

**OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO ÓLEO DO FÍGADO
DE TUBARÃO AZUL (Prionace glauca) E SUA
ESTABILIZAÇÃO COM ANTIOXIDANTES**

16/91

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO ÓLEO DO FÍGADO DE TUBARÃO
AZUL (Prionace glauca) E SUA ESTABILIZAÇÃO COM
Panccer ANTIOXIDANTES.

*Este exemplar corresponde a
redação final da Tese defen-
dida por Maria Teresa Bertol-
do Pacheco e aprovada Maria Teresa Bertoldo Pacheco
pela Comissão Julgadora Bióloga
em 28.06.91.*

Orientador: Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano

Campinas, 28 de junho de 1991.

HA

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de
mestre em tecnologia de Alimentos.

CAMPINAS

1991

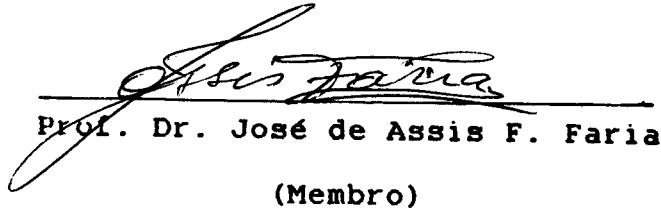
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Barrera Arellano
(Orientador)



Dr. João Shojiro Tango
(Membro)



Prof. Dr. José de Assis F. Faria
(Membro)



Prof. Dr. Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves
(Membro)

Campinas, 28 de junho de 1991.

Dedico

**Aos meus pais e ao
Hermes**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Daniel Barrera Arellano pela orientação, apoio e amizade recebidos durante a realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela concessão de bolsa para o cumprimento do mestrado.

A Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, pela oportunidade concedida.

Aos Profs. Valter Esteves e Lireny Ap. Guaraldo Gonçalves pelo apoio e sugestões no decorrer deste trabalho.

Ao prof. Emílio Contreras Gusman pela orientação inicial e amizade recebida.

Aos pesquisadores Alberto Ferreira Amorim e Carlos Alberto Arfelli, do Instituto de Pesca, pelas informações e fornecimento da matéria-prima.

Aos técnicos Roseli Ferrari e Renato Grimaldi pelo inestimável auxílio durante a realização do trabalho experimental.

A bibliotecária Creuza Cazume Nomura pelo auxílio na preparação das referências bibliográficas.

Aos meus familiares, em especial a Carolina, Juliana, Alex e Luzinete pelo auxílio e incentivos.

Aos meus amigos de pós-graduação, funcionários e todos aqueles que de uma maneira ou de outra contribuirão para a realização deste trabalho.

A Associação Brasileira das Indústrias de Alimentos, ABIA, pela gentileza das cópias.

Índice de Tabelas.....	IV
Índice de Figuras.....	VI
Resumo.....	VIII
Summary.....	IX
 I. INTRODUÇÃO.....	 1
 II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	 6
Fígado de tubarão.....	6
Uso e importância dos óleos marinhos.....	7
Características e componentes do óleo de fígado de pescado....	8
Ácidos graxos.....	10
Triacilgliceróis.....	13
Não-glicerídios.....	15
Obtenção do óleo de fígado.....	16
Refinamento do óleo bruto de fígado.....	19
Invernização.....	20
Degomagem.....	20
Neutralização.....	21
Branqueamento.....	21
Desodorização.....	22
Armazenagem.....	22
Técnicas de fracionamento de óleo.....	23
Fracionamento à seco.....	25
Fracionamento com detergente.....	26

Fracionamento com solvente.....	26
Fracionamento com inclusão de uréia.....	27
Autooxidação.....	28
Iniciação.....	29
Propagação.....	30
Terminação.....	31
Decomposição de hidroperóxidos.....	33
Reações oxidativas de ácidos graxos polinsaturados.....	34
Antioxidantes.....	39
Antioxidantes primários.....	40
Sinergistas.....	43
Antioxidantes em óleo de pescado.....	45
Medidas da autooxidação.....	46
Índices de estabilidade ou resistência à oxidação.....	47
 III. MATERIAL E MÉTODOS.....	 52
Material.....	52
Matérias primas.....	52
Reagentes.....	52
Equipamentos.....	52
Métodos.....	55
Métodos analíticos.....	55
Composição centesimal do fígado.....	55
Caracterização.....	55
óleo bruto.....	55
Oleína e estearina.....	59
Estudo da estabilidade oxidativa.....	60

Procedimento de limpeza.....	61
Procedimento experimental.....	62
Preparação da amostra.....	62
Fracionamento do óleo bruto.....	63
Adição de antioxidantes ao óleo e suas frações.....	66
 IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	 70
Composição centesimal do fígado.....	70
Extração do óleo.....	70
Caracterização e composição.....	72
óleo bruto.....	72
Fracionamento do óleo bruto.....	75
Oleína e estearina.....	82
Composição em ácidos graxos.....	83
Estabilidade oxidativa do óleo bruto e suas frações.....	86
 V. CONCLUSÕES.....	 98
 VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 99

Tabela 1. Desembarque de tubarões pelos barcos atuneiros no porto de Santos (SP).....	2
Tabela 2. Desembarque de tubarões em vários estados.....	3
Tabela 3. Comercialização de carne de tubarão pela CEAGESP de Cananéia e São Paulo.....	5
Tabela 4. Comparação das características físicas do óleo de fígado de bacalhau e algumas espécies de tubarão.....	11
Tabela 5. Composição em ácidos graxos (%) do óleo de fígado de algumas espécies de pescados.....	12
Tabela 6. Composição dos antioxidantes avaliados na estabilização do óleo de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações.....	53
Tabela 7. Nome e concentração dos antioxidantes adicionados ao óleo de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>).....	69
Tabela 8. Composição centesimal do fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>).....	71

Tabela 9. Algumas características do óleo bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>).....	73
Tabela 10. Composição do óleo bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>).....	74
Tabela 11. Conteúdo de sólidos (SFC) do óleo de fígado de tu- barão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações.....	77
Tabela 12. Algumas características das frações estearina e oleína do óleo de fígado de tubarão azul (<u>Prio- nace glauca</u>).....	78
Tabela 13. Composição de ácidos graxos do óleo de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações.....	81
Tabela 14. Composição em ácidos graxos saturados, monosatu- rados e poliinsaturados do óleo bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações....	81
Tabela 15. Períodos de indução (PI) das amostras de óleo bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações.....	88

Figura 1. Modelo de elongação do ácido linolênico.....	14
Figura 2. Autoxidação do linolenato via radical livre.....	32
Figura 3. Autoxidação do linolenato via oxigênio singlet.....	32
Figura 4. Rotas de decomposição dos hidroperóxidos de lipídios.	35
Figura 5. Mecanismo de oxidação do araquidonato.....	36
Figura 6. Diperóxidos formados a partir da autoxidação do lino- leato e linolenato.....	38
Figura 7. Mecanismo de ação antioxidante do BHT.....	42
Figura 8. Determinação gráfica do período de indução.....	50
Figura 9. Descrição esquemática do equipamento Rancimat.....	51
Figura 10. Fluxograma de elaboração do óleo de fígado de tu- barão	64
Figura 11. Programa de temperatura utilizado no fracionamento do óleo de bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>).....	65

Figura 12. Vista frontal do módulo de fracionamento.....	67
Figura 13. Vista lateral do módulo de fracionamento.....	67
Figura 14. Cromatograma dos ácidos graxos do óleo de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e frações.....	83
Figura 15. Estabilidade oxidativa do óleo bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações.....	86
Figura 16. Efetividade de antioxidantes naturais na estabili- zação do óleo bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações.....	89
Figura 17. Efetividade de antioxidantes sintéticos na estabi- lização de óleo bruto de fígado de tubarão azul (<u>Prionace glauca</u>) e suas frações.....	92

RESUMO

O fígado de tubarão azul (Prionace glauca) foi escolhido para este estudo por ser uma espécie amplamente distribuída ao longo da costa brasileira e a mais representativa no volume de captura de tubarões na costa das regiões sul e sudeste .

Foram realizados estudos sobre a composição centesimal do fígado e a caracterização dos componentes da fração lipídica. O óleo bruto foi fracionado a seco e tanto o óleo bruto como suas frações (oleína e estearina) foram avaliados quanto a estabilidade oxidativa. Testou-se a eficiência dos antioxidantes Butil hidroxitolueno (BHT), Terc-butil hidroquinona (TBHQ), Palmitato de ascorbila (PA), ANTRACINE 220 (TBHQ + Ác. cítrico), TOCOMIX D (α - e γ - Tocoferóis) e RENOXAN A (Palmitato de ascorbila + Lecitina + α -Tocoferol) em várias concentrações, utilizando o Rancimat 617 (Metrohm).

O óleo bruto, como suas frações mostraram-se muito instáveis devido a seu alto teor de ácidos graxos polinsaturados. A concentração em ácidos polinsaturados ômega-3 foi de 28,15% no óleo bruto integral, 23,97% na estearina e 32,84% na oleína, sendo a estabilidade oxidativa inversa ao conteúdo de polinsaturados.

O antioxidante TBHQ mostrou-se o mais eficiente em retardar a rancidez oxidativa, tanto do óleo bruto como nas frações, nas condições do teste (80°C; 2,5g de amostra; 20 L/h de fluxo de ar). Dentre os antioxidantes naturais o RENOXAN A mostrou-se eficiente, sendo no entanto inferior ao TBHQ.

SUMMARY

Blue shark (Prionace glauca) liver was chosen for this study as it is a largely distributed species along the Brazilian coast and also the most representative in volume of the sharks captured, along the south and southeast coast.

Studies on the liver proximate composition and characterization of the components of lipid fraction were conducted. The crude oil was dry fractionated and both the oil and its fractions (olein and estearin) had their oxidative stability evaluated. The efficiency of the following antioxidants: Butylated hydroxytoluene (BHT), Tertiary butylhydroquinone (TBHQ), Ascorbil palmitate, ANTRACINE 220 (TBHQ + Citric acids), TOCOMIX D (γ - and α - Tocopherols) and RENOXAN A (Ascorbil palmitate + Lecitin + α - Tocopherol) were tested, in various concentrations, using the Rancimat 617 (Metrohm).

The crude oil and its fractions were very unstable, due to their high contents of polyunsaturated fatty acids. The concentration of omega-3 polyunsaturated fatty acids was 28,15% in the whole crude oil, 23,97 in stearin and 32,84% in olein. The oxidative stability was inversely related to the content of polyunsaturated fatty acids. Tertiary butylhydroquinone was the most efficient antioxidant in retarding oxidative rancidity in the crude oil, as well as in the fractions, in the experimental conditions used (80°C; 2,5g sample; 20 L/h air flow). Samples with the natural antioxidants, RENOXAN A presented also high efficiency, being, however, lower than TBHQ.

I. INTRODUÇÃO

Dentre os óleos comestíveis disponíveis a nível mundial, os óleos marinhos constituem uma proporção significativa (2 a 3%), sendo de maior importancia comercial aqueles obtidos de peixes gordos, tais como arenque, "pilchard", "menhaden" e anchova. Segundo estatísticas da FAO (1986), aproximadamente um terço da captura mundial de pescado, é usado especificamente para produção de alimentos e de óleos. Contudo, o óleo pode também ser extraído do fígado de certos peixes magros, tais como bacalhau, linguado e tubarões, que possuem grande quantidade de lipídios, geralmente mais de 50% e são ricos em vitaminas A e D (SONNTAG, 1979).

No Brasil, como em vários outros países, existe um grande volume de captura de tubarões pelos barcos atuneiros que operam em alto mar. Em vista deste potencial, despertou-se o interesse no desenvolvimento desta pesca e ao mesmo tempo, no aproveitamento integral do pescado (AMORIM, ARFELLI e BRAGA, 1987; SLOSSER, 1983).

Nos últimos anos, a captura de tubarões pelos barcos atuneiros sediados em Santos (SP), tem merecido atenção pelo volume que representa, sendo que o tubarão azul (Prionace glauca) apresenta o maior volume dentre as espécies capturadas (Tabela 1). No entanto esse fato não é isolado, pois vem ocorrendo em várias Unidades da Federação (Tabela 2). A avaliação do potencial de tubarões da costa nordeste do Brasil (SUDENE, 1983), no período de 1976 à 1979, evidenciou o tubarão como um recurso em fase inicial de exploração e concluiu que a produção máxima sustentável na

TABELA 1. Desembarque de pescados e tubarões pelos barcos atuneiros no porto de Santos (SP), em ton/ano.

