbon dioxide is the most used solvent, because it is inert, inexpensive and non-flammable and it has moderate critical temperature and pressure (304,15 K, 7,38 MPa), which avoid problems of thermo degradation. In the present work, the fractionation of fish oil with supercritical carbon dioxide at different conditions of temperature and pressure: pressure ranged from 14,7 to 29,4 MPa and temperature ranged from 301,15 to 323,15 K. A known amount of fish oil was mixed with glass spheres and put inside the column extraction. The supercritical carbon dioxide was contacted with the fish oil in a dynamic system and the oil present in the light phase was collected in the end column, which was in equilibrium conditions with the heavy phase. All the experimental body system was immersed in water bath to ensure isothermal conditions. The oil present in the light phase was trapped in a flask and its fatty acids composition was determined by gas phase chromatography. At higher pressures the extract obtained (light phase) showed similar composition in polyunsaturated fatty acids when compared with heavy phase, so no fractionation effect was observed at these conditions. At 7,8 MPa and 301,15 K a modest fractionation was obtained for docosahexaenoic acid (DHA). The eicosapentaenoic

acid (EPA) was the most difficult one to fraction at the studied conditions. So, in the present work, the supercritical carbon dioxide didn't show effective in the fractionation of fish oil rich in polyunsaturated fatty acids. This difficult can be explained by the complex composition of fish oil in triacylglycerols with different chain length fatty acids ligants and by similar molecular mass.

Keywords: Omega-3, supercritical carbon dioxide, fish oil, fractionation

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVO.....	3
2.1	OBJETIVO GERAL	3
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1	ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS – ÔMEGA-3	4
3.1.1	<i>Aspectos Estruturais.....</i>	4
3.1.2	<i>Aspectos nutricionais.....</i>	5
3.1.3	<i>Produtos e Mercado</i>	7
3.1.4	<i>Pesquisas na área da saúde.....</i>	8
3.1.5	<i>Processos de Obtenção</i>	9
3.1.5.1	Métodos Cromatográficos	10
3.1.5.2	Métodos Enzimáticos	10
3.1.5.3	Destilação	11
3.1.5.4	Cristalização a baixas temperaturas	12
3.1.5.5	Extração por fluido supercrítico.....	13
3.2	PROCESSO DE EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO	14
3.2.1	<i>Fluido supercrítico</i>	15
3.2.2	<i>Utilização do CO₂ como fluido supercrítico.....</i>	16
3.2.3	<i>Processos de Extração e Fracionamento com CO₂ supercrítico.....</i>	17
4	MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1	MATÉRIA PRIMA	22
4.1.1	<i>Óleo de Peixe</i>	22
4.1.2	<i>Dióxido de Carbono.....</i>	22
4.2	PRODUTOS QUÍMICOS DIVERSOS.....	22
4.3	SISTEMA EXPERIMENTAL	23
4.4	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	27
4.4.1	<i>Preparo da amostra.....</i>	28
4.4.2	<i>Acondicionamento.....</i>	28
4.4.3	<i>Ajuste de Temperatura e Pressão</i>	29

4.4.4	<i>Estabilização</i>	29
4.4.5	<i>Equilíbrio Dinâmico</i>	29
4.4.6	<i>Extrato</i>	30
4.4.7	<i>Cromatografia Gasosa</i>	30
4.4.7.1	<i>Esterificação</i>	31
4.5	CÁLCULO DA SELETIVIDADE	31
4.6	CÁLCULO DA SOLUBILIDADE	32
4.7	COMPOSIÇÃO EM TRIACILGLICERÓIS.....	34
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1	SOLUBILIDADE DO ÓLEO DE PEIXE EM CO ₂ SUPERCRÍTICO	35
5.2	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE PEIXE.....	38
5.3	FRACIONAMENTO DO ÓLEO DE PEIXE COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	41
5.3.1	<i>Seletividade do CO₂ supercrítico para o óleo de peixe</i>	41
5.4	FRACIONAMENTO DE UMA MISTURA DE ÓLEO DE PEIXE E GORDURA DE BABAÇU COM CO ₂ SUPERCRÍTICO	46
5.4.1	<i>Caracterização da gordura de babaçu</i>	47
5.5	SELETIVIDADE DO CO ₂ SUPERCRÍTICO PARA FRACIONAR UMA MISTURA DE ÓLEO DE PEIXE E GORDURA DE BABAÇU.....	48
5.6	FRACIONAMENTO DO ÓLEO DE PEIXE E DA GORDURA DE BABAÇU A 7,8 MPA E 301,15 K ..50	
5.6.1	<i>Composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis do refinado do óleo de peixe</i> .51	
5.7	SELETIVIDADE DO CO ₂ SUPERCRÍTICO PARA O FRACIONAMENTO DA GORDURA DE BABAÇU	55
6	CONCLUSÕES	56
7	PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
9	ANEXOS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ácido Alfa-Linolênico (C18:3 n-3).....	5
Figura 2. Ácido Eicosapentaenóico, (C20:5 n-3).....	5
Figura 3. Ácido Docosahexaenóico, (C22:6 n-3).....	5
Figura 4. Sistema de extração supercrítica esquematizado.	24
Figura 5. Sistema de extração supercrítica, vista frontal.	25
Figura 6. Sistema de extração supercrítica, vista lateral 1.....	26
Figura 7. Sistema de extração supercrítica, vista lateral 2.....	26
Figura 8. Fluxograma do processo de fracionamento do óleo de peixe com CO ₂ supercrítico	27
Figura 9. Solubilidade de óleo de peixe em função da pressão	36
Figura 10. Solubilidade de óleo de peixe em função da densidade.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingestão Diária Recomendada de Ácido Graxo Polinsaturados:.....	6
Tabela 2. Composição em ácidos graxos de óleos de peixes marinhos % Mássica	7
Tabela 3. Propriedades físicas de alguns fluidos para o uso como fluido supercrítico	17
Tabela 4. Condições adotadas para a composição em ácidos graxos.....	31
Tabela 5. Dados de solubilidade do óleo de peixe	36
Tabela 6. Composição em graxos do óleo de peixe	39
Tabela 7. Composição provável de triacilgliceróis do óleo de peixe.....	40
Tabela 8. Composição do extrato do óleo de peixe (%massa) no equilíbrio.....	42
Tabela 9. Composição do extrato do óleo de peixe (%massa) no equilíbrio.....	42
Tabela 10. Seletividade do CO ₂ supercrítico para o óleo de peixe em termos dos ácidos graxos de sua composição.	43
Tabela 11. Composição em ácidos graxos da gordura de babaçu.....	47
Tabela 12. Composição provável de triacilgliceróis da gordura de babaçu considerando 65% de trissaturados.	48
Tabela 13. Dados de fracionamento para a mistura de óleo de peixe e gordura de babaçu..	49
Tabela 14. Composição em ácidos graxos do refinado do óleo de peixe a 301,15K e 7,8 MPa	51
Tabela 15. Composição em triacilgliceróis do refinado do óleo de peixe % Mássica	53
Tabela 16. Composição do óleo de peixe em mono, di e triinsaturados (%mássica)	54
Tabela 17. Valores de beta para o fracionamento de babaçu puro a 301,15 K e 7,8 MPa	55

1 INTRODUÇÃO

A vida moderna e o ritmo acelerado dos grandes centros urbanos trouxeram prejuízo à qualidade dos hábitos alimentares das pessoas. Este fator somado a diminuição de atividades físicas, resultou no crescimento da taxa de ocorrência de várias doenças crônico-degenerativas. Neste cenário surge e já com muita força os alimentos funcionais.

Dentre os lipídeos alimentares que exercem papéis benéficos ao organismo humano estão os ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, particularmente os da série ômega-3. Estes chamaram a atenção de cientistas nos anos 70 por sua ação benéfica ao sistema cardiovascular. Os ácidos graxos da série ômega-6 mostraram-se extraordinários em tratamentos de acne, pele ressecada, problemas menstruais e algumas infecções inflamatórias.

Em geral, a consciência da população sobre os benefícios dos ácidos graxos polinsaturados é pequena. As pessoas estão consumindo em suas dietas uma quantidade cada vez menor, e o organismo humano não é capaz de sintetizá-los em quantidades significativas. Entretanto, tentativas de adaptar à dieta humana a alimentos ricos nestes ácidos graxos não se têm mostrado efetiva, pois estes alimentos estão entre os menos populares: peixes oleosos de águas frias (como sardinha, salmão e arenque). Dentro deste contexto, surge como alternativa a adição destes compostos a alimentos comuns como o pão, leite e derivados, cereais e suco de laranja, ou ainda através de cápsulas contendo óleo de peixe.

Crescentes restrições à maioria dos solventes usados nos métodos tradicionais de extração de compostos alimentícios e a preocupação dos consumidores com a presença

de resíduos químicos nos alimentos, estimula o desenvolvimento de novos processos alternativos que atendam a essa necessidade.

O grande interesse despertado pela extração com fluido supercrítico (EFSC), deve-se ao seu grande potencial de aplicação em indústrias de alimentos, químicas e farmacêuticas associados ao baixo custo de energia e limpeza do processo.

Os fluidos supercríticos podem ser usados tanto para processos de extração, como na decafeinação de café (Zozel, 1974) e na extração de lúpulo (Lands), quanto para fracionamento, como na deacidificação de óleo de oliva, (Brunetti *et al.*, 1989). Uma das grandes vantagens deste processo é permitir o processamento de matérias-primas a temperaturas não muito elevadas, o que é especialmente adequado quando compostos termossensíveis estão presentes. Outra vantagem de relevância é a possibilidade de fácil recuperação do solvente supercrítico após o processo de extração.

O uso do CO₂ como fluido supercrítico em processos de separação, efetivamente resolve questões associadas com as altas temperaturas e com o uso de solventes orgânicos. Pois possui temperatura crítica (T_c) de 304,19 K e pressão crítica de 7,38 MPa, assim, as temperaturas empregadas podem ser baixas e o solvente (CO₂) pode ser dissipado totalmente por descompressão, com a grande vantagem de ser um componente do ar atmosférico de grande uso na gaseificação de refrigerantes e de outras bebidas.

Seguindo uma tendência em alimentos funcionais, há grande interesse em se obter concentrados de ômega-3, com o intuito de otimizar o emprego destes compostos em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, entre outros. Chama-se a atenção a existência de trabalhos de fracionamento de óleo de peixe na forma de ésteres metílicos e etílicos de ácidos graxos, no entanto raras são as citações a respeito do fracionamento na forma de triacilgliceróis.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Verificar se o dióxido de carbono supercrítico é um bom solvente para o fracionamento de óleo de peixe com alto teor em ácidos graxos polinsaturados.

2.2 Objetivos Específicos

Projeto e construção de uma unidade extratora com fluido supercrítico em escala laboratorial;

Obter dados experimentais de solubilidade e composição do óleo de peixe no equilíbrio de fases com o CO₂ supercrítico;

Verificar a dependência da seletividade do CO₂ supercrítico em função da temperatura e pressão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Ácidos Graxos Polinsaturados – Ômega-3

3.1.1 Aspectos Estruturais

Os ácidos graxos polinsaturados (PUFAs) são ácidos graxos de cadeia longa com duas ou mais duplas ligações. Esses ácidos graxos são classificados de acordo com a posição da primeira dupla ligação, a partir do grupo terminal metil da cadeia de carbonos. Distinguindo-se assim dois diferentes grupos: a série Ômega-6 (n-6), e a série Ômega-3 (n-3), nas quais a primeira dupla ligação é observada respectivamente entre o sexto e o sétimo e o terceiro e o quarto átomo de carbono na cadeia do ácido graxo (Newton & Snyder, 1997).

O ácido linoléico (n-6) e o ácido alfa-linolênico (n-3) são ácidos graxos polinsaturados essenciais (EFAs), pois não podem ser produzidos pelo organismo, logo precisam ser adquiridos através da dieta. A partir destes são sintetizados no organismo outros PUFAs de fundamental importância para o corpo: o ácido araquidônico a partir do ácido linoléico (n-6) e o ácido eicosapentaenóico (EPA) e o ácido docosahexaenóico (DHA) ambos formados a partir do ácido alfa-linolênico (Broadhurst *et al.*, 1998; Hornstra *et al.*, 1995). Embora possam ser produzidos pelo organismo, estudos revelam que apenas 10-15% do ácido alfa-linolênico é convertido em EPA e a síntese de DHA é limitada (Emken *et al.*, 1990; Valsta *et al.*, 1996), sendo insuficiente para suprir as necessidades do organismo.

Os principais ácidos graxos da série n-3 são: o ácido alfa-linolênico (LNA; C18:3 n-3), o ácido eicosapentaenóico (EPA; C20:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico (DHA; C22:6 n-3). Suas formas estruturais são mostradas nas Figuras 1,2,3.

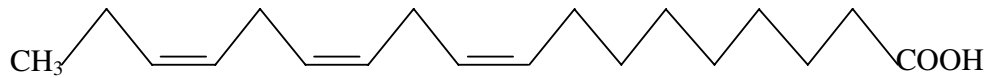


Figura 1. Ácido Alfa-Linolênico (C18:3 n-3)



Figura 2. Ácido Eicosapentaenóico, (C20:5 n-3)

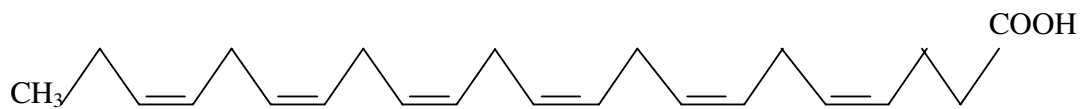


Figura 3. Ácido Docosahexaenóico, (C22:6 n-3)

3.1.2 Aspectos nutricionais

Os hábitos alimentares têm mudado significativamente ao longo dos tempos influenciados pelos estilos de vida. No caso específico das gorduras, observou-se a partir da revolução industrial um aumento significativo das quantidades ingeridas de ácidos graxos saturados e insaturados da família n-6. Ao mesmo tempo observou-se neste período aumento das mortes por doenças cardiovasculares. Parece certo que o incremento de gordura está diretamente relacionado com este fato. Além disso, recentemente tem se observado que o consumo de ácidos graxos polinsaturados tem um efeito cardio protetor.

Segundo a British Nutrition Foundation, a ingestão atual dos ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, do tipo EPA e DHA, está abaixo da quantidade recomendada. O consumo médio é de 0,20g/dia, enquanto o necessário é de 1,25g/dia, logo

há uma deficiência diária em torno de 1,00 grama. A Tabela 1 apresenta a ingestão diária recomendada de ácidos graxos polinsaturados pelos principais órgãos mundiais de saúde.

Tabela 1. Ingestão Diária Recomendada de Ácido Graxo Polinsaturados:

Fonte	Ingestão Diária Recomendada (g)	
	EPA e DHA	Alfa-Linolênico
Bristish Nutrition Foundation Task Force, 1992	1,25	2,4
NHI workshop, bethesda, 1999	0,65	2,22
FAO/WHO Expert committee on Fats and Oils in Human Nutrition, 1994	7% das calorias provenientes de ômega-3	

Fonte. www.roche.com.br/vitaminas/perguntas_5shtm (10/05/2003)

As fontes mais ricas em EPA e DHA são os óleos de peixes marinhos e a carne de peixes oleosos como a cavala, arenque, salmão e sardinha. Esses ácidos graxos são originalmente provenientes de algas marinhas as quais são fontes de alimento para os peixes típicos de águas frias. A alta quantidade de n-3 PUFAs presente nestes peixes é consequência da adaptação destes a águas frias (Trautwein, 2001). A Tabela 2 apresenta a composição em ácidos graxos de óleos de peixes marinhos e de fígado de tubarão e de bacalhau.

Tabela 2. Composição em ácidos graxos de óleos de peixes marinhos % Mássica

Ácido Graxo	Fígado * Tubarão	Fígado Bacalhau	Cavala	Menhaden	Salmão	Sardinha	Anchova
C14:0	4,19	3-5	7-8	6-12	3,3	4-12	0,4-1,3
C14:1	0,46			0,2-0,4			
C15:0	0,76	0,3-0,5		0,4-1,1		0-0,6	
C16:0	19,80	10-14	13-16	14-23	9,8	9-22	16-20
C16:1	7,72	6-12	4-9	7-15	4,8	6-13	8-12
C16:2		0,3-1		1-2			
C16:3		0,2-0,6		1-3			
C16:4				0,5-2			
C17:0	1,46	0,1-1		0,3-1,3		0-1	0,5-2
C18:0	3,80	1-4	2-3	2-4	4,2	2-7	3-7
C18:1	24,84	19-27	13-14	6-16	17,0	7-17	9-14
C18:2	0,62	1-2	1-2	1-2	1,5	1-3	1-3
C18:3		0,2-1	1-2	1-2	1,1	0,4-1	0,3-1,3
C18:4		0,4-2	2-5	1-5	2,8	2-3	
C20:0							
C20:1	7,79	7-15	12	0,5-2	3,9	1-8	2-8
C20:4	2,87	0,4-1		1-4	0,7	1-3	0,3-1
C20:5 n-3;EPA	4,59	8-14	6-8	12-18	13,0	9-35	10-20
C21:5				0,5-1			
C22:0							
C22:1		4-13	14-16	0,2-0,4	3,4	1-8	2-4
C22:5 n-3	1,74	1-3	1	2-4	3,0	1-4	1-2
C22:6 n-3; DHA	18,95	6-17	8-9	4-15	18,2	4-13	4-11
Outros			5-8			1-14	3-10

Fonte: AOCS-Table of Contents,1997

* FontePacheco & Barrera-Arellano, 1994

3.1.3 Produtos e Mercado

Impulsionados pela conscientização das pessoas com sua alimentação, na busca de melhor qualidade de vida, associada a uma expectativa de vida maior que a atual, a tendência da indústria mundial farmacêutica e de alimentos é de investir em alimentos funcionais. Os n-3 conhecidos pelos seus efeitos benéficos, principalmente na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, têm-se destacado entre os produtos lançados no

mercado. Os laticínios enriquecidos com ômega-3 foram os primeiros produtos a chegar ao mercado nacional dentro do conceito de alimentos funcionais, como o leite, iogurtes e requeijão. Atualmente outros produtos estão sendo lançados como algumas margarinas vegetais e ovos.