PESCADOS	1977/1982	1983	1984	1985	1986	1987
TOTAL DE PESCADOS	1631	1700	1694	1278	1559	1315
TOTAL DE TUBARÕES	424	680	796	653	650	603
TOTAL DE TUBARÃO AZUL (<u>Prionace glauca</u>)	---	---	553	462	423	400

Fonte: AMORIM e ARFELLI, 1990.

TABELA 2. Desembarque de tubarões* por estado em ton/ano.

ESTADOS	1978	1979	1980	1981	1982	1983	1984	1986	1987
AMAPA	15	10	20	24	20	27	21	39	155
PARA	1490	1694	1838	2253	1876	1900	1973	2036	2110
MARANHAO	1759	1232	1622	1613	1802	1829	1739	1190	1124
PIAUI	122	100	111	108	114	85	39	42	22
CEARA	779	562	484	509	402	386	345	395	337
RIO GRANDE DO NORTE	332	192	229	292	281	207	221	229	197
PARAIBA	77	53	26	26	23	29	66	656	20
PERNAMBUCO	25	36	26	34	40	159	194	180	223
ALAGOAS	32	93	41	54	45	52	59	43	35
SERGIPE	22	25	26	21	19	17	55	81	19
BAHIA	438	853	701	670	932	974	851	955	1078
ESPIRITO SANTO	320	279	380	354	502	484	583	491	361
RIO DE JANEIRO	683	672	665	538	585	702	666	496	465
SAO PAULO	719	864	1316	2177	852	3100	2856	3075	4001
PARANA	323	317	319	256	151	120	171	151	91
SANTA CATARINA	4624	6075	3838	3784	3455	3880	3380	3941	4042
RIO GRANDE DO SUL	6019	2455	3965	6519	10610	7444	4158	5365	6741
TOTAL	17779	15512	15607	19232	21709	21395	17377	19365	21021

Fonte: IBGE

* Peso do pescado integral

costa nordeste seria em torno de 30 mil ton/ano.

Os valores levantados pela CEAGESP das cidades de São paulo e Cananéia, sobre a comercialização de carne de tubarão (cação) nestes locais no período de 1980 a 1985, podem ser observados na Tabela 3. Comparando-se as Tabelas 1 e 3, observa-se pelos volumes comercializados de carne de tubarão (toneladas), que a captura oriunda de outras artes de pesca, é muito superior à captura realizada pelos barcos atuneiros. Portanto esses dados reforçam a necessidade de pesquisas sobre a utilização do fígado destas espécies, que possui grande quantidade de óleo, contribuindo para a valorização de sua exploração e no direcionamento de suas aplicações tecnológicas.

Nesse sentido torna-se impreterível estudar a estabilização deste óleo, uma vez que os ácidos graxos que compõem os triglicéridos de óleos de pescados marinhos, são muito instáveis e susceptíveis à oxidação.

**TABELA 3. Comercialização anual da carne de tubarão* pela
CEAGESP de Cananéia e São Paulo.**

CIDADE	1980	1981	1982	1983	1984	1985
SÃO PAULO	4330	4844	4915	4832	4237	5071
CANANÉIA	--	--	--	118	174	206

Fonte: AMORIM e ARFELLI, 1985.

* Toneladas de peixe eviscerado, sem cabeça e sem nadadeiras.

II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

FÍGADO DE TUBARÃO

Os tubarões pertencem à classe elasmobrânquios, caracterizada pelo esqueleto cartilaginoso, ausência de bexiga natatória, escamas placóides, nadadeira caudal com o lobo superior mais desenvolvido que o anterior (heterocerca), e presença de órgão de fecundação derivado das nadadeiras ventrais (STORER e USINGER, 1971). Estes animais existem há mais de 300 milhões de anos (Era Primária), sendo encontrados nas águas oceânicas de todo o mundo. Algumas espécies podem migrar para águas doces de rios tropicais e outras vivem permanentemente em lagos e rios. Os tubarões azuis são classificados na ordem Pleurotremata, sub-ordem Galleoidea, família Carcharhinidae e gênero Prionace (SUZUKI, 1986). Possuem o corpo alongado, o focinho longo e pontudo, sendo amplamente distribuídos por todos os mares temperados e tropicais. São encontrados ao longo de toda a costa brasileira, sendo conhecido também por lombo-preto, mole-mole e focinhudo; habitam águas superficiais e chegam a atingir 383 cm de comprimento (AMORIM, ARFELLI e GADID, 1986).

Os tubarões como peixes cartilaginosos, não possuem bexiga natatória sendo obrigados a permanecerem em constante movimento para não afundarem (SUZUKI, 1986). A densidade média do fígado está relacionada com a quantidade de lipídios nele contido, sendo que o alto teor de óleo permite que estes animais flutuem com maior facilidade na coluna d'água, atuando como um órgão hidrostático (VAN VLEET, 1984). O tamanho e o peso do fígado va-

riam em função da espécie, da idade e da estação do ano, mas quase sempre correspondem a um quinto do seu peso total e podem acumular até 90% em óleo. (KREUZER e AHMED,1978).

USO E IMPORTANCIA DOS ÓLEOS MARINHOS

Os óleos de fígado de pescados são usados como óleos medicinais, na preparação de concentrados vitamínicos para fortificação de alimentos e em combinação com outros nutrientes em rações animais (SUZUKI, 1972; LOONEY,1975). O Brasil importa óleo de fígado de bacalhau e de outros pescados de vários países, tais como Alemanha, Reino Unido, Noruega, Islândia, Países Baixos, França e Japão (CACEX,1989).

Nos últimos anos o interesse pelos lipídios de origem marinha aumentou consideravelmente, sendo que o ano de 1985 ficou conhecido no meio científico como o ano do auge dos óleos marinhos (SIMOPOULOS,1986). O interesse nos ácidos graxos ω -3 iniciou com o resultado de estudos epidemiológicos realizados por mais de vinte anos, em esquimós da Groenlândia, que apresentavam um baixo índice de doenças isquêmicas do coração (5,3%), comparados as populações ocidentais (39,7%). Atribuiu-se esse benefício a ingestão de dietas ricas em ácidos graxos ω -3, proveniente dos lipídios de animais marinhos, que posteriormente vieram a ser comprovado em estudos específicos com estes componentes (BEEBE, BROW e TURCOTTE,1989; HEAR,1989; HARRIS,1989).

Os óleos marinhos ou concentrados de ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) administrados em humanos, resultam principalmente

na diminuição dos níveis de triacilgliceróis e colesterol do sangue (BEARE-ROGERS,1988). Experimentos com ratos mostraram que óleos de pescado apresentam efeito imediato na redução do nível de colesterol no sangue, enquanto os óleos vegetais, como o óleo de milho, surtem efeito após duas semanas. Observa-se que após quatro semanas o nível de colesterol chega à metade da redução obtida com óleo de pescado (STANSBY,1982). Nos últimos anos, as enfermidades vasculares têm sido apontadas como as principais causas de morte da população de grandes centros urbanos de todo o mundo (KINSELLA,1988). Vários comitês internacionais, médicos, especialistas em doenças vasculares e em nutrição, com o objetivo de tentar reduzir a ocorrência de doenças cardiovasculares, enfatizaram a importância de ingerir óleos marinhos e produtos de pescado que são ricos em ácidos graxos polinsaturados ômega-3 (SINGER et alii, 1983; HEROLD e KINSELLA,1986).

Outros efeitos benéficos, resultantes da ingestão de lipídios marinhos, foram observados em certas doenças inflamatórias, tais como psoríase (doença na pele), asma, artrite reumática e certos tipos de câncer. Resultados de tratamentos clínicos de psoríase realizados nos EUA e África do Sul indicam que, em alguns casos, o efeito com o tratamento à base de óleo de pescado é superior a outros tratamentos convencionais (BARLOW,1987).

CARACTERÍSTICAS E COMPOSIÇÃO DO ÓLEO DE FÍGADO DE PESCADO

Os óleos de fígado de pescado têm sido produzidos de fígados de muitas espécie, tais como o bacalhau, atum, arenque, linguado,

tubarão e bonito (TANIKAWA,1985). Geralmente o óleo é obtido de espécies que têm seu maior depósito de gordura no fígado, e apresentam ao redor de 1% de gordura no tecido muscular (peixes magros). Atualmente o óleo de fígado de bacalhau é o principal do grupo, por causa de seu alto conteúdo vitamínico (SUZUKI,1972; SONNTAG et alii,1979).

As diferenças entre o óleo de pescado e óleo de fígado são muito difusas, pelo fato do fígado ser um órgão de reserva, podendo conter índices mais elevados de determinados compostos, tais como vitaminas, álcoois alifáticos de cadeia longa e esteres do glicerol (BRODY, 1965; LAMBERTSEN,1972). No estudo comparativo dos ácidos graxos realizado por LAMBERTSEN (1972), com algumas espécies de peixes marinhos, foi encontrada uma média mais alta de ácidos graxos monoinsaturados nas amostras de óleo de fígado e valores maiores de polinsaturados nos lípidios do músculo.

De acordo com STANSBY (1981), é característico destes óleos apresentar grande variedade de ácidos graxos e ácidos graxos de cadeia longa com 20 a 22 átomos de carbono, altamente insaturados (5 a 6 duplas ligações) de natureza ômega-3. Os ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) característicos de peixes marinhos, têm origem no fitoplâncton unicelular e algas que fazem parte da sua cadeia alimentar (REICHWALD,1976).

As características do óleo do fígado de duas espécies de tubarão, o Carcharias taurus e Sphyrna diplana das costas da Nigéria, foram investigadas por BANJO (1979), que comparou-as com as do óleo de fígado de bacalhau comercial e concluiu que existem similaridades entre os mesmos. Algumas dessas comparações estão

listadas na Tabela 4.

ÁCIDOS GRAXOS

A composição do óleo de fígado de peixes marinhos é similar a dos lipídios marinhos, com elevado conteúdo de ácidos graxos altamente polinsaturados de cadeia longa (C20:5 e C22:6), e ácidos monoinsaturados como o C16:1, C20:1, C22:1, sendo que diferenças típicas ocorrem dependendo da espécie. Como na maioria dos animais, o ácido palmítico (C16:0) é o predominante entre os saturados, sendo que os ácidos esteárico (C18:0), mirístico (C14:0) e margárico (C17:0) ocorrem em todos os óleos de peixes marinhos (ACKMAN, 1982; GRUGER, 1964). A composição em ácidos graxos do óleo de fígado de diferentes espécies tem sido publicada por vários autores (Tabela 5). A composição em ácidos graxos do óleo do fígado do tubarão azul, capturado nas costas da Sicília (Itália), foi investigada por SALVO et alii (1987) encontrando 35% em óleo e composição rica em ácidos graxos polinsaturados do tipo ômega-3.

Deve ser salientado que a composição em ácidos graxos do óleo de pescado está relacionada com fatores biológicos, tais como a espécie, idade, ciclo sexual, tipo e abundância de alimentos e temperatura da água (SAINCLIVIER, 1983; HAZEL, 1979). Segundo STANSBY (1982) a maioria das espécies têm rotas metabólicas que tendem a formar os lipídios dentro de um determinado padrão, que se torna típico para cada espécie. No entanto, esses padrões podem ser alterados pelas mudanças constantes na disponibilidade de alimentos. Outro fator que influencia na composição de ácidos

TABELA 4. Comparação de algumas características físicas e químicas do óleo comercial de fígado de bacalhau e de tubarão.

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	ÓLEO DE FÍGADO*	
	BACALHAU	TUBARÃO
ÍNDICE DE IODO	146,6 - 152,0	120,0 - 172,0
AC. GRAXOS LIVRES (%)	1,2	1,8
ÍNDICE DE PERÓXIDO (meq/Kg)	1,0	3,2
PONTO DE FUSÃO	17	4
ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	192,3 - 193,8	144,0 - 172,9
MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL (%)	1,8 - 2,0	8,0 - 15,3

* BANJO, (1979).

TABELA 5. Composição média (%) em ácidos graxos do óleo de fígado de algumas espécies de pescado.

ACIDOS GRAXOS	BACALHAU ¹ (<u>Gadus</u> <u>norhua</u>)	CAVALA ² (<u>Scomber</u> <u>scombrus</u>)	TUBARAO ³ (<u>Prionace</u> <u>glauca</u>)	TUBARAO ³ (<u>Squalus</u> <u>spp</u>)	TUBARAO ⁴ (<u>Centrophorus</u> <u>spp</u>)
C14:0	4.2	2.1	2.4	1.1	0.9
C14:1			0.1	0.1	
C15:0	0.6			0.6	0.4
C16:0	10.6	17.4	17.0	20.8	24.6
C16:1	9.5	6.2	3.7	3.8	3.8
C18:0	1.4	2.2	7.8	4.9	3.4
C18:1	21.1	31.6	21.2	29.9	22.6
C18:2	1.0	1.9	1.3	1.0	1.3
C18:3	0.4		0.8	0.9	0.3
C18:4	0.8	0.7	0.7	0.7	0.4
C20:1	19.0	4.2	4.8	5.2	0.1
C20:4	0.4		1.7	1.8	2.8
C20:5	9.5	7.9	7.1	7.0	2.1
C22:1	7.3	1.8	1.2	0.7	1.3
C22:5	0.6		1.9	1.0	0.7
C22:6	12.6	12.5	18.7	18.7	11.3
C24:1			2.1	1.5	
NI		11.8			

1 - GERBSHBEIN, 1969

2 - HARDY e KEAY, 1972.

3 - SALVO et alii, 1987

4 - PEYRONEL et alii, 1984.

graxos é a temperatura, sendo que em águas frias o teor de insaturações aumenta com a finalidade de manter a fluidez dos lipídios extracelulares. HARDY (1972) estudando a influência sazonal na composição química do óleo da cavala (Scomber scombus) durante o período de um ano, verificou que o maior teor de lipídios insaturados ocorreu no inverno.

Os ácidos graxos marinhos podem ser considerados derivados do ácido linolênico, por conservarem sua estrutura ômega-3, sendo os peixes capazes de alongarem e modificarem a cadeia de carbonos, adequando-a às suas necessidades. Um esquema condensado da elongação do ácido linolênico, conservando uma relação familiar entre eles é exemplificado na Figura 1 (ACKMAN,1979).

TRIACILGLICERÓIS

No óleo de fígado, como nos óleos de pescado, os triacilgliceróis representam a maior classe de lipídios (MIWA,1972; PICLET,1987). A composição triacilglicerólica é muito complexa, devido ao grande número de ácidos graxos altamente insaturados e de cadeia longa, sendo poucos os estudos detalhados sobre o assunto (PADLEY, GUNSTONE e HARDWOOD,1986; LOVE,1980). Num estudo sobre a distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis, sugere-se que existe um ácido graxo poliinsaturado ocupando a posição 2 e frequentemente um monoinsaturado (C16:1 ou C18:1) na posição 1, sendo que os ácidos graxos monoinsaturados de cadeia muito longa tendem a ocuparem a posição 3 (BROCKERHOFF et alii,1968; LITCHFIELD et alii,1978).

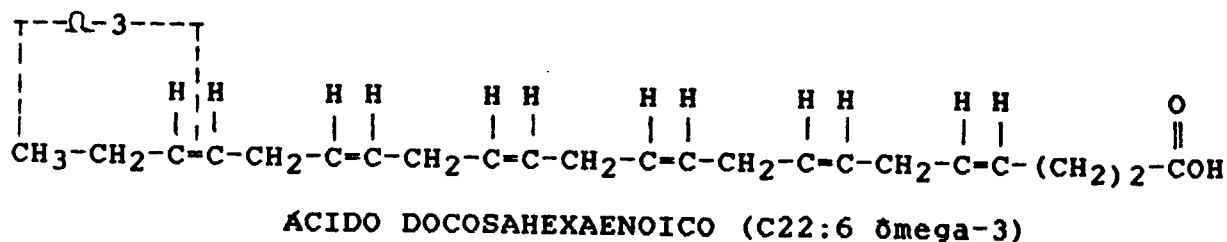
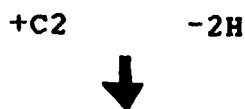
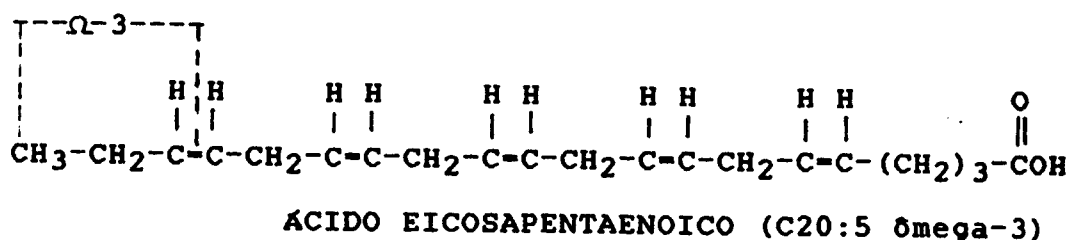
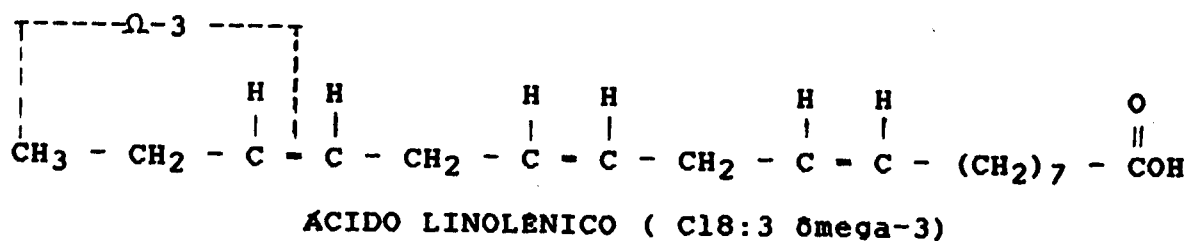


FIGURA 1. Modelo de elongação do ácido linolênico (ACKMAN,1979).

NÃO-GLICERÍDIOS

Todos os óleos e gorduras contêm pequenas quantidades de componentes não-glicerídios (inferior a 2%), sendo que no caso de alguns elasmobrânquios esse conteúdo pode ser superior ao dos triacilgliceróis, destacando-se os hidrocarbonetos, esteróis, pigmentos, ésteres de glicerol e vitaminas (PICLET, 1987; BRODY, 1965)

Geralmente os óleos de fígado apresentam hidrocarbonetos como constituintes, sendo que a quantidade varia de acordo com a espécie (SARGENT et alii, 1972). No óleo de fígado de bacalhau esse conteúdo é muito baixo, ao redor de 0.8% (MIWA, 1972). No entanto, o óleo de fígado de algumas espécies de tubarões que habitam a grandes profundidades são ricos em hidrocarbonetos, especialmente o esqualeno, podendo em algumas espécies perfazer até 80% da matéria insaponificável (BURANUDEEN e RAJADURAI, 1986; GOPAKUMAR e THANKAPDAN, 1986; PRESTON, 1984). Numa avaliação da composição química do óleo de sete espécies de tubarões do gênero *Centrophorus* do Mediterrâneo, PEYRONEL et alii (1984) encontraram que o esqualeno era o principal componente da matéria insaponificável, perfazendo de 49 à 89% do peso do óleo. A presença do esqualeno nos tubarões pode ser atribuída a sua baixa densidade ($0,8559 d_4^{25}$), auxiliando como agente de flutuação nestes animais (CRAICK, 1978; LOVE, 1980; GELPI e ORO, 1968; GERBSHBEIN e SINGH, 1969).

Os esteróis acompanhados das vitaminas lipossolúveis (A, E e D), são os principais componentes da fração insaponificável na

maioria dos óleos marinhos, sendo o colesterol o esteroide mais comum (LUNDBERG,1967). A vitamina A no pescados, advém de sua dieta, sendo as formas biologicamente ativas o retinol (A1) e o 3-dehidroretinol (A2). Em peixes marinhos predomina o retinol, sendo concentrado no fígado e acumulado com o avanço da idade (KINSELLA,1987). Antes das vitaminas A e D serem sintetizadas e produzidas comercialmente, os óleos de fígado de bacalhau eram as fontes mais importantes dessas vitaminas. No final da década de 1930 descobriu-se que o óleo de fígado de certos tubarões continham até 100 vezes mais vitamina A que o de bacalhau, tornando-se também fonte desta vitamina (RONSIALLI,1978). Com a produção da vitamina A sintética, a procura pelo produto natural decaiu muito, embora ele ainda seja importante por suas propriedades nutricionais e terapêuticas (BURMEISTER, 1968). O conteúdo de vitamina D em tubarões é muito reduzido, provavelmente pelo fato dele possuir esqueleto cartilaginoso (HERMSDORFF e PECKOLTO,1939).

Normalmente o teor de tocoferóis apresenta-se em torno de 300 ug/g, sendo predominante a forma alfa. O nível de tocoferóis pode variar em função da localização, maturidade sexual e fatores sazonais (ACKMAN, 1988a; LOVE,1980; SYVAYOJA et alii,1985).

OBTENÇÃO DO ÓLEO DE FÍGADO

Do ponto de vista tecnológico, o óleo de fígado é facilmente extraído, sendo possível realizar esse processo a bordo dos barcos de pesca (SHENOY e DEY,1984). No processamento do óleo, tanto

para fins farmacêuticos como comestíveis, o fator mais importante é a qualidade da matéria prima, recomendando-se retirar os fígados logo após a captura e processá-los o mais rápido possível (YONG,1982,). No método britânico, onde as embarcações demoram até três semanas para voltarem ao porto, os barcos são equipados para realizarem a extração do óleo do fígado de bacalhau em alto mar (AURE,1967). No entanto a preservação dos fígados à temperatura de 0°C com a exclusão do ar, é suficiente para protegê-los da deterioração por meses (BRODY,1965).

De acordo com o conteúdo lipídico do fígado, empregam-se diferentes métodos de extração, como os de cocção, digestão alcalina ou enzimática e com solventes. Para fígados com alto conteúdo de óleo (acima de 35%), geralmente se utiliza o método de extração por aquecimento através da injeção de vapor direto (Morton,1968). Os fígados são colocados inteiros em recipiente especiais de cozimento, sendo desintegrados com o próprio vapor que entra numa pressão de 25 psi, à temperaturas entre 90 a 95°C. O cozimento se realiza por um período de 15 minutos e posteriormente permanece mais 15 minutos numa pressão reduzida, cozinhando lentamente para separação das fases (óleo/massa protéica). O óleo sobrenadante é transferido para filtros e estocado em tanques (AURE, 1967). De acordo com KING (1984), a extração do óleo de fígado resulta em duas frações, uma primeira resultante do método tradicional de extração, e uma segunda fração obtida do resíduo protéico, o qual retem cerca de 30% de óleo. Nesse caso a massa protéica seria recozida com água à 80°C por 15 minutos liberando o óleo residual ocluído no tecido, de coloração escura, com alto

teor de ácidos graxos livres e de baixa qualidade, destinado à fabricação de sabões e tintas.

Algumas espécies marinhas tais como atum, linguado, salmão e baleia, possuem um menor teor de lipídios no fígado (menos de 25%), sendo que o uso do processo convencional de cozimento resultaria num baixo rendimento de extração. Nesse caso pode-se utilizar as técnicas de extração com solventes ou a digestão alcalina e/ou enzimática (BRODY,1965; MIWA,1972; BURMEISTER,1968).

Na digestão alcalina utiliza-se uma solução de hidróxido de sódio (1 a 2%) ou carbonato de sódio (2 a 5%) à 90°C, onde os fígados desintegrados permanecem por 1 hora sob agitação constante. As frações são separadas por centrifugação e o óleo é lavado com água e sal até que todo o alcali tenha sido retirado. O processo finaliza com a centrifugação e secagem do óleo.

Na digestão enzimática combinada com a alcalina, os fígados são moídos e adicionados do mesmo peso em água. A temperatura inicial de incubação é de 43 a 49°C e o pH é ajustado para 1,2 a 1,5, podendo-se utilizar pepsina comercial (0.05% em relação ao peso do fígado) por um período de 35 a 48 horas. A seguir o pH é ajustado para 9 com solução de carbonato de cálcio, ficando em digestão por uma hora à temperatura de 90°C. A seguir o óleo é separado por centrifugação, lavado e seco.

Na extração com solventes orgânicos, tais como éter de petróleo, hexano ou éter etílico, tanto pode se empregar a matéria prima crua ou cozida. O processo de extração com solventes com alto rendimento para fígados magros, consiste em colocar o fígado em autoclave a fim de romper o tecido e reduzir seu teor de umi-

dade, sendo a seguir extraído o produto seco, permitindo desta forma uma melhor penetração e umedecimento pelo solvente. Finalmente o extrato é filtrado e submetido a uma destilação a vácuo, para separar o solvente do óleo, o qual é re-usado no processo (AURE,1967). O uso de solventes apresenta uma série de desvantagens, como uma maior extração de pigmentos e produtos odoríferos, e os ácidos graxos livres tendem a permanecer no óleo, resultando um óleo escuro e viscoso (BRODY,1965).