Através de pesquisas na Internet, utilizando o site de busca Altavista (20/03/2002) encontrou-se mais de 24.000 home pages sobre ácidos graxos n-3. São centenas de diferentes produtos à venda desde o antiquado óleo de fígado de bacalhau, a US\$ 7.19 o frasco com 12 oz (340,2 g) (altavistashopping), até complicadas misturas de ácidos graxos essenciais para “body-building”, com uma mistura de ácidos linoléico e alfa-linolênico a US\$ 23.75 o frasco com 90 cápsulas; há também produtos para cães e até mesmo cavalos utilizando ácidos graxos funcionais.

3.1.4 Pesquisas na área da saúde

Duas linhas de pesquisa têm focado o importante papel dos ácidos graxos polinsaturados n-3 na dieta alimentar. Uma na promoção do desenvolvimento do sistema nervoso central e retina de crianças e outra na prevenção de doenças cardíacas nos adultos (Connor, 1997).

Diferente do sistema muscular esquelético, que é rico em proteínas e minerais, o componente estrutural principal do tecido neuronal dos mamíferos são os lipídeos. O peso seco do cérebro compreende aproximadamente 600g de lipídeos/kg e apresenta um perfil único de ácidos graxos polinsaturados, principalmente em n-3. Assim, para o desenvolvimento e manutenção das funções do sistema nervoso central os ácidos graxos polinsaturados são de vital importância (Broadhurst *et al.*, 1998; Carlson & Neuringer, 1999; Clandinin, 1999; Hornstra *et al.*, 1995; Uauy *et al.*, 1996). No feto, o sistema nervoso e o sistema cardiovascular são as duas regiões de maior importância para o seu crescimento, logo os PUFAs são relevantes para o seu desenvolvimento (Broadhurst *et al.*, 1998).

De uma forma geral, estudos em humanos indicam que o consumo regular de peixes oleosos ou de ácidos graxos polinsaturados do tipo EPA e DHA diminuem o risco de mortes por doenças cardíacas. Este efeito protetor foi constatado através de várias pesquisas feitas com pessoas de diversos países, tanto em homens que já apresentavam doença cardíaca no início do estudo (Burr *et al.*, 1989; Marchioli, 1999; Singh *et al.*, 1997), quanto em homens inicialmente saudáveis (Kromhout *et al.*, 1985; Kromhout *et al.*, 1995; Shekelle *et al.*, 1985). Estudos que investigaram os efeitos destes ácidos sobre os níveis dos lipídeos sanguíneos e das lipoproteínas, consistentemente demonstraram que a sua suplementação à dieta, diminui as concentrações de triacilgliceróis e de VLDL (lipoproteínas de densidade muito baixa) no sangue de maneira dose-dependente (Schmidt *et al.*, 1993). Quanto às concentrações de colesterol total e LDL-colesterol, as pesquisas mostram resultados variáveis. Em geral, doses moderadas dos ácidos graxos polinsaturados n-3 não alteram a concentração total do LDL (lipoproteínas de baixa densidade) e HDL (lipoproteínas de alta densidade) (Harris, 1996). Entretanto, uma pesquisa feita com pessoas vegetarianas, que receberam suplementação com DHA (1,62 g/dia), o nível total de LDL e HDL não se alterou, mas a proporção LDL:HDL e a concentração de triacilgliceróis no sangue diminuíram (Conquer & Holub, 1996). Os ácidos graxos polinsaturados ômega-3, possuem ação benéfica também no tratamento e prevenção da hipertensão, arteriosclerose, arritmia e artrite.

3.1.5 Processos de Obtenção

Vários são os métodos para se obter concentrados de n-3 e entre os mais empregados incluem-se: os métodos cromatográficos (CLAE e resina de prata); destilação molecular ou por fracionamento; os enzimáticos (hidrólise e esterificação); cristalização a baixas temperaturas e extração por fluido supercrítico.

3.1.5.1 Métodos Cromatográficos

Entre os métodos cromatográficos, a cromatografia líquida de alta eficiência e a cromatografia de resina de prata tem sido empregada para se obter concentrados de n-3. Estes métodos possibilitam isolar ésteres de ácidos graxos pelo tamanho da cadeia de carbonos e pelo grau de insaturação, usando adsorventes adequados (Shahidi & wanasundara, 2000).

Adlof & Emken (1985) comprovaram a possibilidade de enriquecer um óleo de peixe comercial com 76,5% de n-3 (concentrado) para 99,8%, usando uma eluição isocrática através da cromatografia usando coluna de resina de prata. Em outro estudo, fracionaram 100 mg de ésteres metílicos de um concentrado de óleo de peixe, contendo 29% de EPA e 20,5% de DHA, com teores crescentes de acetonitrila (0-30%) em metanol. Neste trabalho, obtiveram frações com 87,7% de EPA e 95,4% de DHA. Para um óleo de menhaden (sem estar concentrado) com 12,5% de EPA e 11,1% de DHA, através de uma separação isocrática usando 40% de acetonitrila em acetona, conseguiram uma fração com 69% de EPA e DHA.

3.1.5.2 Métodos Enzimáticos

Neste método são empregadas enzimas (lipases) na hidrólise e esterificação de óleos de peixe para produzir concentrados de n-3, na forma de acilgliceróis.

Os n-3 na forma de triacilgliceróis são nutricionalmente mais favoráveis do que na forma de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos, conforme estudos realizados em animais de laboratórios que apresentaram a absorção intestinal debilitada por ésteres alquílicos (El Boustaini *et al.*, 1987; Lawson & Hughes, 1988; Hamazaki *et al.*, 1982). Sob o ponto de vista de marketing, os ácidos graxos polinsaturados na forma de triacilgliceróis são

muitas vezes promovidos por serem mais natural do que seus ésteres metílicos ou etílicos (Haraldsson & Hoskulsson, 1989).

Osada *et al.* (1992) estudaram o uso das lipases *Chromobacterium viscosum* (C V) e *Cândida cylindracea* (C C) para a esterificação direta em glicerol com ácidos graxos livres individuais, incluindo o EPA e o DHA. Os rendimentos obtidos, para todos os ácidos graxos analisados, foram de 89-95% para a CC lipase e de 71-75% para a CV lipase. Para esta última se obteve um rendimento menor para o DHA, de 63%.

He & Shahidi (1997) estudaram a esterificação enzimática de concentrados de ácidos graxos n-3 do óleo da gordura da baleia usando *Chromobacterium viscosum* lipase. O grau da síntese de reação foi superior a 94% e as quantidades de mono-, di- e triacilglicerol foram respectivamente de 13,8, 43,1 e 37,4%.

Esta técnica assim como os métodos cromatográficos são bastante desejáveis em processos de purificação, visto que a aplicação em grande escala ainda é inviável (Torn-Chern & Yi-Hsu, 2001).

3.1.5.3 Destilação

O método de destilação tem sido usado para a separação parcial de misturas de ésteres de ácidos graxos. Este método baseia-se na diferença do ponto de ebulição e no peso molecular dos ácidos graxos a pressões reduzidas (Bron & Kolb, 1955). Esta é com certeza a técnica mais antiga e requer altas temperaturas de aproximadamente 250°C (Berger & McPherson, 1979).

Expor os ácidos graxos polinsaturados, especialmente os n-3, a temperaturas elevadas durante a destilação, pode induzir a reações de hidrólise, de oxidação térmica, de polimerização e de isomerização. Possivelmente os produtos provenientes da degradação

são ácidos graxos cíclicos e polímeros de alto peso molecular (Ackman, 1988; Wijesundara *et al.*, 1989).

A destilação molecular usa baixas temperaturas e pequenos intervalos de aquecimento, no entanto o fracionamento de ésteres de óleos marinhos é difícil porque a separação desses componentes torna-se menos efetivo com o aumento do peso molecular (Weitkamp, 1995; Brevik, 1992).

Stout *et al.* (1990) citado por Shahidi & Wanasundara (2000) enfatizaram as dificuldades prática de concentrar apenas ômega-3 PUFAs de óleo de peixe na forma natural de triacilglicerol. Para o processo de destilação do óleo de menhaden na forma de triacilgliceróis conseguiram concentrar o EPA inicialmente com 16,0% para apenas 19,5%. Já para a destilação de seus ésteres etílicos foi possível obter 28,4% de EPA. Para o DHA, a efetividade do processo foi maior, na forma de triacilglicerol conseguiram dobrar a concentração inicial de 8,4 para 17,3% e na forma de ésteres de 9,0 para 43,9%.

3.1.5.4 Cristalização a baixas temperaturas

O método de cristalização a baixas temperaturas foi originalmente empregado para separar triacilgliceróis, ácidos graxos, ésteres e outros lipídeos, os quais são altamente solúveis em solventes orgânicos a temperaturas acima de 0°C, mas são parcialmente solúveis em temperaturas abaixo de - 80°C (Brown & Kolb, 1955). A solubilidade das gorduras em solventes orgânicos decresce com o aumento do peso molecular e cresce com o aumento da insaturação (Chawla & deMan, 1990).

Wanasundara & Shadini (1996) estudaram a concentração de PUFAs a partir do óleo de baleia na forma de triacilgliceróis e de ácidos graxos usando solvente de cristalização (acetona e hexano) a diferentes temperaturas. Para a amostra na forma de triacilgliceróis, verificaram que a concentração de n-3 PUFAs na fração não cristalina aumentou com a

diminuição da temperatura de cristalização. E para ambas temperaturas estudadas a acetona apresentou a maior concentração destes triacilgliceróis. Para a forma de ácidos graxos, a 60 e 70°C negativos em hexano, resultou numa concentração total de n-3 PUFA's de 58,3 e 66,7% a partir de 39,0 e 24,8%, respectivamente. Usando acetona obteve um aumento para 56,7 e 46,8% a partir de 15,9 e 12,9%.

3.1.5.5 Extração por fluido supercrítico

Em vista dos métodos citados apresentarem desvantagens como o uso de altas temperaturas (destilação), de solventes orgânicos (cristalização) e a limitação da produção em grande escala (cromatografia e enzimáticos), o fracionamento com CO₂ supercrítico é um método alternativo que apresenta grandes vantagens em relação a estas técnicas.

Os processos de extração supercrítica, e especialmente, os que empregam o CO₂ como solvente, tem se destacado na extração de matérias-primas naturais utilizadas nas indústrias de alimentos e farmacêuticas. Este crescente interesse deve-se as características do CO₂, pois é um solvente não tóxico, não inflamável, barato e facilmente separável dos extratos por simples despressurização. Possui temperatura crítica de 31,1°C e pressão crítica de 7,38 MPa o que permite o processamento de compostos termolábeis com o mínimo de degradação (Palmer & Ting, 1995).

Devido às características citadas, vários estudos de fracionamento de ácidos graxos polinsaturados na forma de ésteres para a obtenção de concentrados de n-3 têm sido realizados.

Apenas modestos enriquecimentos de EPA e DHA foram conseguidos a partir de óleo de peixe na forma de triacilglicerol. A estrutura complexa dos triacilgliceróis com ácidos graxos de diferentes tamanhos de cadeia torna a separação como função de apenas um componente impossível (Riha & Brunner, 1999).

Riha & Brunner (2000) fracionaram ésteres etílicos de óleo de peixe em duas frações: uma rica em compostos de baixa massa molecular (C14 a C18) e outra rica em compostos de alta massa molecular (C20 e C22). Concentrações maiores que 95% foram obtidas para fração rica em C20 e C22, com rendimento também de 95%.

Eisenbach (1984) citado por Riha & Brunner (2000) conseguiu um enriquecimento de 14,5 para 48,2% de EPA a partir de ésteres etílicos de ácidos graxos com CO₂ supercrítico.

A principal desvantagem do processo de extração supercrítica é o alto custo dos equipamentos. Assim produtos de baixo valor agregado e de baixo rendimento não podem ser economicamente extraídos por esse processo (Maul, 1999).

De acordo com o que se expôs, vários métodos podem ser usados para a produção de concentrados de ômega-3 PUFAs. Todos oferecem a possibilidade de enriquecimento em n-3 a partir de óleos de peixe na forma de ésteres metílicos ou etílicos. No entanto poucas são as referências que se tem de trabalhos realizados na forma de triacilgliceróis, os quais comentam sobre as dificuldades de fracionamento de uma forma vaga, sem apresentar dados. Sob o ponto de vista nutricional, estudos relatam que a ingestão de ésteres de ácidos graxos provoca problemas intestinais, conforme já exposto (El Boustaini et al., 1987; Lawson & Hughes, 1988; Hamazaki *et al.*, 1982). Logo, torna-se interessante estudar processos que permitam obter concentrados em n-3 (EPA e DHA) a partir de óleos marinhos, na sua forma natural de triacilgliceróis, não esquecendo de levar em consideração a viabilidade de se trabalhar em escala industrial.

3.2 Processo de extração com fluido supercrítico

A extração com fluidos supercríticos, em escala industrial iniciou na Alemanha, no final dos anos 70, com o processo de remoção da cafeína. Seus processos se destacam no ciclo evolutivo, enfatizando-se as seguintes características atuais, como muito importantes: a

utilização de uma tecnologia limpa, que não deixa resíduos, o trabalho com solventes não tóxicos, a não alteração das propriedades das matérias-primas e a extração de produtos de alta qualidade (Adams, 1991; Ankalan, 1995).

3.2.1 Fluido supercrítico

Podemos definir um fluido supercrítico como qualquer substância que esteja acima de sua temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c). A temperatura crítica é a máxima temperatura na qual um gás pode ser convertido para líquido por incremento da pressão; e a pressão crítica é a máxima pressão na qual um líquido pode ser convertido para gás por incremento na temperatura (Taylor, 1996).

O poder de solubilização de um solvente é tanto maior quanto mais denso este for, acima e nas proximidades do ponto crítico, um pequeno aumento de pressão produz um grande aumento do poder de solubilização do solvente. Esta é uma característica bastante peculiar do fluido supercrítico que se constitui no princípio fundamental do processo de extração por supercrítico.

No estado supercrítico, as propriedades físico-químicas de um fluido assumem valores intermediários àqueles do estado líquido e gás. Propriedades relacionadas à capacidade de solubilização, como a densidade, aproximam-se daquelas típicas de um líquido, enquanto propriedades relacionadas ao transporte de matéria, como a difusividade e a viscosidade, alcançam valores típicos de um gás. Sabe-se que os líquidos são excelentes solventes, mas de difusão lenta e alta viscosidade. Os gases, por sua vez não são bons solventes, mas difundem-se com extrema facilidade e são poucos viscosos. Os solventes supercríticos, combinando características desejáveis tanto de líquidos quanto de gases, são bons solventes que podem tornar a extração com fluido supercrítico um processo rápido e eficiente.

3.2.2 Utilização do CO₂ como fluido supercrítico

Várias são as vantagens em se usar o dióxido de carbono como solvente nos processos de extração supercrítica e que envolvem alimentos (Maul, 1999):

- gás: é um gás nas condições normais de temperatura e pressão podendo ser facilmente separado dos produtos extraídos, pela simples despressurização do sistema.

- Temperatura Crítica: 304,19 K, logo as extrações podem ser conduzidas a uma temperatura suficientemente baixa para não alterar as propriedades organolépticas e químicas dos extratos termossensíveis.

- Pressão crítica: 7,38 MPa, sendo esta condição fácil de se obter e trabalhar em um processo de produção industrial;

- inerte: portanto não oferece riscos de reações secundárias, como oxidações, reduções, hidrólises e degradações químicas;

- Seguro: o dióxido de carbono é um solvente inofensivo, não explosivo, não poluente, não tóxico, de uso significativo na gaseificação de bebidas;

- Polaridade: a polaridade do gás carbônico está próxima àquela do pentano e do hexano, solventes apolares comumente usados em extrações tradicionais por solventes;

- Versátil: Os parâmetros de extrações do CO₂ supercrítico podem ser modificados facilmente pela adição de co-solventes (polares ou apolares) como a água e o etanol, e também pela seleção das condições de temperatura e pressão específicas. Essas opções adicionam flexibilidade e permitem à adequação de condições para as necessidades específicas dos produtos a serem extraídos ao produto final desejado.

As condições para que se possa usar o CO₂ supercrítico como solvente do processo depende da natureza da amostra. Compostos lipofílicos, como hidrocarbonetos, éteres,

ésteres, cetonas e aldeídos são facilmente extraídos. No entanto substâncias polares, como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídeos, glicosídeos e sais minerais, não são solúveis. O fracionamento é possível quando a substância apresenta diferenças na volatilidade, no peso molecular ou na pressão de vapor (Maul, 1999).