REFINAÇÃO DO ÓLEO BRUTO DE FÍGADO

O processamento do óleo fígado de pescado é similar ao dos óleos vegetais, sendo que a qualidade do óleo bruto é menos uniforme que os vegetais (MIWA,1972). O objetivo do processo é retirar impurezas, substâncias insolúveis, ácidos graxos livres, pigmentos, ceras e odores indesejáveis presentes no óleo (STANSBY,1967). O refino químico para produtos comestíveis consta de quatro etapas: degomagem, neutralização, branqueamento, e desodorização (YONG,1982). Alguns passos do processamento podem ser adicionados ou eliminados, dependendo da qualidade do óleo desejada. Para produtos industriais normalmente o óleo é invernalizado, neutralizado e branqueado (CHANG,1967).

A técnica de destilação molecular empregada para obtenção de vitaminas é muito eficiente no refino de óleos de fígado de pescado. Nessa técnica o óleo é distribuído em filme numa superfície aquecida sob alto vácuo, e o óleo ou vitaminas que se destilam são condensados numa superfície resfriada (MIWA,1972). De acordo

com ACKMAN (1988a) o método também é eficiente na remoção de substâncias tóxicas (até 65%), como DDT (dicloro difenil tricloroetano) e PCB (policlorado bifenil) do óleo de fígado de bacalhau.

Invernalização

Na invernalização ocorre a cristalização de triacilgliceróis altamente saturados do óleo líquido, os quais são removidos por filtração. A técnica consiste em resfriar lentamente o óleo a temperaturas entre 0 a 6°C, podendo demorar desde horas até quatro dias, em função da composição do óleo.

Nesse processo o óleo é completamente fundido, bombeado em pequenos tanques com capacidade de até meia tonelada e submetido à baixa temperatura, sendo selecionada de acordo com as características e composição do produto. Finalmente a massa cristalizada é filtrada, utilizando-se um filtro prensa, onde efetua-se leve pressão, a fim de se obter uma fração sólida, com menos líquido retido.

O processo geralmente é conduzido antes da neutralização com alcali e o grau de invernalização depende mais do tempo de resfriamento à uma temperatura mínima do que a temperatura mínima empregada no processo (CHANG, 1967; LOONEY, 1975).

Degomagem

Esta etapa tem como finalidade remover os fosfolipídios e certos materiais mucilaginosos, com a adição de 2 a 3% de água quente ou uma solução aquosa de ácido bórico à temperatura entre

30 a 50°C. A goma hidratada é precipitada e separada do óleo por centrifugação (CHANG, 1967; KINSELLA, 1987).

Neutralização

Os ácidos graxos livres do óleo degomado são neutralizados com hidróxido de sódio (soluções de 1 a 6N) e removidos como sabões. O álcali é adicionado à temperatura ambiente com agitação, seguido por aquecimento do óleo até 60°C, formando uma borra (sabões) que é separada por centrifugação. O óleo neutralizado é lavado com 5 a 10% de água quente para remoção do sabão residual e centrifugado novamente (MIWA, 1972; KINSELLA, 1987, BRODY, 1965).

Branqueamento

Nesta etapa utilizam-se argilas naturais e/ou ativadas para remover pigmentos, produtos de decomposição oxidativa, traços de metais, fósforo e em menor quantidade compostos sulfurosos (YONG, 1982). As condições recomendadas para branqueamento do óleo de pescado utilizam de 0,25 a 0,50% de argila ativada à 80°C por 30 minutos, sob um vácuo de 15mmHg. Depois de resfriado a 60 - 70°C é submetido a filtração para remoção do adsorvente. Algumas plantas de refino realizam o branqueamento do óleo após sua hidrogenação (CHANG, 1967). Os óleos de fígado usados como fonte de vitaminas não passam por essa etapa, pois junto com os pigmentos seriam removidas as vitaminas (MIWA, 1972).

Desodorização

Com esse processo elimina-se os produtos odoríferos, gustativos e produtos oriundos da decomposição oxidativa, tais como aldeídos, cetonas, álcoois, compostos carbonílicos e diminui-se o conteúdo de ácidos graxos livres. Tradicionalmente a operação baseia-se na diferença de volatilidade dos compostos, realizada sob vácuo (2 a 8 mmHg), sendo que a temperatura utilizada varia de 190 a 230°C nos Estados Unidos e de 170 a 190°C na Europa. Normalmente o vapor utilizado corresponde 2 a 3% do peso do óleo por hora, num período de tempo que varia de 2 a 5 horas. A seguir o óleo é resfriado a 40°C antes de ser retirado do desodorizador (CHANG,1967; YONG,1982; KINSELLA,1987). Embora essas condições removam os componentes indesejáveis do óleo, muitas vezes o uso de temperaturas tão elevadas causam reações de isomerização e polimerização em óleos contendo ácidos graxos polinsaturados (CHANG,1967). Na tentativa de utilizar temperaturas mais baixas na desodorização destes óleos, para evitar a decomposição térmica e a polimerização, alguns pesquisadores tem proposto modificações nessa etapa (KARAHADIAN & LINDSAY,1988).

Armazenagem

A estabilidade do óleo é o principal determinante de sua qualidade. Para assegurar essa qualidade durante a estocagem, o óleo é armazenado em tanques de alumínio ou aço inox, sob atmosfera de nitrogênio ou dióxido de carbono a baixas temperaturas (KINSELLA,1987; HARDY,1979).

TÉCNICAS DE FRACIONAMENTO DO ÓLEO

O processo de fracionamento consiste numa separação termomecânica, na qual os componentes triacilgliceróis de óleos e gorduras com diferentes pontos de fusão são separados, por cristalização parcial em uma fase líquida . O processo ocorre em três estágios, ou seja:

1-Resfriamento do líquido e solidificação dos triacilgliceróis para que ocorra a nucleação.

2-Crescimento dos cristais a tamanho e forma que permitam uma separação eficiente.

3-Separação, isolamento e purificação das frações (THOMAS,1985).

De acordo com BIRKER e PADLEY (1987), a cristalização sempre se inicia por um processo de nucleação em um sistema não equilibrado, super resfriado ou super saturado. A taxa e o grau de resfriamento somado à velocidade de agitação empregada são parâmetros importantes, que determinam as taxas relativas de nucleação e crescimento do cristal.

A cristalização fracionada é descrita como um método lento de purificação, sendo que seu sucesso depende da pureza da matéria e do solvente aplicado. Na ausência de um solvente externo, considera-se os triacilgliceróis como o próprio solvente (TIR-TIAUX,1976). De acordo com BALTES (1975), os óleos e gorduras constituem um sistema muito complexo, composto por triacilgliceróis e uma série de componentes tais como ácidos graxos livres, água, fosfatídios, pigmentos, traços de metais e muitas outras

impurezas, que somadas a sua relativamente alta viscosidade, perturbam a cristalização. O fato das impurezas perturbarem o processo de fracionamento, torna-se evidente quando o óleo é fracionado antes e após a refinação física. No caso do fracionamento do óleo refinado, obtém-se maior rendimento da estearina em relação ao óleo no estado bruto (YONG,1987).

A formação de sólidos numa solução é um processo complicado na qual as moléculas primeiro devem entrar em contato, orientar-se, e então interagirem para formar estruturas altamente ordenadas. Em função dos diferentes arranjos de empacotamento molecular no cristal, a cristalização ocorre de tal modo que resulta num comportamento cristalino polimórfico. As três principais formas polimórficas são designadas alfa, beta-linha e beta, apresentando pontos de fusão característicos para um mesmo triacilglicerol (Nawar,1985).

A forma alfa resulta no mais baixo ponto de fusão, é a menos estável, passando rapidamente para a forma beta -linha. Geralmente é obtida em condições de resfriamento rápido e apresenta um aspecto ceroso.

A forma beta-linha é resultante de um resfriamento lento e da fusão e ressolidificação da estrutura alfa. Sua passagem para estrutura beta é mais difícil, pois isso envolve uma re-ordenação interna do empacotamento cristalino. Apresenta ponto de fusão intermediário entre as outras estruturas e um aspecto granuloso.

A modificação beta é obtida somente por cristalização lenta da gordura em solventes polares ou num resfriamento lento com a adição de núcleos de cristais na forma beta. Apresenta o menor

ponto de fusão e uma textura áspera e dura.

Devido à variedade e à distribuição dos ácidos graxos nos triacilgliceróis, algumas formas polimórficas são mais difíceis de se obter do que outras. De modo geral as gorduras com triacilgliceróis uniformes formam cristais de tamanho e forma semelhante, sem falhas ou defeitos na sua estrutura, resultando em cristais grandes e estáveis, na configuração beta. Entre as gorduras que tendem a se cristalizarem na forma beta destacam-se o óleo de soja, milho, girassol, manteiga de cacau e banha. No entanto, gorduras como óleo de palma, colza, gordura de leite e sebo tendem a produzir cristais beta-linha mais estáveis (NAWAR,1985).

Existem três métodos de fracionamento usados comercialmente: a seco, com detergente e com solvente. O fracionamento com inclusão de compostos de ureia é realizado, até o momento, apenas em escala de laboratório para preparação de produtos farmacêuticos.

Fracionamento a seco

Este método baseia-se na cristalização sob condições controladas de resfriamento, na ausência de solventes ou aditivos, onde os cristais se empacotam na forma beta-linha. A fração sólida (estearina) é separada da fração líquida (oleina) por filtração.

O processo de invernização é uma modalidade do fracionamento a seco e consiste em remover uma pequena quantidade de gordura sólida de uma grande quantidade de óleo líquido. O óleo de fígado de bacalhau (produzido na Grã-Bretanha) para uso medicinal

é invernalizado, à temperatura de 00C, e filtrado antes de ser desodorizado.

Fracionamento com detergente

Neste caso o óleo é cristalizado na forma beta, em presença de uma solução aquosa de detergente. Ocorre uma dispersão dos cristais na fase aquosa e a oleina é separada por centrifugação da solução aquosa com os cristais em suspensão. A suspensão é aquecida e novamente centrifugada, separando-se a estearina e a solução aquosa. Essa técnica é mais utilizada para ácidos graxos e apresenta a desvantagem das frações ficarem com traços residuais de detergente, sendo que em muitos países seu uso é vetado para fins alimentícios.

Fracionamento com solvente

O fracionamento com solventes seletivos ou não, baseia-se na diferença de solubilidade dos triacilgliceróis a uma certa temperatura. A cristalização portanto é conduzida em solvente onde o crescimento dos cristais é mais rápido com formas polimórficas mais estáveis, possibilitando um aumento na pureza das frações. As frações são separadas por filtração, e os solventes destilados. Os solventes mais utilizados são acetona, nitrometano, álcool isopropílico e álcool etílico. Apesar da eficiência do processo, devido ao alto investimento e custos de operação, tem sido pouco empregado em escala industrial.

Fracionamento com inclusão em uréia

A literatura específica de óleo de peixe referente à fracionamento, trata com maior ênfase da cristalização de ácidos graxos . A maioria dos trabalhos abordam técnicas de concentração de ácidos graxos polinsaturados, principalmente o docosahexaenoico (DHA) e o eicosapentaenoico (EPA; DOMART et alii,1955; NILSSON et alii,1988). A cristalização fracionada a baixas temperaturas, o fracionamento com solvente (propano) e a cristalização com a inclusão em uréia são alguns dos métodos usados capazes de remover os componentes mais saturados do óleo. No entanto a técnica de complexar os ácidos graxos ou seus ésteres com compostos de ureia, formando cristais, é a mais eficiente no sentido de concentrar os ácidos graxos polinsaturados (ABU-NASR,POTTS e HOLMAN,,1954; HAAGSMA et alii, 1982; ACKMAN, RATNAYAKE e OLS-SON,1988).

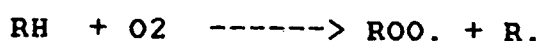
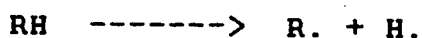
A técnica baseia-se no grau de insaturação, sendo que os ácidos graxos mais insaturados são menos incluídos nos aductos de uréia. RATNAYAKE et alii (1988) prepararam um concentrado de ácidos graxos ômega-3 via complexação com uréia em escala piloto, utilizando 40 Kg de óleo de peixe de várias espécies isoladamente, inclusive de fígado de tubarão (Squalus acanthias). Os autores obtiveram, independente do tipo de óleo, um concentrado com 69 a 85% de ácidos graxos polinsaturados totais e um rendimento de 17 a 20%.