Há outros gases que também têm propriedades de solventes interessantes no seu estado supercrítico. Entretanto, por razões de custo, perigo de explosão, toxicidade, inflamabilidade e propriedades físicas adversas, poucos são usados comercialmente (Maul, 1999). A Tabela 3 mostra uma relação de gases e suas propriedades supercrítica, ordenadas pela temperatura crítica em ordem crescente (Maul, 1999).

Tabela 3. Propriedades físicas de alguns fluidos para o uso como fluido supercrítico

Fluido	Temperatura Crítica (K)	Pressão Crítica (MPa)
Nitrogênio	126.15	3,39
Metano	190.66	4,64
Etileno	282.36	5,03
Dióxido de Carbono	304.19	7,38
Etano	305.4	4,88
Oxido Nitroso	309.6	7,25
Hexafluoreto de enxofre	318.71	3,76
Metanol	353.05	24,02
Propileno	364.75	4,61
Propano	370	4,25
Frigen 12	384.85	3,94
Amônia	405.55	11,30
Dióxido de enxofre	430.65	7,98
Pentano	196,60	3,33
Hexano	243,20	2,96
Água	374,40	22,68

Fonte: Maul, 1999.

3.2.3 Processos de Extração e Fracionamento com CO₂ supercrítico

A literatura científica relaciona muitos trabalhos de extração supercrítica de grande interesse na área de alimentos, discutem também a problemática associada a cada classe

particular de processos, como no caso da deterpenação de óleo essencial de laranja (Dugo *et al.*, 1995; Marques, 1996) e na extração de óleos essenciais de diferentes produtos naturais (Di Giacomo *et al.*, 1989; Farelo *et al.*, 1991; Ferreira *et al.*, 1993; Gerard, 1984; Germer, 1989; Iwai *et al.*, 1994, Iwai & Morotomi, 1996; Kalra *et al.*, 1987; Matos *et al.*, 1989; Meireles & Nikolov, 1994; Oliveira *et al.*, 2001, Shaw & Coleman, 1971; Stahl & Gerard, 1985; Stemelli *et al.*, 1988), na redução do teor de colesterol em alimentos (Foster *et al.*, Froning *et al.*, 1991, Mohamed *et al.*, 2000), na extração de carotenóides (Chao *et al.*, 1991; Cygnarowicz *et al.*, 1990; Degnan *et al.*, 1991; Lorenzo *et al.*, 1991; Sakaki, 1992; Silva, 1999; Skerget *et al.*, 1995; Spanos, 1993), de xantina, teofilina e teobromina (Jonanssen & Brunner, 1994; Li *et al.*, 1991), de vitaminas A, D, E e K (Jonanssen & Brunner, 1997, Meier, *et al.*, 1994), de ácidos graxos, triacilgliceróis e produtos correlatos (Masuda *et al.*, 2000; Borch-Jensen, 1997, Barath *et al.*, 1992; Barath *et al.*, 1993; Brunetti *et al.*, 1989; Inomati *et al.*, 1989; Laws, 1980; Liang & Yeh, 1991; Maheshwari *et al.*, 1992; Nilsson *et al.*, 1991; Nilsson & Hudsson, 1993; Ribeiro & Bernardo-Gil, 1995; Weber & Brunner, 1999.) dentre outros.

No caso específico da extração de lipídeos (Araújo, 1997; Brunetti, 1989; Chrastil, 1982) o CO₂ supercrítico a princípio pode substituir os solventes tradicionais e permitir um processo mais rápido de extração, eliminando algumas etapas do processo convencional (Araújo, 1997). A extração supercrítica apresenta alta eficiência de separação e baixa susceptibilidade a oxidação e tem sido utilizada para isolar lipídeos desde 1970 (Rizvi *et al.*, 1991).

Para a extração de óleos de sementes, esta técnica também se mostrou muito adequada, pois o óleo extraído não contém fosfolipídeos e outras substâncias complexas, não necessitando de uma etapa de degomagem no refino, como ocorre no processo tradicional de extração com hexano (Brunetti *et al.*, 1989).

Além da extração, há também grande interesse na separação e fracionamento de óleos com dióxido de carbono supercrítico, como na separação de ésteres metílicos derivados de óleo de peixe (Coniglio, *et al*, 1995; Jaubert, 1999), na remoção de mono e diglicerídeos de triglicerídeos (Nilsson *et al*, 1991), e na deacidificação de óleo de oliva (Brunetti *et al.*, 1989).

Seguindo a última tendência em alimentos funcionais, há interesse na separação de ácidos graxos polinsaturados, particularmente dos chamados ácidos n-3.

Fazendo-se uma pesquisa bibliográfica no “Web of Science”, encontrou-se quase 5000 artigos relacionados ao termo “fish oil”, sendo que a maioria destes artigos estão relacionados à área médica e de nutrição e poucos relacionados a propriedades de equilíbrio ou de processos. Os dados de equilíbrio existentes são de ésteres de ácidos graxos em dióxido de carbono supercrítico, raros são os que trazem dados de equilíbrio na forma de triacilgliceróis em fluido supercrítico. Estudando a extração da Bixina e de óleo das sementes de urucum (Silva, 1999), foi verificada uma grande diferença na composição de ácidos graxos nos óleos que compõem as duas fases em equilíbrio, evidenciando que é bastante atrativa a possibilidade de separar frações de óleos com alto teor em ácidos graxos insaturados usando o dióxido de carbono supercrítico como solvente.

Nilsson *et al.* (1991) estudaram a solubilidade dos compostos: Metil Oleato (MeO), Acido Oléico (AO), Monooleína (MO), Dioleína (DO) e Trioleína (TO) em CO₂ supercrítico a 323,15 K e 333,15 K. A faixa de pressão estudada foi de 11,0 a 15,1 MPa para MeO e AO e de 15,1 a 30,9 MPa para os demais compostos. Para todas as condições estudadas, foi observada uma relação entre a solubilidade e a massa molecular dos compostos. Compostos de menor massa molecular tendem a ser mais solúveis em CO₂ supercrítico. A maior solubilidade encontrada foi para o Metil Oleato e a menor para a Trioleína. Comportamento interessante foi observado a pressões maiores que 19,9 MPa para a isoterma a 323,5 K e

maiores que 24,1MPa para a isoterma 333,15 K, onde a solubilidade da Dioleína passa a ser maior do que a Monoleína. Nestas isotermas só foi identificado um indício do ponto de *cross over* para a Trioleína a 30,9 MPa.

Nilsson & Hudson (1993) obtiveram dados experimentais de solubilidade para a Trioleína (OOO) e Tripalmitina (PPP) em sistemas binários e para a mistura (OOO, POO, PPO, PPP) em CO₂ supercrítico, para as isotermas de 313,15 e 333,15 K e para uma faixa de pressão de 17,2 a 31,0 MPa. A composição da mistura contendo Ácido Oléico (C18:1; O) e Ácido Palmítico (C16:0; P) era de 32,76% de OOO, 39,18% de POO 16,97% de PPO e 11,11% de PPP.

Ambos triacilgliceróis em sistemas binários apresentaram solubilidade crescente com o aumento de pressão. Comportamento inverso foi observado em relação às isotermas, enquanto a Trioleína apresentou solubilidade maior a 313,15 K, a Tripalmitina apresentou valores maiores a 333,15 K. O ponto de *cross over* para a Trioleína foi encontrado a 31,0 MPa, enquanto para a Tripalmitina este comportamento não foi identificado nas condições estudadas. A maior solubilidade encontrada para a Trioleína (OOO) foi de 7,6 g/KgCO₂ e para a Tripalmitina (PPP) de 10,8 g/KgCO₂, ambas na condição de maior temperatura de pressão (31,0 MPa e 333,15 K). Apenas a 31,0 MPa a solubilidade da Trioleína. foi maior a 333,15K.

Em mistura o coeficiente de partição da Trioleína foi praticamente igual a sua solubilidade no sistema binário a 313,15 K. Logo, pode-se dizer que o coeficiente de partição da Trioleína foi independente do seu percentual na mistura. O mesmo comportamento foi encontrado para a Trilaurina (LLL) em uma mistura de triacilgliceróis (LLL, MMM, PPP) em CO₂ supercrítico, no estudo realizado por Bamberger *et al*, (1988) citado por Nilsson & Hudson (1993).

A partir dos coeficientes de partição, apresentados neste trabalho, calculou-se a razão destes triacilgliceróis em base livre de solvente e analisou-se qualitativamente o seu comportamento. Observou-se que a razão entre a fase leve e a fase pesada é maior para os triacilgliceróis de menor massa molecular. Por exemplo, para a condição a 24,1MPa bar e 333,15 K obteve-se uma razão de 0,78 para o OOO, 1,00 para a POO, 1,22 para o PPO e 1,34 para a PPP. Para a isoterma a 313,15 K o comportamento foi um pouco diferente, para todas as pressões inferiores a 31,0 MPa a razão (fase leve/fase pesada) aumentou da OOO para a POO e desta para a PPO, no entanto da PPO para a PPP diminuiu.

Neste estudo, também verificaram um abaixamento da temperatura de fusão da PPP de 333,15 para 330,15 K na pressão de 17,2 MPa, portanto leva-se a entender que a 333,15 K a tripalmitina (PPP) estava no estado líquido enquanto que a 313,15 K, possivelmente havia a presença de uma fase sólida. Este fenômeno deve-se as interações intermoleculares entre os triacilgliceróis em ambas as fases e aos efeitos de co-solvência (Bamberger *et al.*, 1988 citado por Nilsson & Hudson, 1993).

Conforme os resultados obtidos por Nilsson *et al.*, 1991 e Nilsson & Hudsson 1993, há um tendência dos compostos de menor massa molecular serem mais solúveis em CO₂ supercrítico. No entanto, a temperatura parece exercer mudanças neste comportamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Separações Físicas (LASEFI) com a colaboração do Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA-UNICAMP.

4.1 *Matéria Prima*

4.1.1 *Óleo de Peixe*

O óleo de peixe utilizado neste trabalho foi um padrão fornecido pela Roche Farmacêutica, denominado por Ropufa 30 n-3 Food Oil, com as seguintes especificações:

Acidez: máxima 0,6mg KOH / g

Índice de Peróxido: máx. 2.0 mg/ kg

Colesterol: máximo 0,5%

Metais Pesados: máximo de 0,1mg/ kg

Ferro: máximo 0,1 mg/ kg

n-3 PUFAS (DHA, EPA, DPA): 25%.

DHA: mínimo 12,5%

4.1.2 *Dióxido de Carbono*

Utilizou-se CO₂ com 99% de pureza, fornecidos pela White Martins em cilindros com tubo pescador contendo 18kg na fase líquida.

4.2 *Produtos químicos Diversos*

Foram usados reagentes do tipo PA-Merck, para a preparação dos ésteres metílicos, análises de cromatografia em fase gasosa, índice de acidez e índice de iodo.

4.3 Sistema Experimental

A Figura 4 mostra de forma esquemática o sistema de extração supercrítica empregada no processo de fracionamento do óleo de peixe e as Figuras 5, 6 e 7 mostram o equipamento montado em escala laboratorial. Este sistema foi construído baseado no sistema de Degnan *et al.* (1991), que consta de um cilindro sifonado de CO₂ (1), válvulas tipo agulha (2, 11, 14, 17), válvula anteretorno (8), válvula micrométrica (15), manômetros tipo Bourdon (3, 9, 12), banho de refrigeração (4), trocador de calor (5) e camisa (6), bomba de alta pressão (7), reservatório (10), extrator (13), banho termostatizado (16 e 19), coletor de extrato (18), bomba peristáltica (20), sistema de elevação (21).

Especificações das partes que compõem o sistema de extração supercrítica:

- Bomba de alta pressão: usada para HPLC, modelo AA100S - Eldex, Metering Pump;
- Bomba peristáltica: masterflex L/S 77910, Pump system - Cole-Parmer Instrument Company;
- Extrator: de aço inox AISI 316, 100 mL – Suprilab;
- Reservatório (tanque pulmão): de aço inox AISI 316, 500mL, Suprilab;
- Banho de refrigeração: modelo 12101-30 – Cole-Parmer Instrument

Company;

- Cuba termostatizada: para aquecimento, com sistema de circulação, de aço inox AISI 304 – Suprilab
- Manômetros: Record
- Válvulas tipo agulha e válvula micrométrica: Autoclave Engineers

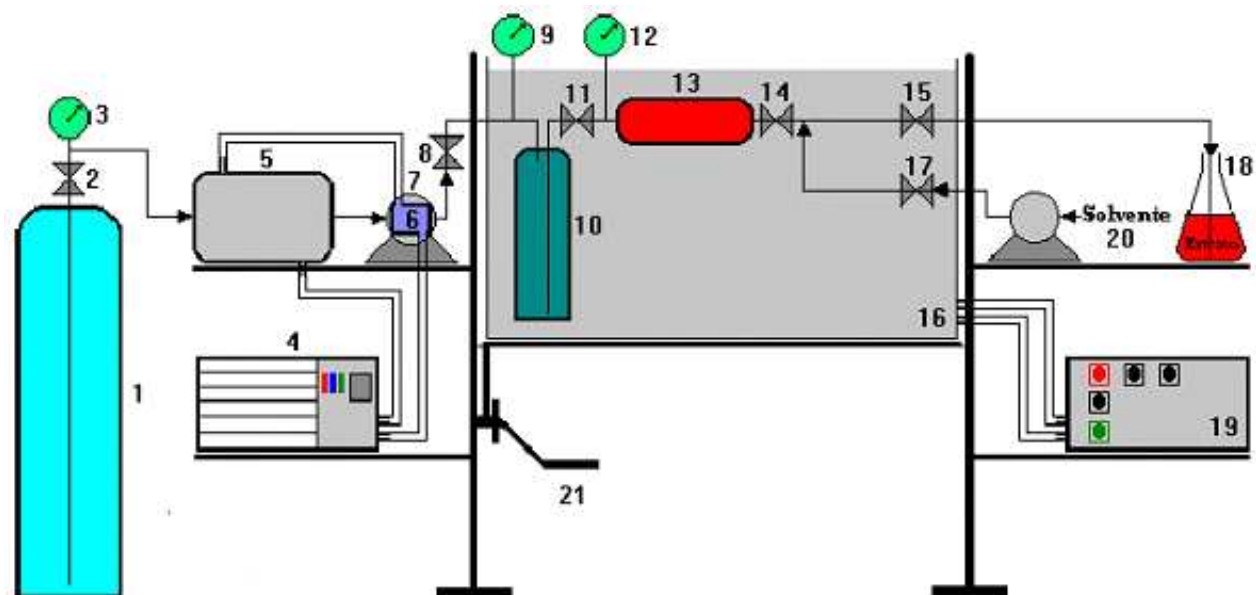


Figura 4. Sistema de extração supercrítica esquematizado.



Figura 5. Sistema de extração supercrítica, vista frontal.



Figura 6. Sistema de extração supercrítica, vista lateral 1.



Figura 7. Sistema de extração supercrítica, vista lateral 2.

4.4 Metodologia Experimental

O Procedimento experimental consistiu em promover o contato entre o soluto (óleo) aderido a esferas de vidro e o CO₂ supercrítico, na forma dinâmica e em condições pré-estabelecidas de temperatura e pressão. O fluxograma do processo é ilustrado na Figura 8 e a descrição de cada etapa é feita a seguir.

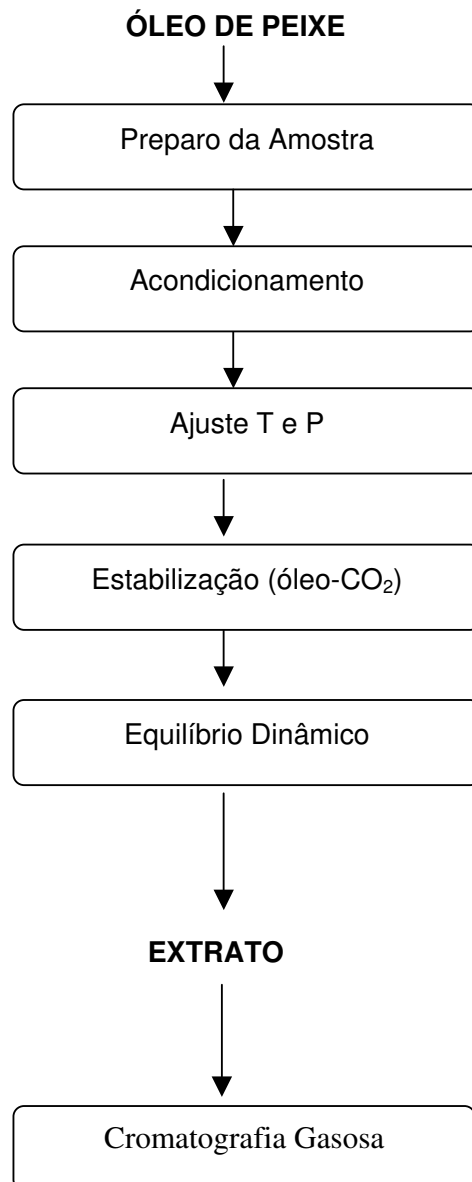


Figura 8. Fluxograma do processo de fracionamento do óleo de peixe com CO₂ supercrítico

Os números citados durante as descrições das etapas referem-se as peças que compõem o sistema experimental de extração supercrítica (Figura 4)

4.4.1 Preparo da amostra

Consistiu em misturar o óleo de peixe (8,5g) a esferas de vidro (em torno de 155g), submeter a um rápido resfriamento para então acondicioná-la no extrator. A quantidade de óleo foi estipulada levando em consideração:

- A necessidade de se obter uma amostra suficiente para as análises de cromatografia gasosa (1,0g), sem causar alteração na composição da fase pesada;
- As condições de acondicionamento permitidas pelo extrator, conforme o próximo item.

4.4.2 Acondicionamento

Nesta etapa, a mistura (óleo-esferas) já resfriada era acondicionada dentro do extrator por uma de suas extremidades (aberta) na posição vertical, a parte inferior se mantinha fechada. Feito isso, a parte superior do extrator era fechada e adaptada ao sistema.

O extrator fechado possui uma abertura por onde escoo o CO₂, quando o sistema está em operação. Esta abertura limitou a quantidade de óleo a ser adicionada dentro do extrator, devido à ocorrência de vazamentos da amostra. Estudaram-se formas de contornar, na medida do possível este problema. A solução foi submeter à mistura a um resfriamento, aumentando assim a viscosidade do óleo. Desta forma, conseguiu-se trabalhar com até 8,5 gramas sem que houvesse vazamentos.

4.4.3 Ajuste de Temperatura e Pressão

O sistema ficou imerso dentro de um banho termostatizado (16), regulado para a condição experimental. O extrator foi pressurizado através de uma bomba de alta pressão (7) e a válvula (8) aberta com o banho de refrigeração acionado (4), até obter-se a pressão desejada no sistema.

4.4.4 Estabilização

O sistema, já ajustado nas condições pré-estabelecidas, foi deixado por uma hora em repouso para que ocorresse a estabilização da amostra com o CO₂.

4.4.5 Equilíbrio Dinâmico

Nesta etapa, a bomba de alta pressão foi novamente ligada com os cabeçotes regulados para uma vazão de bombeamento proporcional à vazão de saída da amostra (CO₂-óleo), de forma a manter a pressão constante dentro do extrator. As válvulas (11) e (14) foram abertas simultaneamente, começando-se assim o processo de coleta no sistema dinâmico. Nesta etapa, o CO₂ que estava sendo bombeado entrava em contato com a amostra no extrator, onde ocorre o equilíbrio de fases.

As pressões no pulmão e no extrator foram controladas manualmente e a menor divisão do manômetro era de 2Kgf/cm² (0,1961MPa). Em consequência destas limitações ocorreram oscilações na pressão na ordem de 2 a 4 Kgf/cm².

O CO₂ liberado no frasco (18) era direcionado a um bolhometro para a medida da sua vazão. O gás foi tratado como gás ideal, visto que as condições de temperatura e pressão de despressurização eram ambientais.

A vazão de coleta foi estabelecida, levando em consideração o tempo de residência do CO₂ dentro do extrator, necessário para garantir o equilíbrio de fases CO₂ - óleo.

4.4.6 Extrato

O extrato foi coletado em frasco âmbar e acondicionado a temperatura de refrigeração para posterior análise.

4.4.7 Cromatografia Gasosa

A quantificação em ácidos graxos dos extratos foi realizada em um Cromatógrafo em fase gasosa da Agilent-6850, série CG System.(split spliless). Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados utilizando a coluna DB - Wax da Agilent, de 10m x 0,100mm diâmetro interno x 0,20µm de filme. Três condições de análise cromatográfica (A, B, C) foram utilizadas ao longo dos experimentos para determinar a composição dos ácidos graxos, conforme mostra a Tabela 4. Estas modificações foram feitas à medida que a coluna cromatográfica apresentava problemas na separação dos picos.

A composição em ácidos graxos do óleo de peixe original e das amostras de extrato foi obtida em porcentagem de área e identificadas por comparação com um padrão de óleo de peixe, adotado pelo Laboratório de Óleos e Gorduras, o Votag da Ativus Farmacêutica, que contém 18 % de EPA e 12 % de DHA.

A quantificação da amostra original foi realizada utilizando como padrão interno, o C23:0 - FR/100mg da Nu-Check.

Tabela 4. Condições adotadas para a composição em ácidos graxos

	Método de Análise			
	A	B	C	
Gás de Arraste	Helio	Helio	Helio	
Volume de Amostra	1 μ L	1 μ L	1 μ L	
Razão de Split	1:41, 2	1:30	1:30	
Fluxo da Coluna	3,3 μ L /s	5,0 μ L /s	5,0 μ L /s	
Velocidade Linear	0,28 m/s	0,30 m/s	0,30 m/s	
Temperatura Detector	593, 15 K	593, 15 K	593, 15 K	
Temperatura Injetor	573,15 K	573,15 K	573,15 K	
Temperatura do forno e tempo (s) de aquecimento	Inicial	413,15 K - 60 s	413,15 K - 60 s	
	Rampa	413,15 a 513,15 K 600 s	413,15 a 513,15 K 600 s	433,15 a 530,15 K 2400 s
	Final	530,15 K- 540 s	530,15 K -1140 s	

4.4.7.1 Esterificação

Os ésteres metílicos foram preparados segundo a metodologia da AOCS Official Method (Ce2-66) com algumas modificações: utilizou-se éter de petróleo ao invés de heptano e a fração éster foi separada utilizando-se micropipeta ao invés de funil de separação, para fins operacionais que não alteram o resultado.

4.5 Cálculo da seletividade

A efetividade do CO₂ supercrítico como solvente para fracionar triacilgliceróis, de forma a obter frações ricas em ácidos graxos polinsaturados, EPA e DHA, foi medido pela seletividade β . A qual é definida como a razão entre a concentração do ácido graxo de interesse na fase leve em relação à fase pesada, em base livre de solvente, conforme a equação abaixo:

$$\beta_A = \frac{\% \text{ mássica de A na fase leve (extrato)}}{\% \text{ mássica de A na fase pesada (refinado)}} = f(T, P) \quad (1)$$

A seletividade (β), definida neste trabalho, é equivalente ao coeficiente de partição

$$K_i = \frac{Y_i}{X_i}, \text{ em base livre de solvente.}$$

4.6 Cálculo da Solubilidade

A solubilidade do óleo de peixe, na fase leve foi calculada pelo quociente entre a massa de óleo coletada e a massa total de dióxido de carbono liberada por despressurização, para a atmosfera durante os experimentos, para a obtenção dos extratos.

$$S_{\text{fase leve}} = \frac{\text{massa de óleo}}{\text{massa de CO}_2} = \text{g/gCO}_2 f(T, P) \quad (2)$$

A massa de óleo de peixe na fase leve foi obtida por diferença de peso, do frasco de coleta, antes e depois do experimento.

As medidas de vazão do CO₂ foram feitas através de um bolhómetro,

A massa total de CO₂ escoado foi calculada considerando-se o gás na saída da válvula micrométrica como gás ideal, à aproximadamente 25°C e 0,93 bar de pressão.

E assim calculou-se a vazão mássica conforme as equações 3 e 4.

$$P \times V = \frac{m}{M} \times R \times T \quad (3)$$

Onde:

P = pressão atmosférica;

V = volume de n moles de CO₂ nas condições de T e P;

R = constante dos gases;

T = temperatura do CO_2 gasoso na saída da válvula;

m = massa de n moles do gás;

M = massa molar do gás (44,0g /mol para o CO_2).

Reescrevendo a equação dos gases ideais em termos de vazão volumétrica e vazão mássica

$$\dot{V} \times P = \left(\frac{\dot{m}}{M} \right) \times R \times T \quad (4)$$

onde:

\dot{V} = vazão volumétrica de saída do CO_2 (medida no bolhômetro);

\dot{m} = vazão mássica de CO_2 ,

Reorganizando os termos da equação 4, têm-se:

$$\dot{m} = P \times \dot{V} \times M \times \frac{1}{(R \times T)} \quad (5)$$

Os valores de P, T, \dot{V} foram obtidos experimentalmente. A vazão mássica (\dot{m}) obtida através da equação (5) foi multiplicada pelo tempo total de coleta da amostra de óleo de peixe. O tempo de coleta variou de acordo com a solubilidade e foi aquele necessário para obter em torno de 1 g de amostra. Assim, se obteve a massa total de dióxido de carbono.

$$\text{Tempo de coleta} \times \dot{m} = \text{Massa total } \text{CO}_2 \quad (6)$$

4.7 Composição em Triacilgliceróis

A composição em triacilgliceróis, dos óleos estudados foi estimada através do software TRIGLIC, desenvolvido pelo Laboratório de Óleos e Gorduras da FEA-UNICAMP, considerando a teoria da distribuição casual “Randon distribution”. Esta teoria estabelece que os ácidos graxos se encontram distribuídos ao acaso na molécula de triacilglicerol (Ferrari, 1992). As análises foram realizadas através da composição em ácidos graxos dos óleos, determinada neste trabalho.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho, estudou-se o fracionamento com CO₂ supercrítico, na forma dinâmica, do óleo de peixe rico em ácidos graxos polinsaturados, da série n-3. Verificou-se a influência das variáveis temperatura e pressão na seletividade (β) do CO₂ supercrítico, com o objetivo principal de verificar a possibilidade de obtenção de frações ricas em n-3 (EPA e DHA). A resposta (β) foi dada pela razão da concentração em ácidos graxos presentes no extrato (amostra da fase leve) em relação à fase pesada. A vazão foi mantida constante a $1,36 \times 10^{-5}$ m³/s e o tempo de processo foi àquele suficiente para coletar uma amostra do extrato na fase leve de aproximadamente um grama. Apresenta-se também, dados de solubilidade do óleo de peixe nas condições experimentais do processo de fracionamento.

Durante os ensaios preliminares alguns experimentos foram realizados pelo método estático, no entanto a quantidade de amostra que esse processo permitiu obter foi insuficiente para as análises de cromatografia gasosa e por isso optou-se pelo método dinâmico. Neste período determinou-se a quantidade de amostra a ser usada e a forma de acondicioná-la dentro do extrator.

5.1 Solubilidade do óleo de peixe em CO₂ supercrítico

Os dados experimentais de solubilidade do óleo de peixe, nas diferentes condições operacionais de temperatura e pressão, estudadas neste trabalho, são apresentados na Tabela 5. O comportamento da solubilidade com a pressão e a densidade do CO₂ são mostrados nas Figuras 9 e 10. Os valores da densidade do CO₂ foram calculados através de um programa computacional (Silva, 1999), que utiliza a equação de Huang *et al* (1985). Esta equação reproduz valores experimentais da IUPAC (Angus *et al.*, 1976).

Tabela 5. Dados de solubilidade do óleo de peixe

Temperatura (K)	Pressão (MPa)	Densidade do CO ₂ (kg/m ³)	Solubilidade (g/kg)
303,15	29,4	945,68	6,97
313,15	19,6	837,14	2,77
	24,5	876,87	3,53
	29,4	907,16	7,06
323,15	14,7	693,81	2,03
	19,6	780,42	2,33
	24,5	830,77	3,55
	29,4	867,11	6,62
306,15	7,8	573,85	0,45
301,15	7,8	732,68	0,52

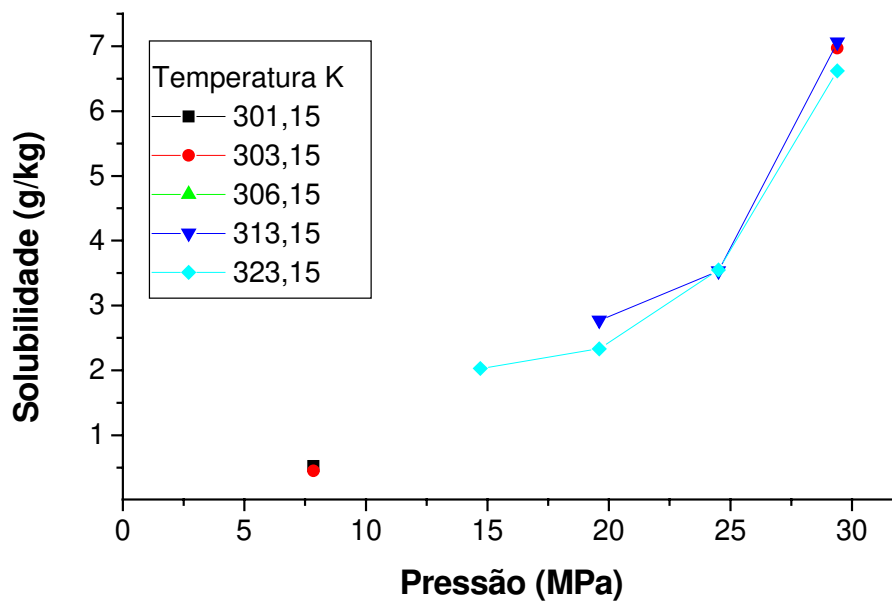


Figura 9. Solubilidade de óleo de peixe em função da pressão

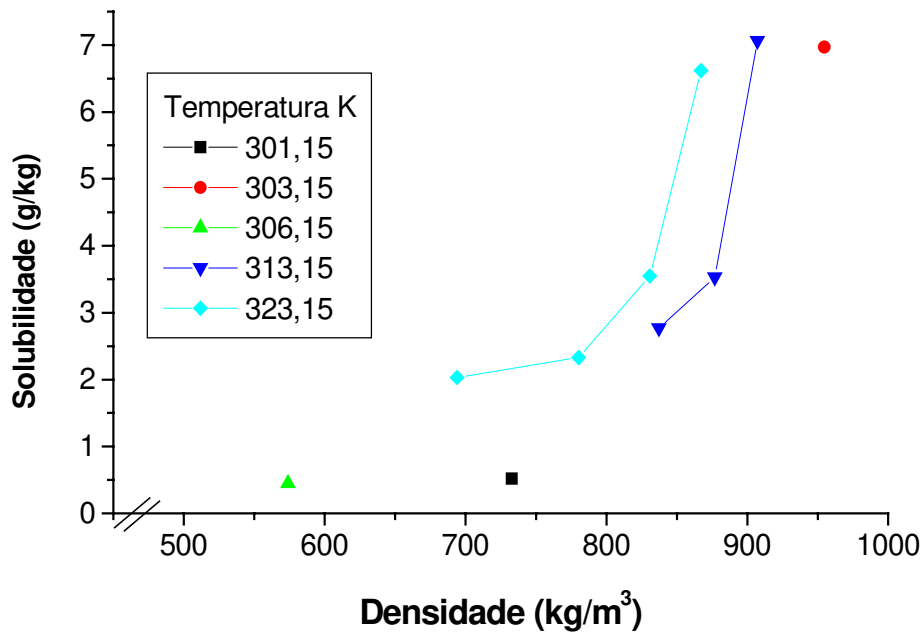


Figura 10. Solubilidade de óleo de peixe em função da densidade

Conforme os dados mostrados na Tabela 5, observa-se que a solubilidade do óleo de peixe aumentou com o incremento da pressão a temperatura constante, no entanto, o efeito da temperatura foi pouco significativo. Ao aumentá-la de 313,15 K para 323,15 K, nas pressões de 19,6 e 29,4 MPa, observa-se uma diminuição da solubilidade na ordem de 6%. E ao aumentá-la de 303,15 para 313,15 K a 29,4 MPa e de 313,15 para 323,15 K a 24,5 MPa, não se verifica variação na solubilidade. As maiores solubilidades obtidas foram de 6,62, 6,97 e 7,06 g óleo/ kg CO₂ a 29,4 MPa e a temperaturas de 323,15, 303,15 e 313,15, respectivamente.

Visto que, a solubilidade de um composto é diretamente dependente da densidade do solvente e que incrementos na pressão, a temperatura constante, causam um aumento da densidade do solvente, o comportamento da solubilidade obtido neste estudo mostra-se coerente (Figura 9 e 10). Na faixa de pressão estudada não foram identificados pontos de

“cross-over”, no qual para uma dada pressão há inversão do comportamento da solubilidade com a temperatura.

Temelli *et al* (1995) estudaram a extração do óleo do músculo do peixe, da espécie “Atlantic Mackerel” com CO₂ supercrítico. O estudo foi realizado na faixa de temperatura de 308,15 a 328,15 K e no intervalo de pressão de 20,7 a 34,5 MPa. Para estas condições, o mesmo comportamento foi observado em relação à solubilidade, a qual aumentou com a pressão e diminuiu com a temperatura. A maior solubilidade (14,21 g/kg) e concentração de

n-3 foram encontradas a 34,5 MPa e 308,15 K. Neste estudo também não foram identificados pontos de “cross-over”.

O conhecimento da solubilidade da amostra em estudo é importante para avaliar a viabilidade econômica do processo, visto que quanto maior o seu valor menor será o consumo de solvente e tempo de extração.

5.2 Caracterização do óleo de peixe

Inicialmente o óleo de peixe usado neste estudo foi caracterizado quanto a sua composição em ácidos graxos, quanto ao seu grau de acidez e índice de peróxido. Encontraram-se respectivamente, valores de 0,3 mg KOH/g óleo e 2,0 meq/kg óleo para as análises de índice de acidez e índice de peróxido, os quais estão de acordo com os valores especificados pelo fornecedor e estão dentro do permitido pelas exigências do Codex Alimentarius, 1992.

Para a composição em ácidos graxos, escolheu-se para representar a composição do óleo de peixe o cromatograma que apresentou melhor separação dos picos, visto que durante os experimentos foram usadas três condições de análise de cromatografia gasosa (Tabela 4).

Na Tabela 6 são apresentados os principais ácidos graxos identificados na amostra de óleo de peixe, representando aproximadamente 78% do total da amostra, dos quais aproximadamente 70% são insaturados. Os dois principais ácidos graxos de interesse, EPA e DHA somam 29% do total. Apesar de não estar identificada a matéria prima que originou o óleo em estudo, a composição encontrada mostra-se típica a de óleos de peixes marinhos de águas frias (Tabela 2). Por exemplo, o óleo de fígado de bacalhau contém entre 14 a 31% de DHA e EPA, o óleo de salmão possui aproximadamente 31% e o óleo de anchova entre 14 e 31% (AOCS, 1997).