AUTOXIDAÇÃO

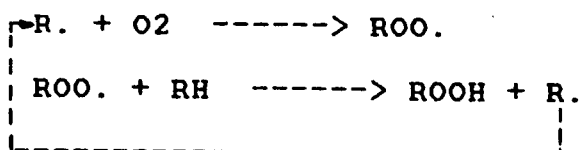
A autoxidação é a principal causa de deterioração dos alimentos de origem marinha, sendo que a oxidação de lipídios leva a mudanças no aroma, sabor e valor nutritivo dos alimentos, bem como a formação de sub-produtos indesejáveis, como malonaldeído e óxidos de colesterol que têm sido apontados como agentes cancerígenos (KHAYAT e SCHWALL, 1983; ADDIS, 1986).

Os óleos de pescado, embora se diferenciem quimicamente dos óleos vegetais e gorduras animais, se oxidam pelo mesmo mecanismo geral, iniciando-se com a formação de radicais livres derivados de ácidos graxos formando hidroperóxidos (STANSBY, 1982). O processo consiste numa reação auto catalítica em cadeia e pode ser dividido em três fases distintas:

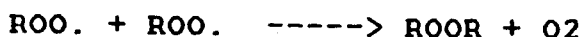
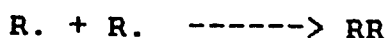
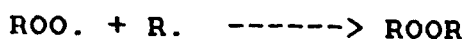
Iniciação



Propagação



Terminação



onde, RH = substrato (ácido graxo)

R. = radical de ácido graxo

ROO. = radical de peróxido

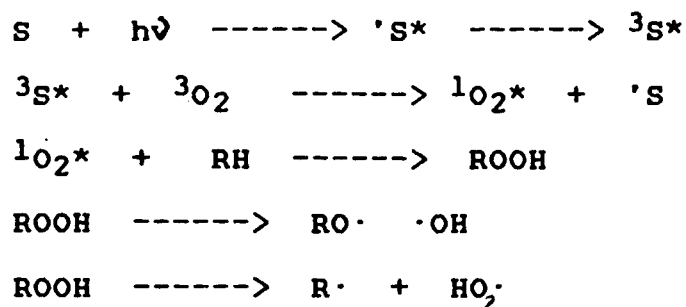
ROOH = hidroperóxido

Iniciação

Esta etapa é caracterizada pela formação dos primeiros radicais livres (R.) a partir do substrato (RH), iniciada por agentes catalizadores tais como, calor, luz, traços de metais, enzimas, compostos heme e peróxidos. O consumo de oxigênio é baixo e lento, conseqüentemente o nível de peróxidos também é baixo (DUGAN, 1976).

Os mecanismos de oxidação lipídica via radical livre proposto por BATEMAN (1954) são bem conhecidos e aceitos, no entanto existem controvérsias em relação à etapa de iniciação (KHAYAT e SCHWALL, 1983). A deterioração de óleos insaturados, ao contrário da oxidação térmica pode ser iniciada pela luz, na ausência de radicais livres. Substâncias cromóforas presentes no óleo, como corantes e pigmentos naturais (clorofila, feofitina, mioglobina, porfirinas e outros) absorvem fortemente a luz visível próximo ao ultra-violeta, acumulando energia (CARLSSON, SUPRUNACHUK e WILES, 1976). Ocorre então uma transferência energética para o oxigênio tripleto (mais estável), que passa ao estado singleto ativado, num nível mais alto de energia. Ele reage rapidamente com as duplas ligações, originando hidroperóxidos via molecular. Estes hidroperóxidos podem gerar-se a temperatura ambiente e iniciar a convencional reação em cadeia via radicais livres.

O mecanismo de ativação pela luz pode ser esquematizado da seguinte maneira (LABUZA,1971).



onde

S = sensibilizador em estado triplete

$h\nu$ = energia luminosa

1S = sensibilizador em estado singlete

${}^1S^*$ = sensibilizador em estado singlete excitado

${}^3S^*$ = sensibilizador em estado triplete excitado

3O_2 = oxigênio triplete

${}^1O_2^*$ = oxigênio singlete excitado

A velocidade das reações oxidativas do metil-linoleato na presença do oxigênio triplete é cerca de 10^3 a 10^4 vezes mais rápida do que na presença do oxigênio molecular (CARLSOON et alii,1976).

Propagação

O radical ($R\cdot$) formado reage com oxigênio para produzir um radical peróxido ($ROO\cdot$), o qual torna a reagir com uma molécula do substrato para produzir um novo radical ($R\cdot$) e uma molécula de hidroperóxido ($ROOH$). Os radicais livres repetem as etapas ante-

riores e desta forma a reação se propaga em cadeia.

Nesta etapa ocorre um rápido aumento do número de radicais peróxido, pelo fato dessa reação não requerer energia de ativação ($E_a = 0$ kcal; HARD, 1979). Hidroperóxidos resultantes da fotoxidação de ésteres de ácidos graxos foram isolados por TERAO e MATSUSHITA (1977). Eles detectaram que em todos os isômeros, os carbonos atacados pelo oxigênio eram aqueles que originalmente se localizavam ao lado das duplas ligações, sendo que as duplas eram deslocadas para a posição adjacente. Estudos com antioxidantes mostraram que a fotoxidação não foi inibida pelo BHT (inibidor de radicais livres), mas pelo beta-caroteno (sequestrador de oxigênio singlete). Estes resultados indicam que os mecanismos de oxidação pelo oxigênio singlete são diferentes da oxidação pelo oxigênio molecular. O mecanismo da autooxidação e fotoxidação do linoleato proposto por FRANKEL et alii (1977) são ilustrados nas Figuras 2 e 3.

Terminação

Nesta fase os radicais formados reagem entre si produzindo dímeros (RR) e oxipolímeros (ROOR), indicando que os radicais estão sendo eliminados da reação de propagação. Esta etapa é relativamente longa, geralmente persiste até que o substrato tenha sido completamente esgotado, podendo inclusive dar origem a polímeros (DUGAN, 1976).

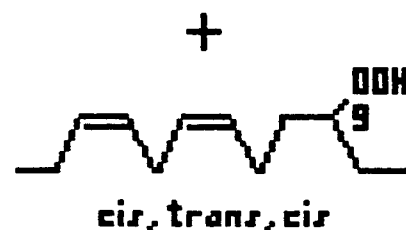
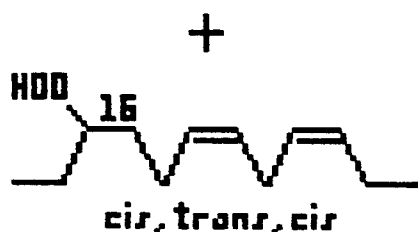
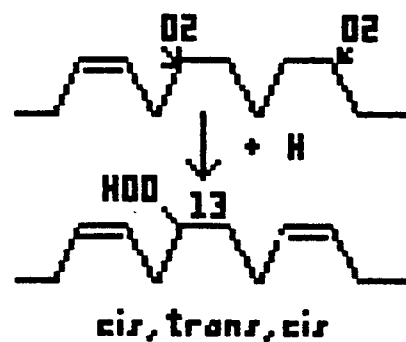
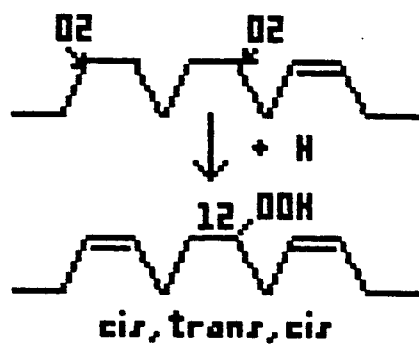


FIGURA 2. Autoxidação do linolenato via radicais livres.

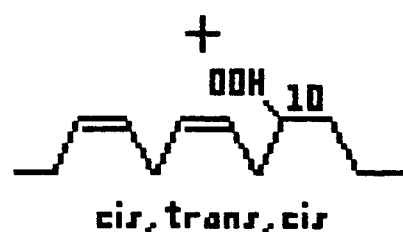
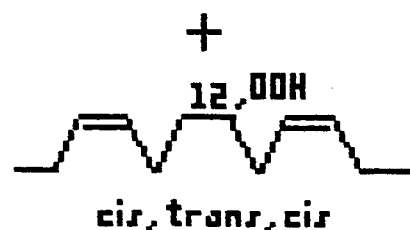
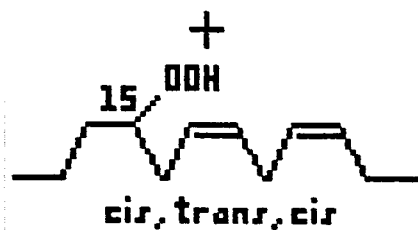
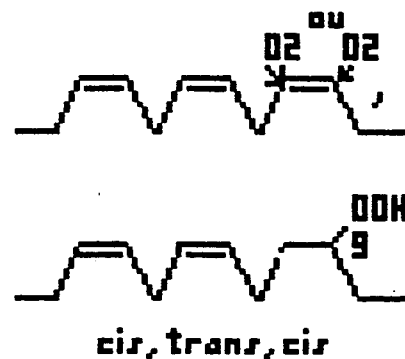
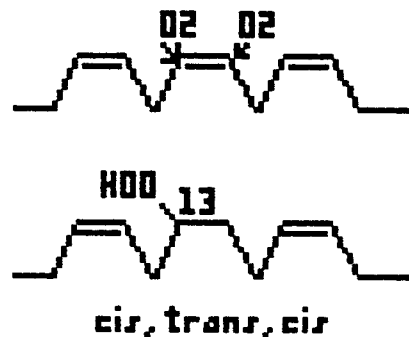
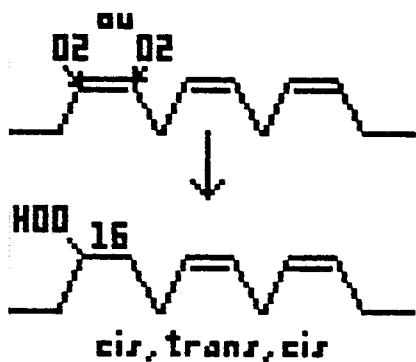
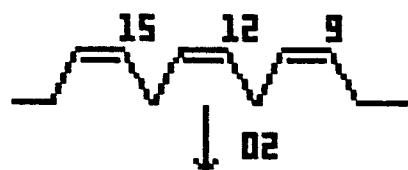
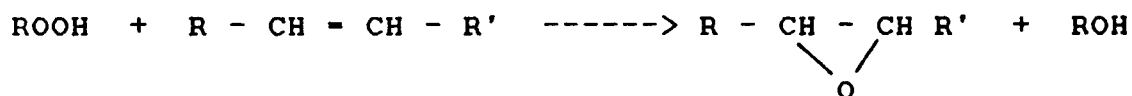
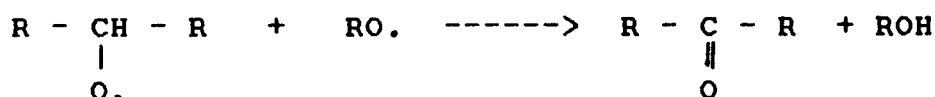
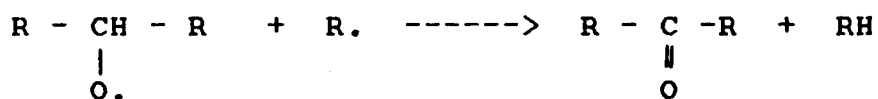
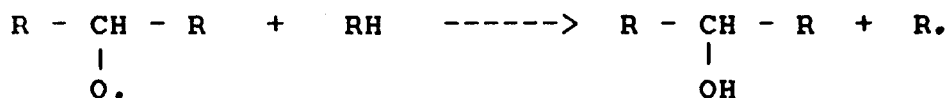
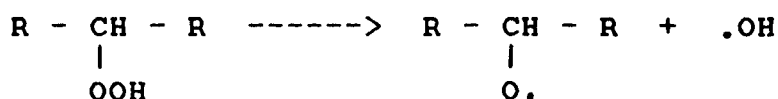


FIGURA 3. Autoxidação do linolenato via oxigênio singlet.