Tabela 6. Composição em graxos do óleo de peixe

Ácido Graxo		% Mássica
Mirístico – M	C14:0	6,13
Palmítico – P	C16:0	15,93
Palmitoleico - Po	C16:1	7,02
Esteárico - S	C18:0	1,24
Oléico w11 - O	C18:1 ω11	3,52
Oléico w9 - O	C18:1 ω9	10,85
γ - Linolênico - Ln	C18:3	2,64
Eicosapentaenóico - E	C20:5 n-3; EPA	12,44
Docosapentaenóico - Do	C22:5 n-3	1,94
Docosaheptaenóico - D	C20:6 n-3; DHA	16,72
Outros componentes intermediários de % pequena		19,31

Para ajudar a discutir os resultados deste trabalho, a composição em triacilgliceróis do óleo de peixe foi estimada, conforme o item 4.7, o resultado é apresentado na Tabela 7.

Tabela 7. Composição provável de triacilgliceróis do óleo de peixe

Triacilglicerol	Grupo	Peso Molecular	% Mássica
MPoP	46:1	777,28	2,03
MOP	48:1	805,33	4,62
POP	50:1	833,38	3,78
MPoO	48:2	803,32	1,99
PPoO	50:2	831,37	4,15
POO	52:2	859,42	3,01
PLnP	50:3	829,35	1,14
PoOO	52:3	857,41	1,01
OOO	54:3	885,46	0,59
PPoLn	50:4	827,34	0,98
POLn	52:4	855,39	1,07
MEP	50:5	825,32	2,46
PEP	52:5	853,37	3,60
PDoP	54:5	881,43	1,16
MPoE	50:6	823,31	1,64
MDP	52:6	851,36	7,41
POE	54:6	879,41	9,01
PODo	56:6	907,47	1,53
MPoD	52:7	849,35	1,67
PPoD	54:7	877,4	6,97
POD	56:7	905,45	7,53
SOD	58:7	933,51	0,62
PLnE	54:8'	875,38	1,40
PoOD	56:8	903,44	2,05
OOD	58:8	931,49	1,78
MLnD	54:9	873,37	0,72
PLnD	56:9	901,42	1,63
MEE	54:10	871,35	0,80
PEE	56:10	899,4	2,49
OLnD	58:10	927,46	1,38
MED	56:11	897,39	2,63
PED	58:11	925,44	6,34
PDoD	60:11	953,5	1,39
PoED	58:12	923,43	2,79
OED	60:12	951,48	5,99
ODoD	62:12	979,54	0,64

5.3 Fracionamento do óleo de peixe com CO₂ supercrítico

Nesta seção, apresenta-se a composição em ácidos graxos dos extratos do óleo de peixe (amostras da fase leve, em base livre de solvente) obtidos através do processo de fracionamento com CO₂ supercrítico e discuti-se os dados de seletividade calculados a partir destes.

5.3.1 Seletividade do CO₂ supercrítico para o óleo de peixe.

As amostras de extrato foram analisadas quanto à sua composição em ácidos graxos e, assim, a seletividade do CO₂ em termos dos componentes de interesse puderam ser calculadas. Foram incluídas as condições de 306,15 K e 7,8 MPa e 301,15 K e 7,8 MPa por estarem próximas ao ponto crítico do dióxido de carbono, onde se espera maior seletividade do solvente. Na primeira condição, o solvente encontra-se no estado de fluido supercrítico e na segunda em estado de líquido comprimido.

Pequenas variações nos resultados decorrentes da leitura do cromatógrafo foram observadas para amostras analisadas em dias diferentes. Em vista disto, tomou-se o cuidado de analisar uma amostra do óleo de peixe original (branco), a cada dia de análise.

Valores de seletividade diferentes da unidade ($\beta \neq 1$) indicam a possibilidade de fracionamento. Onde os valores maiores que (1) indicam uma maior concentração do componente em questão "A" na fase leve em relação à fase pesada, e menores que (1) uma menor concentração. A seletividade foi calculada através dos ácidos graxos que representam os triacilgliceróis da composição do óleo de peixe. Assim, dizer que um determinado ácido graxo se enriquece na fase leve, significa dizer que os triacilgliceróis que o compõem tem maior afinidade pela fase leve.

As Tabelas 8 e 9 apresentam a composição em ácidos graxos dos extratos de óleo de peixe, nas diferentes condições experimentais. A Tabela 10 mostra os valores de seletividade (β) calculados a partir desta composição.

Tabela 8. Composição do extrato do óleo de peixe (%massa) no equilíbrio

Componente	Original 1	29,4 MPa 323,15 K	24,5 MPa 323,15 K	19,65 MPa 323,15 K	24,5 MPa 313,15 K	Original 2	7,8 MPa 301,15 K
C14:0	6,00	8,39	8,55	9,33	8,51	6,13	9,91
C16:0	15,38	17,29	17,72	17,92	17,38	15,93	17,42
C16:1	6,99	8,96	9,1	9,59	9,021	7,04	9,45
C18:0	1,35	1,65	1,62	1,68	1,64	1,24	1,56
C18:1 n-11	3,39	3,04	3,033	1,74	2,04	3,52	2,79
C18:1 n-9	12,67	13,46	10,88	11,15	11,031	10,85	10,89
C18:3	2,74	3,01	2,98	3,03	3,15	2,64	2,93
C20:5 n-3; EPA	12,59	12,66	12,6	12,43	13,048	12,44	11,68
C22:5 n-3	2,07	1,54	1,54	1,46	1,61	1,94	1,27
C22:6 n-3; DHA	15,52	13,02	12,93	12,38	13,38	16,72	11,24
Somatório	78,70	83,02	80,953	80,71	80,81	78,45	79,14
C. Menores	21,30	16,98	19,05	19,29	19,19	21,55	20,86

Tabela 9. Composição do extrato do óleo de peixe (%massa) no equilíbrio

Componente	Original 3	29,4 MPa 303,15 K	19,6 MPa 313,15 K	29,4MPa 313,15 K	14,7 MPa 323,15 K	7,8 MPa 306,15 K
C14:0	5,78	7,56	7,767	7,36	6,5	6,15
C16:0	14,86	15,72	17,01	15,71	15,52	15,48
C16:1	6,75	8,21	8,53	8,03	7,31	7,04
C18:0	1,20	1,32	1,37	1,26	1,15	1,14
C18:1 n-11	3,32	1,68	2,3	1,76	2,42	2,119
C18:1 n-9	12,45	10,29	11	10,16	12,45	12,45
C18:3	2,58	2,94	2,81	2,8	2,5	2,39
C20:5 n-3; EPA	12,21	12,64	12,33	12,11	11,56	11,37
C22:5 n-3	2,10	1,7	1,58	1,78	1,94	1,96
C22:6 n-3; DHA	15,95	13,27	13,11	12,83	14,2	14,42
Somatório	77,20	75,33	77,807	73,8	75,55	74,519
C. menores	22,80	24,67	22,19	26,20	24,45	25,48

Tabela 10. Seletividade do CO₂ supercrítico para o óleo de peixe em termos dos ácidos graxos de sua composição.

Temperatura (K)	Pressão (MPa)	Seletividade (β)									
		C14:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1 n-11	C18:1 n-9	C18:3	C20:5 n-3 EPA	C22:5 n-3	C22:6 n-3 DHA
303,15	29,4	1,31	1,06	1,22	1,10	0,51	0,83	1,14	1,04	0,81	0,83
313,15	19,6	1,34	1,14	1,26	1,14	0,69	0,88	1,19	1,01	0,75	0,82
	24,5	1,42	1,13	1,29	1,21	0,60	0,87	1,15	1,04	0,78	0,86
	29,4	1,27	1,06	1,19	1,05	0,53	0,82	1,09	0,99	0,85	0,80
323,15	14,7	1,12	1,04	1,08	0,96	0,73	1,00	0,97	0,95	0,92	0,89
	19,6	1,56	1,17	1,37	1,24	0,51	0,88	1,11	0,99	0,71	0,79
	24,5	1,43	1,15	1,30	1,20	0,89	0,86	1,09	1,00	0,74	0,83
	29,4	1,40	1,12	1,28	1,22	0,90	1,06	1,09	1,01	0,75	0,83
306,15	7,8	1,06	1,04	1,04	0,95	0,64	1,00	0,92	0,93	0,93	0,90
301,15	7,8	1,61	1,09	1,34	1,26	0,790	0,99	1,11	0,94	0,65	0,67

Conforme os valores de β apresentados na Tabela 10, ácidos graxos de cadeia curta tendem a ir para a fase leve (rica em CO_2). Ou seja, compostos de menor massa molecular são mais solúveis em CO_2 supercrítico. Para os ácidos graxos C16:0 e C16:1 e para o C22:5 n-3 e C22:6 n-3, os quais apresentam diferença somente quanto a insaturação, observa-se que os valores de β são maiores para o C16:1 e o C22:6. Este comportamento é um indicativo que o CO_2 supercrítico é mais seletivo para ácidos graxos insaturados, considerando compostos de mesmo tamanho de cadeia de carbonos. No entanto, os ácidos graxos C18:0, C18:1 n-11, C18:1 n-9 e C18:2 n-6 não mostraram o mesmo comportamento. Enquanto o C18:0 e o C18:2 n-6 tendem a ir para a fase leve o C18:1 n-11 e o C18:1 n-9 tendem a ficar na fase pesada.

Para todas as condições de temperatura e pressão estudadas, a seletividade obtida para o EPA foi praticamente unitária, indicando a impossibilidade de se obter frações de triacilgliceróis concentradas neste componente. Para o DHA, nas condições de temperatura e pressão de 303,15 a 323,15 K e 19,6 a 29,4 MPa os valores de β variaram de 0,80 a 0,90, indicando a possibilidade de um pequeno fracionamento. Comportamento interessante encontrou-se na condição a 301,15 K e 7,8 MPa, onde se obteve um β de 1,64 para o C14:0 e de 0,67 para o DHA (33% a menos na fase leve em relação à fase pesada), indicando a possibilidade de fracionamento nesta região. Este resultado indica que o CO_2 é mais seletivo na região de líquido comprimido do que em condições supercríticas, para fracionar os triacilgliceróis do óleo de peixe em questão. No entanto, a solubilidade do óleo de peixe obtida a 301,15 K e 7,8 MPa foi de 0,52 g/kg CO_2 , muito baixa comparada às demais condições (Tabela 5). Uma solubilidade muito baixa torna o processo limitado devido ao longo período de extração e grande consumo de solvente.

Através da composição em triacilgliceróis estimada para o óleo de peixe (Tabela 7) observa-se a presença de 36 triacilgliceróis, com massa molecular muito próxima. E a

maioria (83,33%) apresenta uma concentração (% mássica) inferior a 5% dos quais 30,01% compõem de 1 a 2%, logo não há predominância de grupos específicos de triacilgliceróis no óleo. Observa-se também que os ácidos graxos saturados e polinsaturados aparecem compartilhando a mesma molécula. Estas evidências parecem limitar o processo de fracionamento do óleo de peixe rico em ácidos graxos polinsaturados, devido a sua natureza heterogênea e complexa.

Borch-Jensen & Jorgen Mollerup (1997), encontraram o mesmo comportamento em relação à seletividade do CO_2 , estudando o equilíbrio de fases do óleo de peixe bruto em CO_2 sub e supercrítico, contendo triacilgliceróis, ácidos graxos livres, vitaminas, colesterol entre outros componentes. Os experimentos foram realizados na faixa de 6 a 65 MPa e a temperaturas de 293,2, 313,2 e 353,2 K. Os dados de equilíbrio foram apresentados para os diferentes compostos do óleo de peixe bruto, conforme o tamanho da cadeia de carbonos sem diferenciá-los pelas insaturações. Para todas as condições estudadas, os dados obtidos de coeficiente de partição em base livre de solvente apresentaram um valor decrescente com o aumento da massa molecular para uma mesma classe de compostos. Assim, para a condição a 20,01 MPa e 313,2K obtiveram um K_i de 52,9 para o C:14 (ácido graxo livre com 14 átomos de carbonos) de 9,65 para o C16 e de 5,21 para o C22. Para os triacilgliceróis foram obtidos um K_i de 1,93 para o triacilglicerol com 46 átomos de carbonos e de 0,21 para o triacilglicerol com 66 carbonos. Observa-se também, que o coeficiente de partição obtido para o C14 foi aproximadamente cinco vezes maior do obtido para o C16:0.

Através dos valores de β , obtidos neste trabalho (Tabela 10), a 19,6 MPa e 313,1K tem-se um β de 1,34 para o C14:0, um aumento quase duas vezes e meia maior do obtido para o C16:0 (1,14). Podemos dizer que para as mesmas condições de temperatura e pressão o CO_2 é altamente seletivo para o C14:0 comparado ao C16:0. Mesmo assim, esperava-se obter uma seletividade maior para esses ácidos graxos visto que é possível

como mostrado por Borch-Jensen & Jorgen Mollerup (1997), mas isto não ocorreu provavelmente por estarem associados a ácidos graxos polinsaturados nas moléculas de triacilgliceróis dificultando o processo de fracionamento também para estes componentes.

Stout *et al.* (1990) citado por Shahidi & Wanasundara (1998) encontraram as mesmas dificuldades em concentrar n-3 PUFAs na forma de triacilglicerol, principalmente para o EPA, através de um processo de destilação, conforme descrito no item 3.1.5.3. Neste estudo, obtiveram um aumento de 21% na concentração de EPA e 100% na concentração de DHA, logo a concentração em DHA foi cinco vezes maior em relação ao EPA. Para o processo de fracionamento com CO₂ supercrítico (neste trabalho) para a condição de 301,15 K e 7,8 MPa, onde se obteve uma seletividade (β) de 0,94 para o EPA e de 0,67 para o DHA, (6 e 33% a menos na fase leve em relação à fase pesada), a diferença no fracionamento foi também cinco vezes maior para o DHA. Comparando os métodos, a concentração de EPA e DHA foi três vezes maior pelo método de destilação em relação ao fracionamento com CO₂ supercrítico. Como os métodos discutidos são diferentes, esta comparação não é conclusiva, pois cada processo apresenta vantagens e desvantagens próprias (item 3.1.5.3 e 3.1.5.5), que devem ser também avaliados.

5.4 Fracionamento de uma mistura de óleo de peixe e gordura de babaçu com CO₂ supercrítico

Para melhor visualizarmos como a composição em triacilgliceróis, a massa molecular e a insaturação influem na seletividade do solvente, preparou-se uma mistura em partes iguais de óleo de peixe com gordura de babaçu e estudou-se o seu fracionamento. Analisou-se também, a possibilidade de efeitos de co-solvência da gordura de babaçu neste processo.

Escolheu-se a gordura de babaçu por possuir uma composição bem diferenciada do óleo de peixe sendo composta por aproximadamente 80% de ácidos graxos saturados (C8:0 a C18:0) e 20% de insaturados C18:1 e C18:2 (AOCS, 1997; *Gioielli et al.*, 1998).

5.4.1 Caracterização da gordura de babaçu

Primeiramente, caracterizou-se a amostra de gordura de babaçu quanto a sua composição em ácidos graxos e triacilgliceróis, conforme os itens 4.4.7 e 4.7, cujos resultados são mostrados nas Tabelas 11 e 12.

Tabela 11. Composição em ácidos graxos da gordura de babaçu

Ácido Graxo	% Mássica Gordura de Babaçu		
	AOCS	<i>Gioielli et al</i>	Neste trabalho
C8:0 – Cp	2,6-7,3	5,5	6,46
C10:0 – C	1,2-7,6	6,1	5,26
C12:0 – L	40,0-55,0	34,1	42,97
C14:0 – M	11,0-27,0	19,2	15,67
C16:0 – P	5,2-11,0	10,6	8,76
C18:0 – S	1,8-7,4	4,3	3,77
C18:1 – O	9,0-20,0	17,1	15,54
Outros	1,4-6,6	3,1	1,57

Fonte: AOCS,1997; *Gioielli et al.*, 1998.

Tabela 12. Composição provável de triacilgliceróis da gordura de babaçu considerando 65% de trissaturados.

Triacilglicerol	Grupo	Massa Molecular	% Mássica
CpCpL	28:0	526,81	1,13
CpCL	30:0	554,86	1,86
CpLL	32:0	582,91	6,70
CpLM	34:0	610,97	8,11
LLL	36:0	639,01	14,95
LLM	38:0	667,07	12,87
LLP	40:0	695,12	9,62
LMP	42:0	723,18	6,12
LPP	44:0	751,23	2,87
LPS	46:0	779,29	1,22
CpOC	36:1	637,01	0,57
CpOL	38:1	665,06	4,20
COL	40:1	693,11	4,34
LOL	42:1	721,16	12,49
LOM	44:1	749,22	7,97
LOP	46:1	777,27	5,10
LOS	48:1	805,33	2,72
MOS	50:1	833,39	0,81
LOO	48:2	803,31	0,52

Os dados obtidos para a composição em ácidos graxos corroboram com os valores da literatura. Para a composição em triacilgliceróis não foram encontrados dados na literatura.