DECOMPOSIÇÃO DE HIDROPERÓXIDOS

Os hidroperóxidos são compostos altamente instáveis e produzem por quebra ou cisão, vários tipos de produtos secundários de reação, tais como compostos carbonílicos, álcoois, ácidos, hidrocarbonetos, cetonas e esteres. A decomposição dos hidroperóxidos via radical livre segundo KHAYAT e SCHWALL (1983) é esquematizada a seguir:



As diversas rotas de decomposição dos hidroperóxidos de lípidos, segundo GRAY (1978), podem ser observadas na figura 4. Os produtos voláteis formados, principalmente os aldeídos e cetonas são responsáveis pelo odor e sabor de rancidez nos óleos e gorduras (FRANKEL, 1985).

REAÇÕES OXIDATIVAS DE ÁCIDOS GRAXOS POLINSATURADOS

Em geral a susceptibilidade dos ácidos graxos ao ataque do oxigênio cresce com o aumento da insaturação e, uma vez que os óleos de pescado possuem ácidos graxos altamente insaturados, sua deterioração é mais problemática em relação à maioria dos óleos comuns (LUNDBERG, 1967). Esses ácidos graxos apresentam uma estrutura metileno interrompida, ou seja com grupos metilênicos entre as duplas ligações muito instáveis, que só se estabilizam quando passam a uma estrutura conjugada (STANSBY, 1982). Os principais sítios de ataque pelo oxigênio são os grupos metilênicos adjacentes à dupla ligação, onde os átomos de hidrogênio estão menos firmemente ligados do que os outros e são portanto facilmente eliminados.

Estudos do mecanismo da oxidação de alguns ácidos graxos em sistemas isolados foram estudados por vários autores com TERAO e MATSUSHITA (1977); CHAN et alii (1982); FRANKEL et alii (1977). Na autooxidação do ácido araquidônico foram isolados seis hidroperóxidos, derivados da abstração inicial de um átomo fixado ao carbono alílico de diferentes posições. O mecanismo da oxidação do araquidonato pode ser observado na Figura 5.

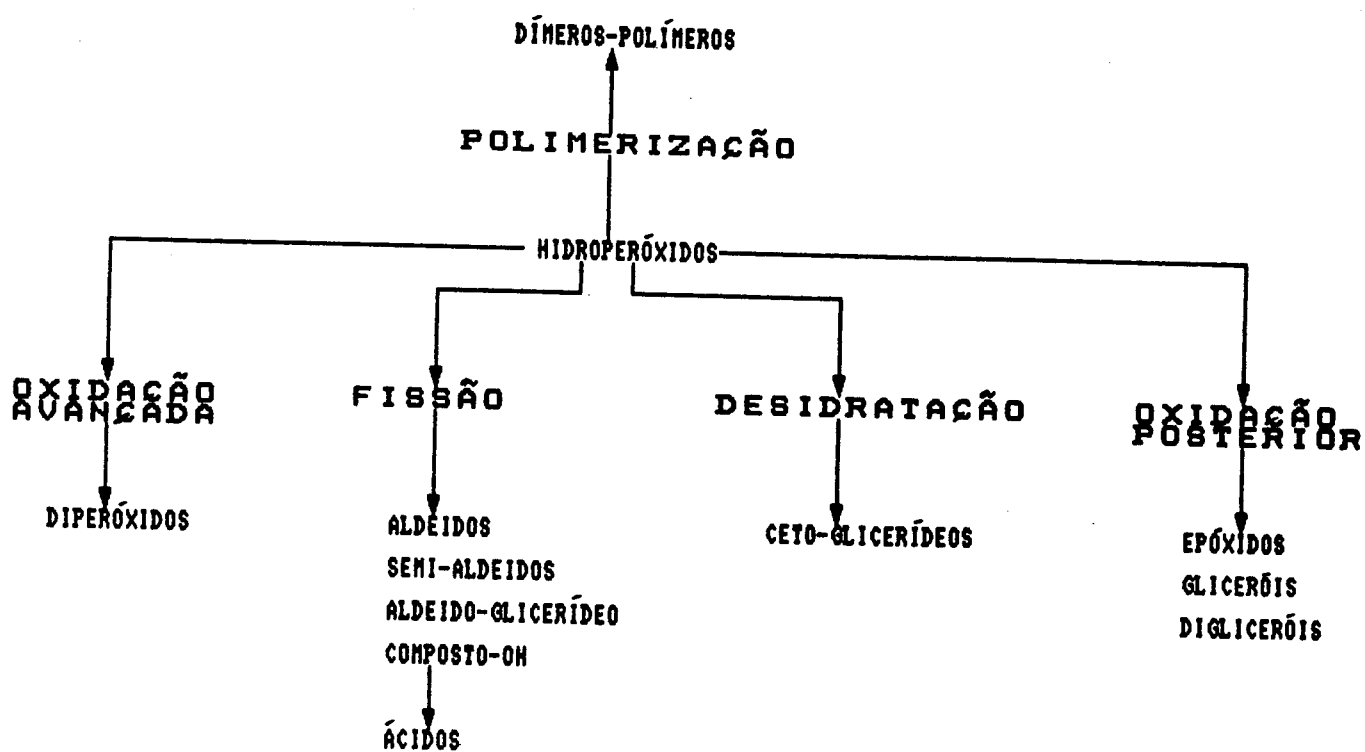


FIGURA 4. Rotas de decomposição dos hidroperóxidos (GRAY,1978).

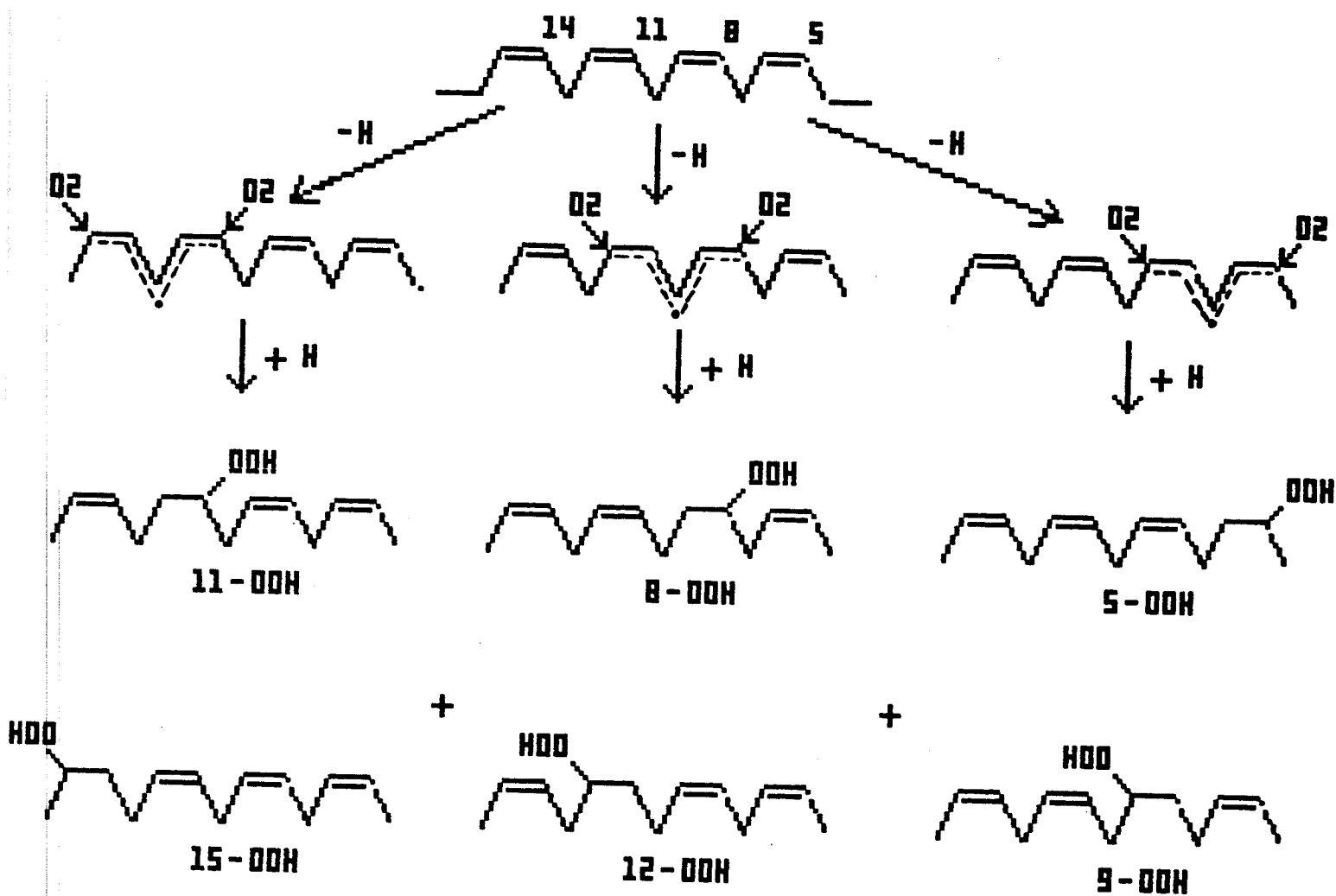
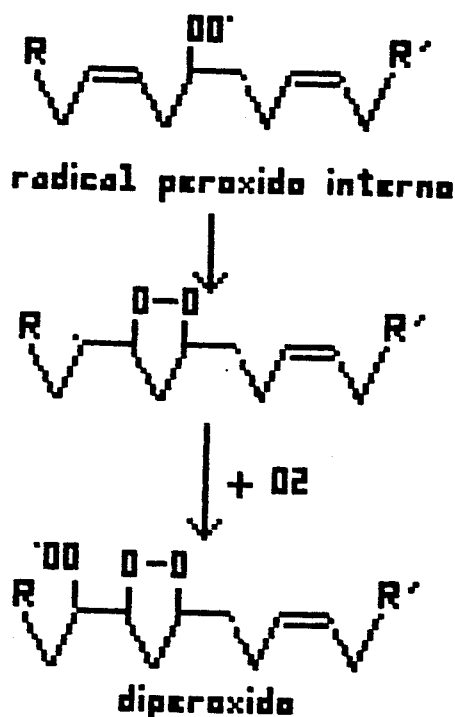


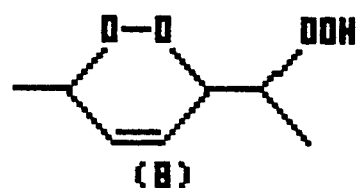
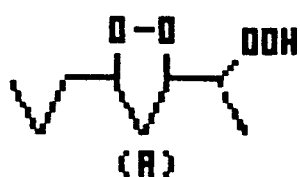
FIGURA 5. Mecanismo de oxidação do araquidonato.

A autoxidação de lipídios insaturados contendo mais que duas duplas ligações interrompida por dois grupos metilênicos, resulta tanto na formação de monohidroperóxidos isoméricos (cis-trans e trans-trans), como também numa mistura de diperoxídeos, os quais incorporam duas moléculas de oxigênio para formarem peróxidos cíclicos e hidroperóxidos (CHAN et alii, 1982).

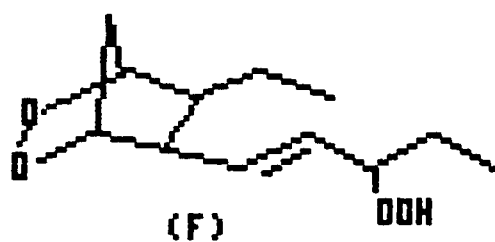
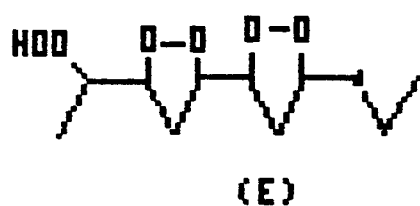
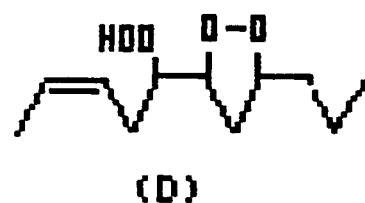
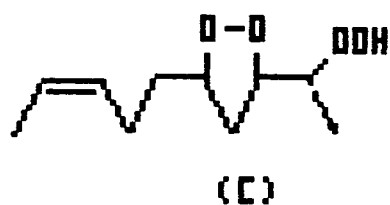


Os vários tipos de diperoxídeos formados a partir da autoxidação do linoleato e linolenato encontram-se na Figura 6 (FRANK, 1984).