5.5 Seletividade do CO₂ supercrítico para fracionar uma mistura de óleo de peixe e gordura de babaçu

A Tabela 13 apresenta a composição em ácidos graxos da mistura de óleo de peixe e gordura de babaçu (em partes iguais) e a composição dos extratos obtidos por fracionamento com dióxido de supercrítico e suas respectivas solubilidades.

Tabela 13. Dados de fracionamento para a mistura de óleo de peixe e gordura de babaçu

	Condição Experimental	19,6 MPa 323,15 K	7,8 MPa 306,15 K	7,8 MPa 301,15 K
Ácido Graxo	Composição mistura	Composição dos extratos		
C8:0	3,10	5,09	3,20	7,10
C10:0	2,59	4,31	2,84	6,66
C12:0 (β)	21,09	39,51 (1,87)	24,82 (1,18)	49,28 (2,34)
C14:0 (β)	10,60	15,50 1,46	11,04 1,04	14,50 1,37
C16:0	12,14	10,07	11,21	6,80
C16:1	3,54	2,17	3,11	1,17
C18:0	2,43	3,08	2,11	2,05
C18:1 n-11				
C18:1 n-9	12,08	8,59	10,64	5,38
C18:3	1,35	0,65	1,13	0,36
C20:5 n-3; EPA (β)	6,50	2,84 (0,438)	5,64 (0,869)	1,45 (0,224)
C22:5 n-3	1,18	0,34	1,13	0,36
C22:6 n-3; DHA (β)	8,32	2,81 (0,338)	7,24 (0,870)	1,32 (0,159)
Solubilidade g/kg		6,95	2,34	2,23

De acordo com os valores de β apresentados na Tabela 13, os resultados indicam que neste caso o fracionamento seria possível, especialmente a 301,15 K e 7,8 MPa onde se obteve um β de 2,34 para C12:0, 1,37 para o C14:0, 0,224 para EPA e de 0,159 para o DHA.

Uma vez que a gordura de babaçu (Tabela 12) é composta por 19 triacilgliceróis que se dividem em quatro frações bem distintas quanto a sua massa molecular e apresenta uma composição (% mássica) bem distribuída, com valores variando de 0,5 até 15% do total de triacilgliceróis, ela parece mais susceptível ao fracionamento. Pode-se dizer que o CO₂ supercrítico é mais efetivo para fracionar óleos com uma composição distinta em triacilgliceróis. Nota-se também, que a solubilidade da mistura de óleo de peixe e gordura de

babaçu (1:1) é bastante superior à do óleo de peixe puro (Tabela 5), em virtude principalmente do alto conteúdo de triacilgliceróis formados por ácidos graxos de cadeia curta, (baixa massa molecular) provenientes do babaçu.

Para verificar se a gordura de babaçu promoveu algum efeito de co-solvência na separação dos componente de interesse, analisou-se a solubilidade dos ácidos graxos EPA e DHA nos extratos de óleo de peixe e na mistura óleo de peixe com babaçu (1:1), obtidos a 7,8 MPa e 301,15 K. Os extratos obtidos nestas situações distintas, resultam em triacilgliceróis contendo 11,68 e 1,45% de EPA que correspondem a solubilidade de 0,061 e 0,032 g(EPA)/kgCO₂. De forma análoga, obtêve-se 11,24 e 1,32 % de DHA cujas solubilidades foram de 0,058 e 0,029 g_(DHA)/kg CO₂. Verificando-se assim, que a solubilidade para os triacilgliceróis contendo EPA e DHA reduziu-se a metade na mistura (óleo de peixe e gordura de babaçu). Este comportamento indica que a gordura de babaçu não promoveu efeitos de co-solvência no fracionamento do óleo de peixe, visto que a mistura é composta de frações 1:1 e que a gordura de babaçu não contém EPA e DHA na sua composição em triacilgliceróis.

5.6 Fracionamento do óleo de peixe e da gordura de babaçu a 7,8 MPa e 301,15 K

Para a condição a 7,8 MPa e 301,15 K onde foi verificado um indício de fracionamento para o óleo de peixe, foram realizados dois experimentos: Um com o próprio óleo de peixe, com a finalidade de esgotar a amostra original colocada no extrator e, assim, conhecer a composição em ácidos graxos e a provável composição em triacilgliceróis presente no refinado (óleo remanescente no extrator) e outro com a gordura de babaçu para complementar este estudo.

5.6.1 Composição em ácidos graxos e em triacilgliceróis do refinado do óleo de peixe

A Tabela 14 apresenta a composição em ácidos graxos presente no refinado do óleo de peixe, após extrair aproximadamente 40% do óleo de peixe inicial. Para uma melhor discussão dos resultados, são apresentados também a composição do extrato e a razão (refinado/óleo original) para o óleo de peixe a 7,8 MPa e 301,15 K. Os cromatogramas e os relatórios de dados da amostra de óleo de peixe original, do extrato e do refinado, obtidos neste experimento, são mostrados no apêndice através das figuras e tabelas A, B e C, respectivamente.

Conforme pode ser observado, mesmo para um longo período de extração encontrou-se uma razão (refinado/óleo original) unitária para o EPA (C20:5 n-3), enquanto para os demais ácidos graxos obteve-se uma variação de 5 até 40% na concentração do refinado em relação à composição do óleo original.

Tabela 14. Composição em ácidos graxos do refinado do óleo de peixe a 301,15K e 7,8 MPa

Ácido Graxo	Original (2)	Extrato	Refinado	Refinado/Original
C14:0	6,13	9,91	3,58	0,58
C16:0	15,94	17,42	14,23	0,89
C16:1	7,04	9,45	5,02	0,71
C18:0	1,24	1,56	0,98	0,79
C18:1 ω11	3,52	2,79	2,23	0,63
C18:1 ω 9	10,85	10,89	10,43	0,96
C18:3	2,64	2,93	2,26	0,86
C20:5 n-3; EPA	12,44	11,68	12,28	0,98
C22:5 n-3	1,94	1,27	2,51	1,29
C22:6 n-3; DHA	16,72	11,24	21,32	1,27
Somatório	78,45	79,14	74,84	
C. Menores	21,59	20,86	25,16	

Refinado – Óleo que permaneceu no extrator após o experimento.

Através da Tabela 15 verifica-se que os triacilgliceróis: PEP, POE, PEE, MED e PLnE também apresentaram uma razão (refinado/óleo original) unitária, os quais correspondem a 18,32% da composição total do óleo original. Analisando o comportamento dos triacilgliceróis com o mesmo número de insaturações, observa-se que quanto menor a sua cadeia de carbonos mais ela tende para a fase leve no fracionamento com CO₂ supercrítico. A Tabela 16 apresenta a porcentagem de mono, di e triinsaturados presentes na composição dos triacilgliceróis do óleo de peixe, estimada neste trabalho.

Tabela 15. Composição em triacilgliceróis do refinado do óleo de peixe % Mássica

Triacilglicerol	Grupo	Original	Refinado	Refinado/Original
MPoP	46:1	2,03	0,86	0,43
MOP	48:1	4,62	2,77	0,61
POP	50:1	3,78	3,05	0,82
MPoO	48:2	1,99	1,03	0,52
PPoO	50:2	4,15	2,82	0,69
POO	52:2	3,01	2,61	0,88
PLnP	50:3	1,14	0,82	0,73
PoOO	52:3	1,01	0,76	0,77
OOO	54:3	0,59	0,55	0,95
PPoLn	50:4	0,98	0,63	0,65
POLn	52:4	1,07	0,92	0,87
MEP	50:5	2,46	1,51	0,63
PEP	52:5	3,6	3,22	0,91
PDoP	54:5	1,16	1,15	1,01
MPoE	50:6	1,64	0,87	0,54
MDP	52:6	7,41	5,65	0,77
POE	54:6	9,01	9,6	1,08
PODo	56:6	1,53	1,73	1,15
MPoD	52:7	1,67	1,15	0,7
PPoD	54:7	6,97	6,49	0,94
POD	56:7	7,53	9,22	1,24
SOD	58:7	0,62	0,76	1,23
PLnE	54:8	1,4	1,31	0,95
PoOD	56:8	2,05	2,26	1,12
OOD	58:8	1,78	2,41	1,37
MLnD	54:9	0,72	0,6	0,84
PLnD	56:9	1,63	1,9	1,19
MEE	54:10	0,8	0,58	0,74
PEE	56:10	2,49	2,72	1,11
LnD	58:10	1,38	1,85	1,36
MED	56:11	2,63	2,49	0,96
PED	58:11	6,34	8,72	1,4
PDoD	60:11	1,39	2,29	1,67
PoED	58:12	2,79	3,43	1,25
OED	60:12	5,99	10,09	1,71
ODoD	62:12	0,64	1,19	1,91

Tabela 16. Composição do óleo de peixe em mono, di e triinsaturados (%mássica)

	Original	Refinado	Original/Refinado
Monoinsaturados	26,2	19,03	0,72
Diinsaturados	57,57	60,7	1,05
Triinsaturados	16,23	20,28	1,25
mono/di	0,46	0,31	
mono/tri	1,61	0,94	
di/tri	3,55	2,99	

Conforme a composição apresentada na Tabela 16, os triacilgliceróis diinsaturados são os componentes de maior concentração no óleo de peixe, representando 57%. E a razão (refinado/óleo original) para estes compostos é praticamente unitária. Este comportamento pode ser atribuído a natureza dos triacilgliceróis diinsaturados do óleo de peixe, por apresentarem massa molecular muito próximas. Esta característica parece diminuir a seletividade do CO₂ supercrítico como solvente. Para os triacilgliceróis mono e triinsaturados, foram obtidos uma razão (refinado/óleo original) de 0,72 e 1,25, respectivamente. Estes resultados indicam a possibilidade de se obter frações de concentrados em monoinsaturados na fase leve e triinsaturados na fase pesada.

5.7 Seletividade do CO₂ supercrítico para o fracionamento da gordura de babaçu

Para a gordura de babaçu, a seletividade β foi calculada para cada ácido graxo de sua composição. Os dados são mostrados na tabela 17.

Tabela 17. Valores de beta para o fracionamento de babaçu puro a 301,15 K e 7,8 MPa

Ácido Graxo	Original	Extrato	β
C8:0 – Cp	6,46	7,94	1,22
C10:0 – C	5,26	6,21	1,18
C12:0 – L	42,97	45,89	1,06
C14:0 – M	15,67	15,09	0,96
C16:0 – P	8,76	7,70	0,88
C18:0 – S	3,77	3,21	0,85
C18:1 – O	15,54	12,88	0,83
Outros	1,54	1,06	-

Observando-se os valores de β , verifica-se que a seletividade do CO₂ supercrítico diminui com o aumento do tamanho da cadeia de carbonos dos ácidos graxos. Compostos de cadeia curta, logo de baixa massa molecular tendem a ir para a fase leve como o C8:0, C10:0 e o C12:0 e os compostos de cadeia relativamente longa como o C14:0, C16:0, C18:0 e C18:1 tendem a ficar na fase pesada.

Hassan *et al.* (1999) verificaram comportamento semelhante estudando o fracionamento da palm kernel oil. Neste estudo, observaram que a composição do óleo extraído variava com o tempo, as primeiras frações eram ricas em triacilgliceróis de cadeia curta enquanto as últimas frações eram ricas em triacilgliceróis de cadeia longa e insaturados (C18:1) A altas pressões, o efeito de fracionamento diminui consideravelmente e as frações obtidas mostraram composição muito semelhantes.

6 CONCLUSÕES

A solubilidade do óleo de peixe mostrou ter forte dependência com pressão a temperatura constante. Este comportamento deve-se ao aumento da densidade do CO₂ supercrítico promovido pelo incremento da pressão, nas condições estudadas. As maiores solubilidades obtidas foram de 6,62, 6,97 e 7,06 g/kg a 29,4 MPa nas temperaturas de 323,15, 303,15 e 313,15, respectivamente.

Nas condições de temperatura e pressão estudadas, o dióxido de carbono supercrítico mostrou-se pouco efetivo para fracionar o óleo de peixe na forma de triacilgliceróis. O ácido eicosapentaenóico (EPA;C20:5 n-3) foi o composto que mostrou maior resistência ao fracionamento, sua seletividade foi praticamente unitária para todas as condições estudadas. A dificuldade de fracionamento pode ser atribuída à estrutura complexa e heterogênea do óleo de peixe, composta por muitos triacilgliceróis (36) de baixa concentração mássica, dos quais aproximadamente 57% são diinsaturados. Os triacilgliceróis diinsaturados oferecem resistência ao processo de fracionamento provavelmente por apresentarem massas moleculares muito próximas, o que parece diminuir a seletividade do CO₂ supercrítico como solvente.

Na condição a 7,8 MPa e 301,15 K (região de líquido comprimido) obteve-se dados interessantes de seletividade para o ácido mirístico (C14:0) e para o ácido docosahexaenóico (DHA) de 1,64 e 0,67, respectivamente, indicando a possibilidade de fracionamento nesta região.

O CO₂ no estado denso mostra-se capaz de fracionar outros tipos de óleos como, por exemplo, a gordura de Babaçu estudada neste trabalho. Para o qual os valores de seletividade apresentaram-se bem distintos da unidade. Compostos de cadeia curta tendem

a ir para a fase leve e os compostos de cadeia relativamente longa tendem a ficar na fase pesada.

A efetividade do CO₂ supercrítico em fracionar óleos depende da composição em triacilgliceróis da amostra. Óleos que apresentam frações distintas de triacilgliceróis quanto a composição em ácidos graxos e à porcentagem mássica parecem mais susceptíveis ao fracionamento.

O dióxido de carbono supercrítico é mais seletivo para triacilgliceróis de baixa massa molecular.

O babaçu não apresentou efeitos de co-solvência para o fracionamento de óleo de peixe com CO₂ supercrítico.

A composição em triacilgliceróis é determinante para predizer a possibilidade de fracionamento de um óleo com CO₂ supercrítico.

7 PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar a adição de co-solventes para o processo de fracionamento de óleo de peixe com CO₂ supercrítico;

Estudar o fracionamento do óleo de peixe na região de líquido comprimido, visto que foram obtidos dados interessantes de seletividade para o ácido mirístico (C14:0), e para o ácido docosahexaenóico (DHA) a 7,8 MPa e 301,15 K.

Estudar o fracionamento de óleos com frações distintas de triacilgliceróis quanto à composição em ácidos graxos e à porcentagem mássica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) ACKMAN, R. G., The Year of Fish Oil. **Chemistry and Industry** , v. 3, p. 139-145, 1988.
 - 2) ADAMS, M. K. Analysis of coffee: production and trade. **Allenton: Liquid Carbonic Industries Corporation**, p.1-30, 1991.
 - 3) ADLOF, R. O. e EMIKEN, E. A. The isolation of omega-3 polyunsaturated fatty acids and methyl esters of fish oils by silver resin chromatography. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.62, p. 1592-1595, 1985.
- AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats and waxes table of contents**, V.2, p. 54, 55, 60, 66, 71, 72 e 83, 1997.
- 4) AMERICAN OIL CHEMIST'S SOCIETY. **Sampling and Analysis of Commercial Fats and Oils Official Method**, v.1, 1997.
 - 5) ANKALAN, E. e MÜLLER, A. Extraction of caffeine and vanillin from drugs by supercritical carbon dioxide. **Pharmazie**, v.50, p.364-365, 1995.
 - 6) ANGUS, S.; ARMSTRONG B. REUCK, K. M. **International Thermodynamic Tables of the Fluid State: Carbon Dioxide**. 1.ed. London: Pergamon Press, 1976. v.3, p.385
 - 7) ARAÚJO, M. E. **Estudo do equilíbrio de fases para sistemas óleo vegetal/dióxido de carbono empregando equações de estado cúbicas**. Campinas, 1997. 314. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
 - 8) BAMBERGER, T.; ERICSON, J. C.; COONEY, C. L.; KUMMAR, S. K. **Journal of American Engineering Data**, v.33, p.327, 1988.
 - 9) BARATH, R.; INOMATA; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Phase Equilibrium study for the separation and fractionation of fatty oil components using supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.81, p.307-320, 1992.
 - 10) BARATH, R.; YAMANE, S.; INOMATA, H.; ADSCHIRI, T.; ARAI, K. Phase equilibria of supercritical carbon dioxide-fatty oil component binary systems. **Fluid Phase Equilibria**, v. 83, p. 183-192, 1993.
 - 11) BERGER, R. e MCPHERSON W. Fractional distillation. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 56, p. 744 A-746A, 1979

- 12) BORCH-JENSEN, C. e MOLLERUP, J. Phase equilibria of carbon dioxide and tricaprylin. **Journal of Supercritical Fluid**, v.10, P.87-93, 1997.
- 13) BROADHURST, C. L.; CUNNANE, S. C.; CRAWFORD, M.A. Rift Valley lake fish and shell fish provided brain-specific nutritiun for early Homo. **British Journal of Nutrition**, v. 2, p.757-761, 1998.
- 14) BROW, L. B. e KOLB, D. X. Application of low temperature crystallization in the separation of the fatty acids and their compounds. **Chemical Fats Lipids**, v.3, p.57-94, 1955.
- 15) BRUNETTI, L.; DAGHETTA, A; FEDELI, E.; ZANDERIGHI, L. Deacidification of olive oils by supercritical carbon dioxide. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.66, n.2, p. 209-217, 1989.
- 16) BURR, M. L.; FEHILY, A. M.; GILLBERT, J. F. et al. Effects of changes in fat, fish and fibre intakes on death and myocardial reinfartion: Diet and Reinfartion Trial (DART). **Lancet**, v.2, p.757-761, 1989.
- 17) CARLSON, S. E. e NEURINGER, M. Polyunsaturated fatty acid status and neurodevelopment: a summary and critical analysis of the literature, **Lipids**, v.34, p.171-178, 1999.
- 18) CHAO, R. R.; MULVANEY, S. J.; SANSON, D. R.; HSIEH, F. H.; TEMPESTA, M.S. Supercritical CO₂ extraction of annatto (Bixa Orellana) pigment and some characteristics of the color extracts, **Journal of Food Science**, V.56 n.1, p.80-83, 1991.
- 19) CHAWLA, P. e deMAN, J. M. Measurement of the size distribution of fat crystals using a laser particle counter. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.76, p.329-332, 1990.
- 20) CHRASTIL, J. Solubility of solids and liquids in supercritical gases. **The Journal of Physical Chemistry**, v.86, n.5, p.3016-3021,1982.
- 21) CLANDININ, M. T. Brain development and assessing the supply of polyunsaturated fatty acid. **Lipid**, v.34, p.131-137, 1999.
- 22) CONIGLIO, L.; KNUDSEN, K.; GANI, R. Model Prediction of Supercritical Fluid-Liquid-Equilibria for Carbon Dioxide and Fish Oil Related Compounds. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.34, p.2473-2483, 1995.

- 23) CONNOR, W. E. The beneficial effects of omega-3 fatty acids: cardiovascular disease and neurodevelopment. **Current Opinion in Lipidology**, v.8, p.1-3, 1997.
- 24) CONQUER, J. A. e Holub, B. J. Supplementation with Algae source of docosahexaenoic acid increases (n-3) fatty acid status and alters selected risk factors for heart disease in vegetarian subjects. **Journal of Nutrition**, v. 126, p. 3032-3039, 1996.
- 25) CYGNAROWICZ, M. L; MAXEWELL, R J.; SEIDER, W. D. Equilibrium solubilities of β -carotene in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.59, p.57-71,1990.
- 26) DEGNAN, A. J.; VON ELBE, J. H.; HARTEL, R. W. Extraction of annatto seed pigment by supercritical carbon dioxide, **Journal of Food Science**, v.56, n.6, p.1655-1659, 1991.
- 27) Di GIACOMO, G.; BRANDANI, V.; DeL RE, G.; MUCCIANTE. Solubility of essential oil components in compressed supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.52, p.405-411, 1989.
- 28) DUGO, P.; MONDELLO, L.; BARTLE, K. D.; CLIFORD, A. A.; BREWN, D. G. P. A. Deterpenação of sweet orange and lemon essential oil with supercritical carbon dioxide using silica gel as an absorbent. **Flavour and Fragrance Journal**, v.10 p.51-8, 1995.
- 29) EGGERS, R. High pressure extraction of oil seed. **Journal of American Oil Chemisty's Society**, v.62, n.8, 1985.
- 30) EI-BOUSTANI, S.; COLETTE, C.; MONNIER, L.; DESCOMPS, B.; PAULET, C. A.; MENDEY, F. Enteral absorption in man of eicosapentaenoic acid in different chemical forms, **Lipids**, v.22, p.711-714, 1987.
- 31) EISENBACH, W. Supercritical Fluid Extraction: a film demonstration, Ber. Bunsenges. **Physical Chemistry**, v. 88, p. 882-887, 1984.
- 32) EMKEN, E. A.; ADLOFF, R. O.; RAKOOF, W. K.; ROHWEDDER, R.; GULLEY, M. Metabolism in vivo of deuterium-labeled linolenic and linoleic acid in humans. **Biochemical Society Transactions**, v.18, p.766-769, 1990.
- 33) FARELO, F.; SANTOS, F.; SERRANO, L. Isobaric vapor liquid equilibrium in binary mixtures of α -pinene, limonene and 1,8-cineole. Canadian Journal of Chemical Engineering, v.69, p.794-798, 1991.

- 34) FERRARI, R. A. Estudo comparativo da composição lipídica do milho híbrido nutrimaiz com as cultivares genitoras. Campinas, 1992. Dissertação (Mestre em Tecnologia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 35) FERREIRA, S. R. S.; MEIRELES, M. A. A.; CABRAL, F. A. Extraction of essential oil of black pepper with liquid carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v.20, p.121-133, 1993.
- 36) FOSTER, N. R.; SINGH, H.; YUN, S. L. J.; TOMASKO, D. L. & MACNAUGHTON, S. J. Polar and non polar cosolvent effects on the solubility of cholesterol in supercritical fluids. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.32, p.2849-2853, 1993.
- 37) FRONING, G. W.; WEHLING, R. L.; CUPPETT, S. L.; PIERCE, M. M.; NIEMANN, L. & SIEKMAN, D. K. Extraction of cholesterol and other lipids from dried egg yolk using supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Science**, v.5, n.5, p.95-98, 1991.
- 38) GERARD, D. Continuous removal of terpenes from essential oils by countercurrent extraction with compressed carbon dioxide. **Chemical Industrial Technology**, v.56 n.10, p.794, 1984.
- 39) GERMER, S. P. M. **Extração de óleo essencial de cravo-da-índia em leito fixo com dióxido de carbono líquido subcrítico**. Campinas, 1989. 140p. dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, - Unicamp.
- 40) GIOIELLI, L. A.; PITOMBO, R. N. M.; PINHEIRO, A. M.; BALBO, A. M. T. M. water relation in freeze-dried powdered shortenings from Babassu fat. **Journal of Food Engineering**, v.37, p.411-421, 1998.
- 41) HAMAZAKI, T.; HIRAI, A.; TERANO, T.; SAJIKI, J.; KONDO, S.; FUJITI, T.; TAMURA, Y. KUMAGAI, A. Effects of orally administered ethyl ester of eicosapentaenoic acid on pig-like substances production by rat aorta. **Prostaglandins**, v.23 p.557-567, 1982.
- 42) HARALDSSON, G. G. e HOSKULSSON, P. A. The preparation of triglycerides highly enriched with n-3 polyunsaturated fatty acid via lipase-catalysed interesterification. **Tetrahedron Letters**, v.30, p.1671-1674, 1989.
- 43) HARRIS, W. S. N-3 fatty acids and lipoproteins: Comparison of results from human and animal studies. **Lipids**, v.31, p.243-252, 1996.

- HE, Y. e SHAHIDI, F. enzymatic esterification of w-3-fatty acid concentrates from seal blubber oil with glycerol. **Journal of American Oil Chemisty's Society**, v. 74, p. 1133-1136, 1997.
- 44) HORNSTRA, G.; AI, M. D. M.; Von Houwelingen, A.C.; Foreman-van Dorgelen, M. M. H. P. Essential fatty acids in pregnancy and early human development. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.61, p.57-62, 1995.
- 45) HUANG, F. H.; LI, M. H.; LEE, L. L.; STARLING, K. E.; CHUNG, F. T. H. An accurate equation of state for carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, V.18, n.6, p.490-496, 1985.
- 46) INOMATA, H.; KONDO, T.; HIROHAMA, S.; ARAI, K.; SUZUKI, Y.; KONNO, M. Vapour-liquid equilibria for binary mixtures of carbon dioxide and fatty acids methyl esters. **Fluid Phase Equilibria**, v.46, p.41-52, 1989.
- 47) IWAI, Y.; HOSOTONI, N.; MOROTOMI, T. *et al.* High pressure vapor equilibria for carbon dioxide + linanool. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.39, p.900-902, 1994.
- 48) WAI, Y. e MOROTOMI, T. *et al.* High-pressure vapor-liquid equilibria for carbon dioxide + limonene. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.41, p.951-952, 1996.
- 49) JAUBERT, J-N; CONIGLIO, L.; DENET, F. From the Corretation of Binary Systems Involving Supercritical CO₂ and Fatty Acid Esters to the Prediction of (CO₂-Fish Oils) Phase Behavior. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.38, p.3162-3171, 1999.
- 50) JOHANNSEN, M. e BRUNNER, G. Solubilities of the xanthines caffeine, theophylline and theobromine in supercritical carbon dioxide. **Journal of Fluid Phase Equilibria**, v.95 p.215-226, 1994.
- 51) JOHANNSEN, M. e BRUNNER, G. Solubilities of the fat-soluble vitamins A, D, E, and K in supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.42, p.106-111, 1997.
- 52) KALRA, H.; CHUNG, S.; Y-K.; CHEN, C-J. Phase equilibrium data for supercritical extraction of lemon flavors and palm oils with carbon dioxide. **Journal of Fluid Phase Equilibria**, v. 36, p.263-78, 1987.

- 53) KROMHOUT, BOSSCHIETER, E. B.; COULANDER, C. de L. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 340-345, 1985.
- 54) KROMHOUT, D.; FESKENS, E. J. M.; BOWLES, C. H. The protective effect of small amount of fish on coronary heart disease mortality in an elderly population. **International Journal of Epidemiology**, v. 24, p. 340-345, 1995.
- 55) LANDS, W. E. M. Fish and human health, **Academic Press**, Orlando, cap. 18, p. 138-148.
- 56) LAWS, D. R. J.; BATH, N. A.; ENNIS, C. S.; WHELDON, A. G. Hop extraction with carbon dioxide, US n.4, 218, 491, 1980.
- 57) LAWSON, L. D. e HUGHES, B. G. Human absorption of fish oil fatty acids as triacilglycerols, free fatty acids or ethyl esters. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.152, p.328-335, 1988.
- 58) LI, S.; VARADARAJAN, G. S.; HARTLAND, S. Solubility of Theobromine and caffeine in supercritical carbon dioxide. **Fluid Phase Equilibria**, v.68, p.263-280, 1991.
- 59) LIANG, J. H. e YEH, A. I. Process conditions for separating fatty acids esters by supercritical carbon dioxide, **Journal of American Oil Chemist's Society Journal of American Oil Chemists' Society**, v.68, n.9, p.687-692,1991.
- 60) LIONG, K. K.; FOSTER, N. R.; TING, S. S. T. Solubility of fatty acid esters in supercritical carbon dioxide. **Industrial Engineering Chemical Research**, v.31, p.400-404.
- 61) LORENZO, T.; SCHWARTZ, S. J.; KILPATRICK, P. K.; Supercritical fluid extraction of carotenoids from *Dunaliella algae*. In Proceeding of 2nd International Symposium on Supercritical Fluids, M.A. McHugh (Ed).p 297-298. Dept of Chem. Eng., Johns Hopkins, Baltimore, M.D, (1991)
- 62) MARCHIOLLI, R., grupo " Gissi". Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: results of the GISSI-Prevenzione trial. **Lancet**, v.355, p.447-455, 1999.
- 63) MAHESHWARI, P.; NIKOLOV, Z. L.; WHITE, T. M.; HARTEL, R. Solubility of fatty acids in supercritical carbon dioxide. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.69, n.11, p. 1069-1076, 1992.

- 64) MARQUES, D. S. **Desterpeação de óleo essencial de laranja por cromatografia preparativa de fluido supercrítico**. Campinas, 1996. 331 Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP.
- 65) MASUDA, K.; TAO, K.; IMAI, M.; SUZUKI, I. "Solubility of triolein in supercritical carbon dioxide by using continuous flow system and correlation with pressure, temperature and density". **Kagaku kogaku Ronbunshu**, v.26, n.6, p. 887-891, 2000.
- 66) MAUL, A. A. Situação atual e futuro da extração supercrítica, **Bio Tecnologia Ciência & Desenvolvimento**, ano 2, nº11, 1999.
- 67) MATOS, H. A.; Azevedo, E. G. de; Simões, P. C.; Carrondo, M. T.; Pontes, M. N. Phase equilibria of natural flavors and supercritical solvents. **Journal of Fluid Phase Equilibria**, v.52, p. 357-64, 1989.
- 68) MEIER, U.; GROSS, F.; TREPP, Ch. High pressure phase equilibrium studies for the carbon dioxide/ α -tocopherol (vitamin E) system. **Journal of Fluid Phase Equilibria**, v.92, p.289-302, 1994.
- 69) MEIRELES, M. A. e NIKOLOV, Z. L. Extraction of essential oil with liquid carbon dioxide, In: CHARALAMBOUS, G. (Ed.). **Spices, Herbs and Fungi: Development in Food Science**, Elsevier, v.34, p.171-199. 1994.
- 70) MENDES, R. L.; COELHO, J. P.; FERNANDES, H. L. et al. Applications of supercritical CO₂ extraction to microalgae and plants. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v.62, p 53-59, 1995.
- 71) MOHAMED, R. S.; SALDAÑA, D. A.; SOCANTAYPE, F. H.; KIECKBUSCH, T. G. Reduction in the cholesterol content of butter oil using supercritical ethane extraction and adsorption on alumina. **Journal of Supercritical Fluids**, v.16, p. 225-233, 2000.
- 72) NEWTON, I. e SNYDER, D. Nutritional aspects of long-chain omega-3 fatty acids and their use in bread enrichment. **Cereal Foods World**, v.42, n.3, p. 126-131, 1997.
- 73) NILSSON, W. B; GAUGLITZ, E. J. Jr; HUDSON, J. K. Solubility of methyl oleate, oleic acid, oleyl glycerols and oley glycerols mixtures in supercritical carbon dioxide. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.68, n.2, p. 87-91, 1991.

- 74) NILSSON, W. B. e HUDSON, J. K. Solubility of simple and mixed triglycerols in supercritical carbon dioxide, **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.70, n.8, p 749-754, 1993.
- 75) OLIVEIRA, A. L.; SILVA, S. S.; DA SILVA, M. A. P.; EBERLIN, M. N.; CABRAL, F. A. Sensory and yield response surface analysis of supercritical CO₂ extracted aromatic oil from roasted coffee. **Journal of Food Science and Technology**, v.38, n.1, p.38-42, 2001.
- OSADA, K.; NAKAMURA M.; NONAKA, M.; HATANO, M. Esterification of glycerol with EPA e DHA by *Chromobacterium viscosum* and *Cândida cylindracea* Lipases. **Journal of Japanese Oil Chemistry Society**, v.41, p. 39-43, 1992.
- 76) PACHECO, M. T. B. e BARRERA-ARELLANO, D. Fraccionamiento del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y su estabilización con antioxidantes. **Grasas y Aceites**, v.45, n.3, p.155-160, 1994.
- 77) PALMER, M.V. e TING, S.S.T. Applications for supercritical fluid technology in food processing. **Food Chemistry**, v.52, p.345-352, 1995.
- 78) RIBEIRO, M. A. e BERNARDO-GIL, M. G. Solubilities of triolein in supercritical CO₂. **Journal of Chemical Engineering Data**, v. 40, p.1188-1192, 1995.
- 79) RIHA, V. e BRUNNER, G. Separation of fish oil ethyl esters with supercritical carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, v.17, p.55-64, 2000.
- 80) RIZVI, S. S. H.; BENADO, A. L.; ZOLLWEG, J. A.; DANIELS, J. A. **Food Technology**, v.40, p. 55, 1986. *Apud*: Liang J.H.; YEH, A.I. Process condition for separation of fatty acids esters by supercritical CO₂, **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.68, n.9, p.687-692, 1991.
- 81) SAKAKI, K. Solubility of β -carotene in dense carbon dioxide and nitrous oxide from 308 to 323 K and from 9,6 to 30 MPa. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.37, n.2, p. 249-251, 1992.
- 82) SCHMIDT, e. B.; KRISTENSEN, S. D.; De CATERINA, R.; LINGWORTH, D .R. The effects of n-3 fatty acids on plasma lipids and lipoproteins and other cardiovascular risk factors in patients with hyperlipidemia. **Atherosclerosis**, v.103, p.107-121, 1993.

- 83) SHAHIDI, F. e WANASUNDARA, U. N. Omega-3 fatty acids concentrates: nutritional aspects and production technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 9, n.6, p. 230-240, 1998.
- 84) SHAW, P. e COLEMAN, R. L. Quantitative analysis of a highly volatile fraction from Valencia orange oil. **Journal of Agricultural & Food Chemistry**, v.19, n.6 p.1276-1278, 1971.
- 85) SHEKELLE, R. B.; MISSEL, L.V.; PAUL, O.; SHYROCK, A. M.; STAMLER, J. Fish consumption and mortality from coronary heart disease. **New England Journal of Medicine**, p.313-820,1985.
- 86) SILVA, G. F. **Extração de pigmentos do urucum com CO₂ supercrítico**. Campinas, 1999. 208 p. Tese (Doutor em Engenharia de Alimentos) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Unicamp.
- 87) SINGH, B.; NIAZ, M. A.; SHARMA, J. P.; KUMAR, R.; RASTOGI, V.; MOSHIRI, M. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of fish oil and mustard oil in patients with suspected acute myocardial infarction: the indian experimental of infarct survival. **Cardiovascular Drugs and Therapy**, v.26, p.778-782, 1997.
- 88) SIMOPOULOS, A. P.; KIFER, R. R.; ROY E. M. The Health Effects of Polyunsaturated Fatty Acids in Seafoods. **Academic Press**, 1986. Disponível em: <<http://www.homepage.montana.edu/~bchem280/omega.html>>. Acesso em: 29 Abril 2002
- 89) SKERGET, M.; KNEZ, Z. HABULIN, M. Solubility of β -carotene and oleic acid in dense CO₂ and data correlation by a density based model. **Fluid Phase Equilibria**, v.109, p.131-138, 1995.
- 90) SPANOS, G. A.; Chen, H.; Schwartz, S. J. Supercritical CO₂ extraction of β -carotene from sweet potatoes. **Journal Food Science**, v. 58 n. 4, p. 817-820, 1993.
- 91) STAHL, E. e GERARD, D. Solubility behavior and fractionation of essential oils in dense carbon dioxide. **Perfumer Flavorist**, v.10, p. 29-37, 1985.
- 92) STAHL, E. SCHUTZ, E.; MANGOLD, H. K. Extraction of seed oils with liquid and supercritical carbon dioxide. **Journal of Agricultural & Food Chemistry** v.28 p. 1153-1157, 1980.