Os produtos da autoxidação de ácidos graxos polinsaturados (PUFAS) em óleo de cavala, foram estudados por ACKMAN e LINKE (1975), pela combinação de duas técnicas cromatográficas. Os autores discutem as relações cinéticas entre a formação de deca-



Diperoxidos do linoleato fotooxidado



Diperoxidos do linolenato fotooxidado

FIGURA 6. Diperoxidos formados a partir da autoxidação do linoleato e linolenato.

trienais e o grau de autooxidação dos polinsaturados. HSIEH et alii (1989) caracterizaram os componentes voláteis responsáveis pelo odor de óleo de "menhadem" bruto, através de técnicas de espectroscopia de massa e cromatografia gasosa. Foram identificados 29 componentes voláteis, sendo que a maior parte eram resultantes da degradação oxidativa dos ácidos graxos polinsaturados. Dentre a série de ácidos voláteis com comprimento de cadeia variando de C2 a C6, o ácido butanóico foi o mais abundante.

ANTIOXIDANTES

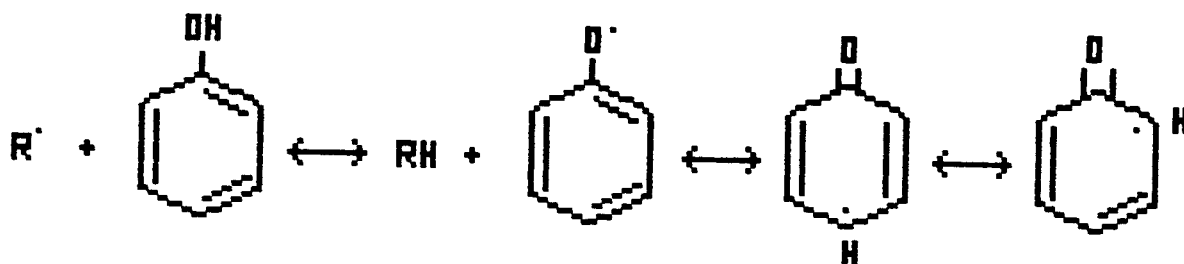
As gorduras oxidadas são muito prejudiciais quando utilizadas na alimentação, provocando tumores e alterações da pele em animais, além de destruir as vitaminas A, C, E, e B₆, ácidos graxos essenciais e o ácido pantotênico (RITTACO e LUCIANO, 1976). Segundo PICHE, DRAPER e COLE (1988) o malonaldeído excretado na urina serve como um indicador da peroxidação de lipídeos consumidos na dieta ou nos tecidos humanos, sendo apontado como agente mutagênico e carcinogênico. Em pesquisa, realizada pelo referido autor com óleo de pescados como fonte de ácidos graxos ômega-3, indicou que o consumo destes óleos não estabilizados pode ocasionar a ingestão de produtos potencialmente tóxicos.

As reações oxidativas podem ser retardadas com o uso de compostos que possuem atividade antioxidante. Estes compostos podem agir como bloqueadores de radicais livres, agentes quelantes, sequestrantes de oxigênio ou como estabilizadores de outras espécies catalíticas (DZIEZAK, 1986).

Inúmeras substâncias apresentam atividade antioxidante e conforme o seu modo de ação, essas substâncias são normalmente agrupadas como segue:

Antioxidantes primários

São aqueles capazes de reagir com radicais livres, fornecendo radicais de hidrogenio ($H\cdot$) para emparelhar os eletrons de modo que se obtenha um produto estável. Na maioria dos antioxidantes naturais ou sintéticos, esta atividade é atribuída a grupos amino e/ou fenólico (BUCK,1981). As estruturas fenólicas são capazes de estabilizar por ressonancia múltipla após a perda de hidrogenio. O mecanismo dos antioxidantes fenólicos em óleos vegetais segundo SHERWIN(1976), pode ser esquematizado como segue:



Para serem efetivos os antioxidantes devem ser adicionado o mais cedo possível , pois eles não reverterem a rancidez oxidativa e mostram-se menos efetivos quanto mais avançado se encontre o processo oxidativo. Um único antioxidante não oferece atividade adequada para todos os produtos alimentares. O que ocorre é uma seleção do antioxidante mais apropriado, determinado por sua compatibilidade em estabilizar o material específico (DZIE-

ZAK,1986).

Outro fator muito importante é a concentração empregada, se a dosagem ultrapassar ao limite considerado ótimo, pode ocorrer inversão do efeito e o composto vir a atuar como um pró-oxidante. Os requerimentos básicos de um antioxidante são: ausência de toxicidade; facilidade de aplicação; efetividade em baixas concentração; não contribuir com cor e sabor; estabilidade a altas temperaturas e custo moderado (OLCOTT,1967).

Os antioxidantes permitidos pela legislação brasileira, para serem adicionados a óleos são o ácido cítrico; ácido ascórbico; ácido fósfórico; butil hidroxitolueno (BHT); butil hidroxianisol BHA; terc-butil hidroquinona (TBHQ); citrato de monoisopropila; lecitinas (fosfolipídios, fosfatídios e fosfoluteinas); etileno-diamino tetracetato calcico (EDTA); tocoferóis; palmitato de ascorbila (PA); citrato de monoglicerídeos e galato de propila (PG), de duodecila ou de octila, segundo resolução nº 04/88 (ABIA,1988).

Vários compostos fenólicos têm sido empregados em óleos e gorduras comestíveis com a finalidade de prevenir a autooxidação dos lipídios, entre eles destacam-se o BHA, o BHT, o PG e o TBHQ (LAWSON,1985). O mecanismo de ação do antioxidante BHT é ilustrado na Figura 7.

O galato de propila tem sua aplicação limitada, devido à pouca solubilidade nas gorduras e baixa estabilidade térmica (THOMOPOULUS,1982). De acordo com SHERWIN(1967), tanto o BHT como o PG tem apresentado problemas relacionados com suas características de solubilidade em várias aplicações. No entanto o TBHQ

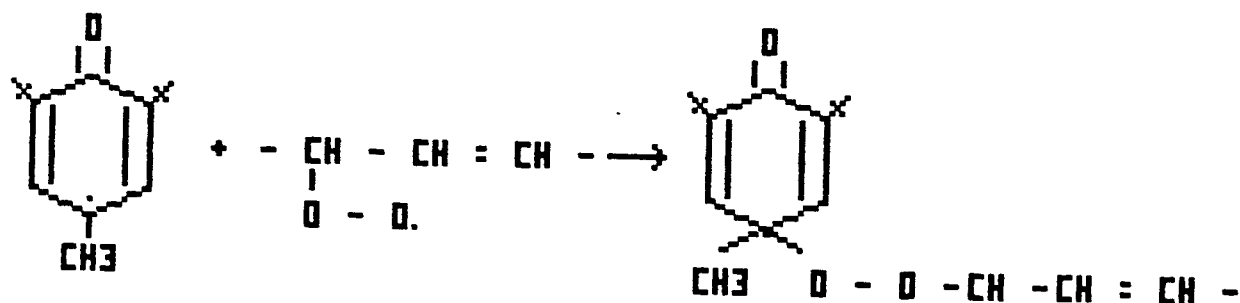
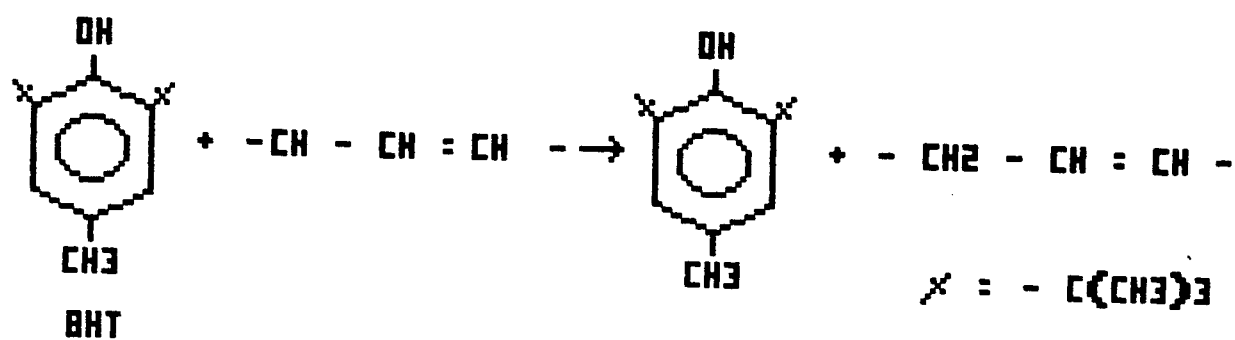


FIGURA 7. Mecanismo de ação antioxidante do BHT.

apresenta uma efetividade superior quando comparado ao BHA, BHT e PG em óleo de semente de girassol, que apresenta alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados.

O TBHQ oferece uma série de vantagens como antioxidante: apresenta uma atividade excepcional em óleos e gorduras altamente insaturadas; não apresenta descoloração na presença de ferro, não acrescenta odor ou sabor quando adicionado a óleos, gorduras e alimentos; pode ser combinado com outros antioxidantes para melhorar a efetividade da formulação (EASTMAN,1974).

SHERWIN e LUCKADOO (1970) estudaram o efeito de vários antioxidantes em inibir a degradação oxidativa de óleos vegetais brutos sujeitos a longo período de estocagem. Os autores avaliaram por medidas de peróxidos no óleo bruto estocado e testes de estabilidade no óleo posteriormente refinado e concluíram que óleos protegidos durante a estocagem com antioxidantes tais como o TBHQ e PG, produzem óleos refinados com estabilidade oxidativa inicial superior e com melhor resposta ao tratamento posterior com antioxidantes.

Sinergistas

São substâncias que associadas aos antioxidantes primários aumentam a eficiência destes, podendo atuar como: sequestrantes de íons metálicos, na regeneração de antioxidantes primários e ainda como inibidores da decomposição. Os sinergistas mais usados na indústria de alimentos são: ácido cítrico, ácido fosfórico, ácido tartárico, ácido ascórbico, polifosfatos e lecitinas (DZIEDZIC e HUDSON,1984).

Os fosfatídeos que se encontram naturalmente presente nos alimentos, podem exibir efeito antioxidante, provavelmente devido ao seu efeito sinergista com antioxidantes primários naturais (tocoferóis) ou adicionados (SHERWIN,1976). Este efeito sinérgico é observado principalmente a temperaturas elevadas, acima de 80°C, e como eles não são substâncias puras, sua atividade é determinada tanto pela quantidade como pelo tipo de fosfatídeo presente. Dentre a classe de fosfolipídios naturais, o fosfatidil inositol é o único que não apresenta atividade (DZIEDZIC e HUDSON,1984)

O palmitato de ascorbila (PA) atua absorvendo o oxigênio do meio em reação direta ou reagindo com hidroperóxidos já formados (BOURGEOIS,1981). O uso simultâneo do palmitato de ascorbila e tocoferol(200ppm) mostra maior efetividade antioxidante do que as substâncias isoladas. O PA mostrou-se efetivo na estabilização de óleo de girassol, sendo que, se adicionado em concentrações acima de 500ppm (solução super saturada), pode tornar o óleo turvo na estocagem (PONGRACZ,1973). A presença de compostos polares nos óleos, tais como ácidos graxos livres, mono e di-acilgliceróis, ceras e os fosfolipídios possuem uma influência negativa na sua dispersão (BOURGEOIS,1982). O palmitato de ascorbila aumenta apreciavelmente a vida de prateleira de óleos vegetais quando usado à nível de 0,01%, sendo mais efetivo do que o BHA e o BHT a 0,02% (CORT,1974).

ANTIOXIDANTES EM ÓLEO DE PESCADO

Geralmente os óleos vegetais apresentam antioxidantes naturais, os tocoferóis, capazes de retardar a oxidação e ampliar a estabilidade oxidativa do produto. No entanto, os óleos de pescado e gorduras animais contêm um baixo teor de tocoferóis (SANDERS, 1983).

Estudos comparativos com relação a efetividade de vários antioxidantes têm sido realizado com lipídios de pescado em geral. KE, NASH e ACKMAN (1977) compararam a potência antioxidativa do TBHQ e outros compostos na oxidação dos lipídios extraídos da pele de cavala e detectaram que o TBHQ não era somente o mais efetivo em inibir a oxidação como também retardar a formação de compostos carbonílicos resultantes da reação.

O mecanismo de ação antioxidante do dilauril tiopropionato (DLTDP) em óleo de truta, foi avaliado por KARAHADIAN e LINDSAY (1988). Este antioxidante na concentração de 200 ppm foi efetivo em prolongar a estabilidade oxidativa deste óleo por 72 horas, numa temperatura de 50°C.