- 93) STEMELLI, F.; CHEN, C. S.; BRADDOCK, R. J. Supercritical fluid extraction in citrus oil processing. **Food Technology**, v.42, n.6 p.145-150, 1988.
- 94) STOUT, V. F.; NIISSON, W. B.; KRZYNOWEK, J.; SCHLENK, H. Fractionation of fish oil and their fatty acids. In: **Fish oil in Nutrition**, New York, USA: Standby, M. E., ed., 1990, p. 73-119.
- 95) TAYLOR, L. T. **Supercritical fluid Extraction**, New York: Wiley-Interscience, p. 181, 1996.
- 96) TEMELLI, F.; EILEEN, L.; FU, L. Supercritical CO₂ extraction of oil from Atlantic mackerel (*scomber scombrus*) and protein functionality. **Journal of Food Science**, v.60, n.4, 1995.
- 97) TRAUTWEIN, E. A. n-3 fatty acids—physiological and technical aspects for their use in food. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.103, p.45-55, 2001.
- 98) TZAMTZIS, N. E.; LIODAKIS, S. E.; PARISSAKIS, G. K. The deterpenation of orange and lemon oil using preparative adsorption chromatography. **Flavor and Fragrance Journal**, v.5, p.57-67, 1990.
- 99) TORN-CHERN, C. e YI-HSU, J. Polinsaturated fatty acid concentrates form borage and linseed oil fatty acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.78, n.5, p.485-488.
- 100) UAUY, R.; PEIRANO, P.; HOFFMAN, D.; MENA, P.; BIRCH, E. Role of essential fatty acids in the function of the developing nervous system. **Lipids**, v.31, p.167-176, 1996.
- 101) VALSTA, L. M.; SALMINEN, A. A.; MUTANEN, M. Alpha-linolenic acid in rapeseed oil partly compensates for the effect of fish restriction on plasma long chain n-3 fatty acids. **European Journal of Lipid Science Technology**, v.50, p.229-235, 1996.
- 102) VASCONCELLOS, V. R. e CABRAL F. A. New Method for Estimating Solubility of Fatty Acids, Esters, and Triglycerides in Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Journal of American Oil Chemist's Society**, v.78, n.8, p.827-829, 2001.
- 103) VEGA, P. J.; BALABAN, M. O.; SIMS, C. A.; O'KEEFE, S. F.; CORNELL, J. A. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM. **Journal of Food Science**, v.61, n.4, p.757-759/765, 1996.
- 104) WANASUNDARA, U. N. e SHADINI, F. Positional distribution of fatty acids in triacylglycerols of seal blubber oil. **Journal of Food Lipids**, v.4, p. 51-64, 1997.

-
- 105) WEBER, W.; PETKOV, S.; BRUNNER, G. Vapour-liquid-equilibria and Calculations using the Redlich-Kwong-Aspen-equation of state for tristearin, tripalmitin, and triolein en CO₂ and propane. **Journal of Fluid Phase Equilibria**, v.160, p. 695-706, 1999.
- 106) WIJESUNDARA, R. C.; RATNAYAKE, W. M. N.; ACKMAN, R. G. Eicosapentaenoic acid geometrical isomer artifacts. **Journal of Journal of American Oil Chemist's Society**, v. 6, p. 1822-1830, 1989.
- 107) YANG, L. Y.; KUKSIS, A.; MYER, J. J. Lumenal hydrolises of menhaden and rapeseed oil and their fatty acid methyl and ethyl esters in the rats in the rats. **Biochemistry and Cell Biology**, v.67, p. 192-204, 1989.
- 108) YEH, A. I.; LIANG, J. H.; HWANG, L. S. Separation of Fatty Acids Esters from cholesterol in esterified natural and synthetic mixtures by supercritical carbon dioxide. **Journal of American Oil Chemist's Society**, v.68, n.4, p. 224-229, 1991.
- 109) ZOSEL, K. Process for recovering caffeine, US n.3, 806, 619, April 23, 1974.

9 ANEXOS

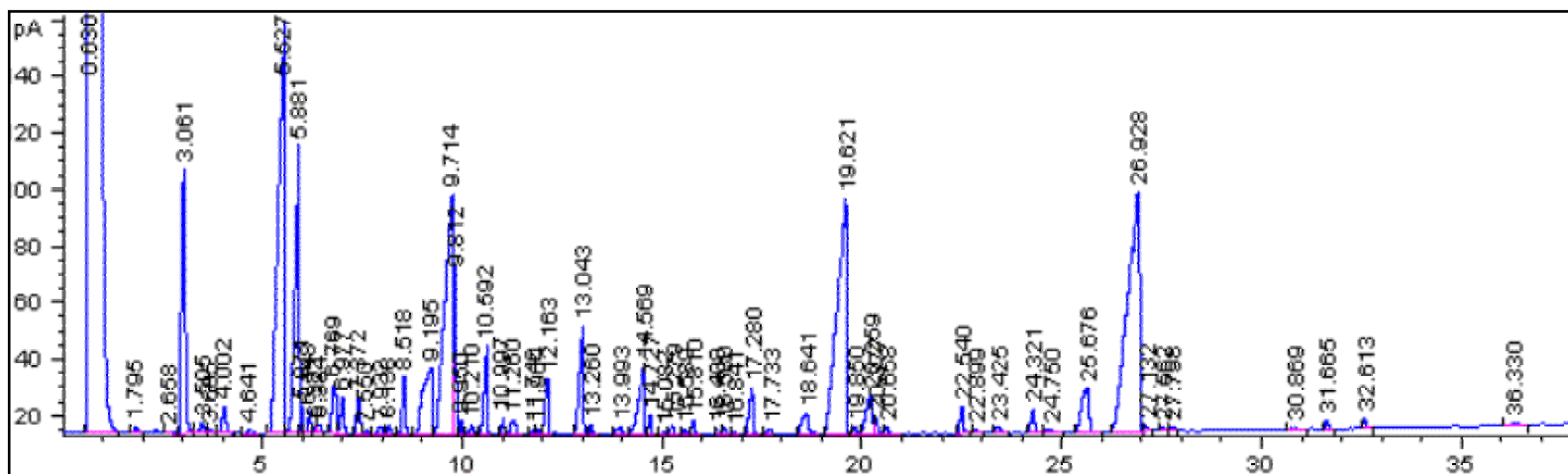


Figura A. Cromatograma da amostra original do óleo de peixe

Tabela A. Relatório de dados do cromatograma da amostra original de óleo de peixe

Pico	T. Retenção	%Area	Nome	Pico	T. Retenção	% Área	Nome	Pico	T. Retenção	%Area	Nome
1	1,795	0,085		23	9,812	2,285		45	17,733	0,105	
2	2,658	0,053		24	9,950	0,175		46	18,641	0,821	
3	3,061	6,135	C14:0	25	10,210	0,165		47	19,621	12,450	EPA
4	3,505	0,306		26	10,592	1,730		48	19,850	0,123	
5	3,685	0,112		27	10,997	0,224		49	20,259	1,370	
6	4,002	0,620		28	11,260	0,447		50	20,377	0,318	
7	4,641	0,094		29	11,746	0,119		51	20,658	0,113	
8	5,527	15,938	C16:0	30	11,904	0,098		52	22,540	0,507	
9	5,881	7,041	C16:1	31	12,163	1,100		53	22,899	0,067	
10	5,971	0,193		32	13,043	2,642	C18:3	54	23,425	0,225	
011	6,148	0,339		33	13,260	0,137		55	24,321	0,512	
12	6,323	0,084		34	13,993	0,254		56	24,750	0,109	
13	6,384	0,147		35	14,569	2,271		57	25,676	1,945	C22:5 n-3
14	6,769	1,243	C18:0	36	14,727	0,313		58	26,928	16,725	DHA
15	6,977	0,731		37	15,082	0,060		59	27,132	0,091	
16	7,372	0,818		38	15,279	0,181		60	27,562	0,516	
17	7,550	0,082		39	15,589	0,095		61	27,798	0,088	
18	7,932	0,242		40	15,81	0,295		62	30,869	0,055	
19	8,138	0,159		41	16,408	0,086		63	31,665	0,156	
20	8,518	1,091		42	16,580	0,151		64	32,613	0,159	
21	9,195	3,528	C18:1n-11	43	16,841	0,060		65	36,330	0,150	
22	9,714	10,856	C18:1 n- 9	44	17,280	1,007		66	38,489	0,052	

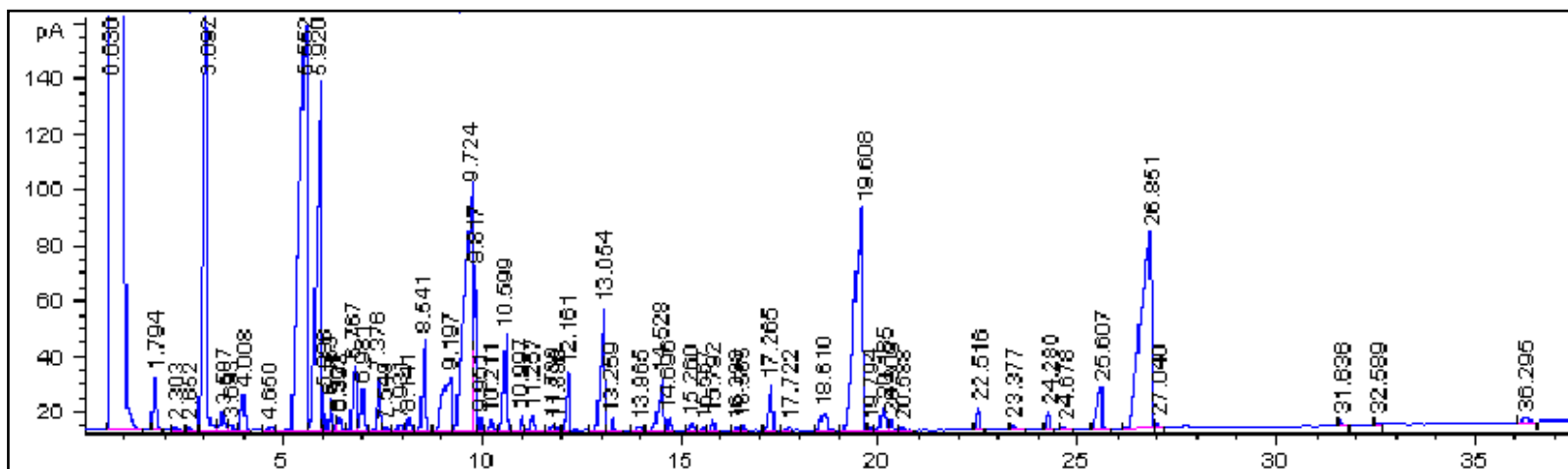


Figura B. Cromatograma do extrato no equilíbrio a 7,8 MPa e 301,15 K

Tabela B. Relatório de dados do cromatograma do extrato no equilíbrio a 7,8 MPa e 301,15 K

Pico	T. Retenção	%Area	Nome	Pico	T. Retenção	% Área	Nome	Pico	T. Retenção	% Area	Nome
1	1,794	1,084		21	8,541	1,708		41	16,398	0,078	
2	2,303	0,092		22	9,197	2,793	C18:1 n-11	42	16,565	0,115	
3	2,652	0,094		23	9,724	10,893	C18:1 n-9	43	17,265	0,920	
4	3,092	9,910	C14:0	24	9,817	2,142		44	17,722	0,071	
5	3,507	0,469		25	9,951	0,161		45	18,610	0,653	
6	3,693	0,200		26	10,211	0,186		46	19,608	11,687	EPA
7	4,008	0,839		27	10,599	1,850		47	19,794	0,070	
8	4,650	0,140		28	10,997	0,240		48	20,165	0,614	
9	5,552	17,418	C16:0	29	11,257	0,408		49	20,309	0,208	
10	5,920	9,451	C16:1	30	11,739	0,114		50	20,588	0,066	
11	5,998	0,247		31	11,896	0,085		51	22,516	0,411	
12	6,163	0,408		32	12,161	1,095		52	23,377	0,111	
13	6,327	0,149		33	13,054	2,940	C18:3	53	24,280	0,354	
14	6,393	0,207		34	13,259	0,157		54	24,678	0,060	
15	6,767	1,563	C18:0	35	13,965	0,150		55	25,607	1,275	C22:5 n-3
16	6,981	0,734		36	14,528	1,500		56	26,851	11,242	DHA
17	7,376	1,090		37	14,696	0,201		57	27,040	0,074	
18	7,549	0,099		38	15,260	0,144		58	31,636	0,073	
19	7,931	0,221		39	15,567	0,078		59	32,589	0,062	
20	8,141	0,234		40	15,792	0,205		60	36,295	0,138	

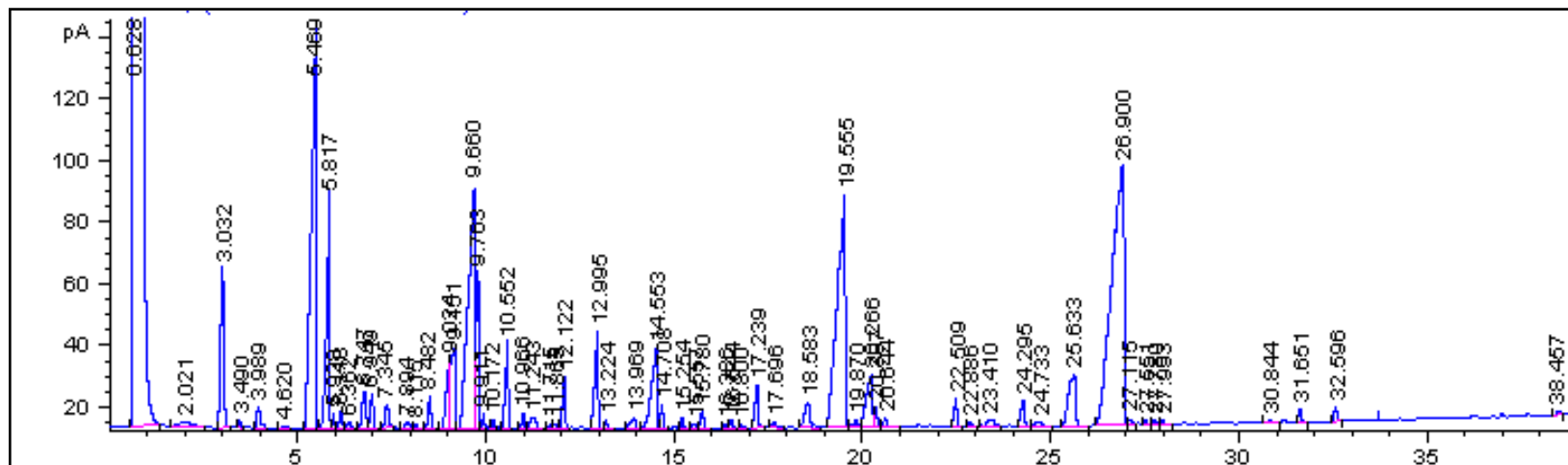


Figura C. Cromatograma do óleo residual do óleo a 7,8 MPa e 301,15 K

Tabela C. Relatório de dados do cromatograma óleo residual a 7,8 MPa e 301,15 K

Pico	T. Retenção	%Area	Nome	Pico	T. Retenção	% Área	Nome	Pico	T. Retenção	% Area	Nome
1	2,021	0,496		22	10,172	0,113		43	19,555	12,284	EPA
2	3,032	3,585	C14:0	23	10,552	1,650		44	19,870	0,220	
3	3,490	0,128		24	10,966	0,225		45	20,266	2,120	
4	3,989	0,486		25	11,243	0,453		46	20,387	0,437	
5	4,620	0,084		26	11,715	0,113		47	20,644	0,183	
6	5,470	14,231	C16:0	27	11,865	0,120		48	22,509	0,572	
7	5,817	5,021	C16:1	28	12,122	1,038		49	22,886	0,088	
8	5,928	0,166		29	12,995	2,264	C18:3	50	23,410	0,354	
9	6,118	0,326		30	13,224	0,116		51	24,295	0,640	
10	6,362	0,204		31	13,969	0,349		52	24,733	0,152	
11	6,747	0,984	C18:0	32	14,553	2,908		53	25,633	2,510	C22:5 n-3
12	6,949	0,738		33	14,708	0,368		54	26,900	21,32	DHA
13	7,345	0,568		34	15,254	0,195		55	27,115	0,122	
14	7,894	0,226		35	15,557	0,097		56	27,551	0,067	
15	8,115	0,095		36	15,780	0,359		57	27,780	0,120	
16	8,482	0,631		37	16,386	0,085		58	27,993	0,064	
17	9,024	1,960		38	16,544	0,166		59	30,844	0,084	
18	9,151	2,230	C18:1 n-11	39	16,800	0,086		60	31,651	0,253	
19	9,660	10,428	C18:1n-9	40	17,239	1,026		61	32,596	0,288	
20	9,763	2,470		41	17,696	0,146		62	38,457	0,078	
21	9,911	0,176		42	18,583	0,933					