O efeito dos antioxidantes, TBHQ, PG, BHA, e di-BHA, na estabilização do óleo de baleia bruto e na manutenção dessa qualidade no óleo desodorizado, foi comparado por CHAINE e MACNEILL (1974). O TBHQ e seus produtos de oxidação foram conduzidos durante o processo de beneficiamento e detectados no óleo refinado, mostrando-se por conseguinte o mais efetivo.

O efeito antioxidante de várias proteínas, tais como caseína, gelatina, gliadina e clara de ovo, foram avaliadas por TAGU-

CHI et alii (1988) em óleo de sardinha e óleo de girassol em condições moderadas (37°C e umidade relativa de 30 a 50%). As mais efetivas sobre os ácidos graxos polinsaturados foram a clara de ovo e a gliadina. FRITSCHÉ e JOHNSTON (1988) estudaram a velocidade da oxidação em dietas purificadas contendo óleo de "menhaden" sem a presença de aditivos e com a incorporação de TBHQ e vitamina E.

MEDIDAS DA AUTOXIDAÇÃO

A medida da extensão da autoxidação de lipídios em alimentos é de extrema importância, pois sua qualidade e aceitabilidade estão relacionadas com o grau de oxidação. Vários métodos químicos e físicos são empregados nessa determinação, entre eles os mais conhecidos são: índice de peróxido, índice de anisidina, valor totox, teste de KREIS, determinação de compostos carbonílicos totais, medida de fluorescência de compostos oxidados, absorção no ultra-violeta, polarografia, cromatografia gasosa, refratometria, quimioluminescência e outros (GRAY, 1978).

Dentre todos os métodos comumente empregados para medir a oxidação, a análise sensorial é o mais sensível, mas tem a desvantagem de ser demorado e pouco reprodutível na prática (QUEIROZ e FURLONG, 1985).

INDICES DE ESTABILIDADE OU RESISTENCIA A OXIDAÇÃO

No estudo experimental da oxidação verifica-se a ocorrência de duas etapas, uma etapa inicial, chamada período de indução, onde a oxidação ocorre numa velocidade lenta e relativamente uniforme. A segunda etapa é caracterizada por um aumento rápido de velocidade, onde se iniciam os sinais de odor e sabor característicos da rancidez (URI,1961).

A duração do período de indução de um óleo ou gordura é uma medida de sua resistência à oxidação. Existem vários métodos para avaliar o tempo do período de indução, geralmente baseados na estocagem das amostras sob temperaturas elevadas na presença de oxigênio ou através de testes organolépticos (SCHULER, 1980).

Um grande número de métodos são utilizados para medir a estabilidade oxidativa do óleo, sendo que as condições do teste são selecionadas com intuito de acelerar a reação, o que permite a determinação num tempo relativamente curto (ZWOBADA,1979).

A maioria desses métodos baseiam-se na determinação do oxigênio absorvido ou nos produtos de oxidação formados quando o óleo ou gorduras são colocadas em contato com o ar. A absorção de oxigênio pode ser determinada diretamente por meio de aparelhos como o de Barcroft-Warbug ou indiretamente por determinação de peróxido ou produtos de degradação. Os testes mais utilizados são: teste da estufa (Oven test); análise termogravimétrica (TGA); análise por calorimetria diferencial (DSC); método do oxigênio ativo (AOM) e mais recentemente o método Rancimat (SCHULER,1980).

A técnica mais antiga de medir a estabilidade oxidativa é o método do oxigênio ativo e se baseia-se na determinação do valor de peróxido durante a aeração (fluxo de ar=2,33 mL/min.) da amostra à 98,7°C, até que seja atingido um valor de peróxido de 100 meq/kg para óleos vegetais (GUNSTONE e NORRIS,1983).

Embora o AOM seja o método oficial da AOAC Cd 12-57 (1986), apresenta uma série de desvantagens como consumir um tempo muito longo de análise, ser trabalhoso e dispendioso. Recentemente, a estabilidade oxidativa pode ser avaliada através do Rancimat, pela medição automática da condutividade elétrica (LAUBLI e BRUTTEL,1986). O método Rancimat é uma versão automatizada do método AOM, e está baseado na observação de HARDORN e ZURCHER (1974), de que durante a autooxidação são formados ácidos voláteis no final do período de indução, os quais poderiam ser detectados automaticamente, para permitirem a determinação do período de indução (deMAN e deMAN,1984).

Numa pesquisa dos ácidos orgânicos de cadeia curta formados no teste AOM automatizado, concluiu-se que em adição ao ácido fórmico formam-se o ácido acético, propiônico, butírico, valérico e caprótico, sendo que a proporção destes varia em diferentes óleos. No entanto o ácido fórmico se apresenta em maior concentração, sendo o principal responsável pelo aumento da condutividade da água.(deMAN et alii,1987).

No método Rancimat, a autooxidação é induzida por um fluxo de ar purificado e constante através da amostra de óleo aquecida, onde os produtos voláteis da reação carregados pelo ar, são recolhidos em água deionizada ou destilada e medidos através da mu-

dança na condutividade elétrica da água. Geralmente a temperatura é escolhida para resultar em tempo de indução variando de 3 a 12 horas. A temperatura padronizada para óleos e gorduras comestíveis varia de 110 a 120°C, 2,5g de amostra e fluxo de ar 20 L/h (FRANK et alii, 1982). Os resultados são expressos por um gráfico, onde o período de indução é calculado por intersecção de duas linhas: uma tangente ao longo da inclinação e outra tangente a parte horizontal da curva, conforme a Figura 8(VAN OOSTEN et alii, 1981).

A limpeza dos recipientes utilizados nesta técnica é essencial para se obter resultados confiáveis e seguros, pois traços de gorduras oxidadas ou metais podem ter um efeito bastante acentuado sobre o período de indução. A reproduzibilidade, medida através de avaliação gráfica, é de mais ou menos 15 minutos para tempos de indução inferiores a 12 horas (FRANK et alii, 1982).

Uma descrição esquemática do equipamento Rancimat pode ser observada na figura 9.

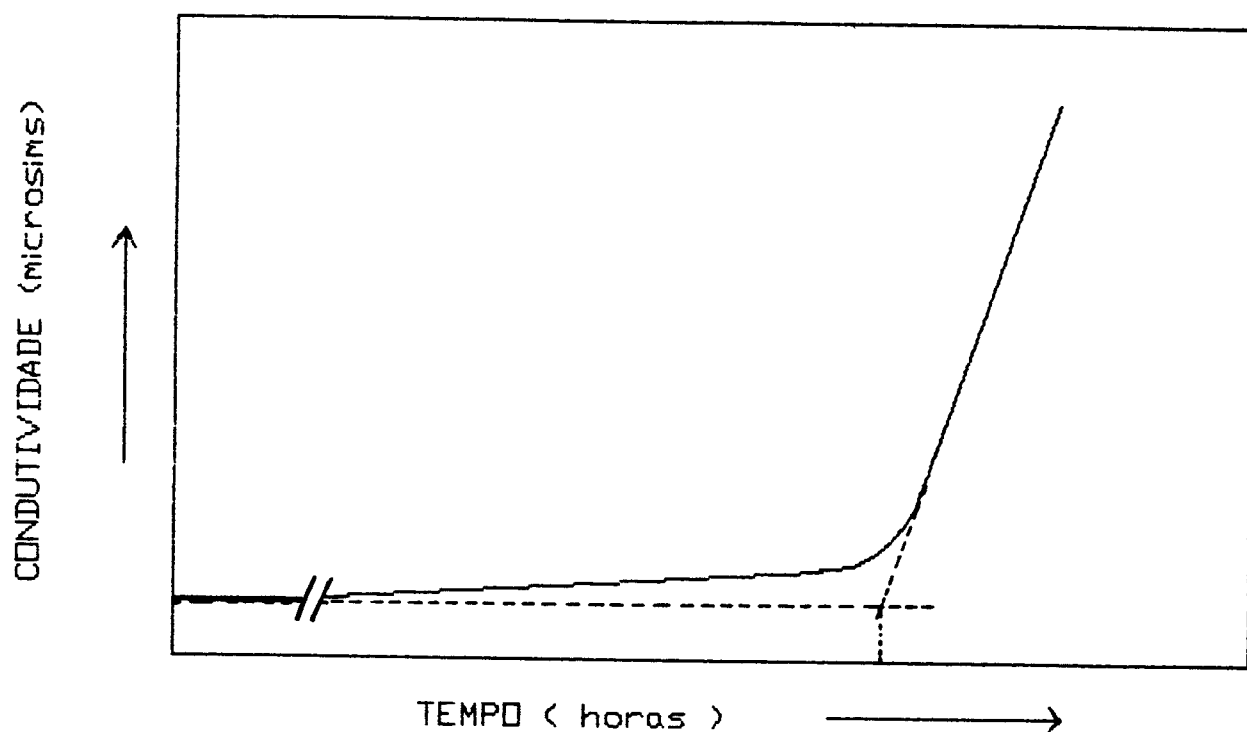
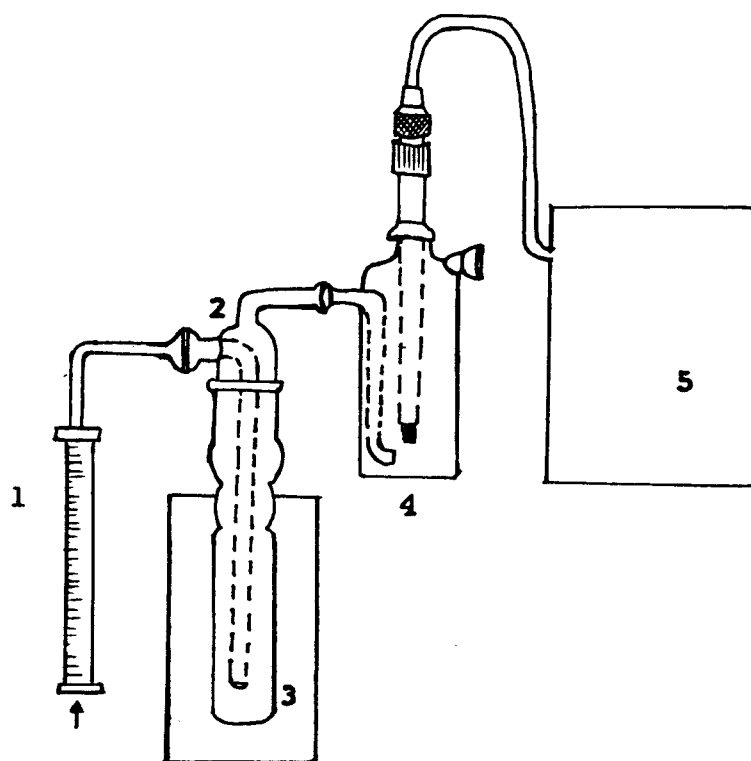


FIGURA 8. Determinação gráfica do período de indução.



LEGENDA: 1. Medidor de fluxo de ar

2. Tubo de reação

3. Bloco de aquecimento

4. Tubo coletor de voláteis e eletrodo de Pt

5. Amplificador de sinal

FIGURA 9. Descrição esquemática do aparelho rancimat (LAUBLI & BRUTTEL, 1986).

III- MATERIAL E MÉTODOS:

MATERIAL

Matérias-primas

A matéria-prima utilizada na elaboração do óleo foi fígado de tubarão azul da espécie *Prionace glauca*, fornecida pelo Instituto de Pesca, Santos, S.P., de peixes capturados em alto mar, na costa sudeste do Brasil, nos meses de junho/julho (1990). Os fígados foram conservados em gelo à bordo dos barcos e congelados após o desembarque, permanecendo congelados por 6 dias até o início do experimento.

Reagentes

Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau de pureza exigidos pelos métodos analíticos.

As especificações dos antioxidantes testados na estabilização do óleo de fígado de tubarão azul e suas frações encontram-se na Tabela 6.

Equipamentos

No decorrer do trabalho, além da vidraria, equipamentos e utensílios de uso rotineiro no laboratório químico, foram utilizados os seguintes equipamentos:

TABELA 6. Composição dos antioxidantes avaliados na estabilização do óleo de fígado de tubarão azul (*Prionace glauca*) e suas frações.

ANTIOXIDANTE	MARCA	COMPONENTES
TBHQ	FLUKA	TERC-BUTIL HIDROQUINONA
BHT	FLUKA	BUTIL HIDROXITOLUENO
ANTRACINE 220 (ANT.)	J.DEKKER	TBHQ + AC.CÍTRICO +PRO- PILENO GLICOL
TOCOMIX D (TOC.)	J.DEKKER	γ - e α -TOCOFEROIS+CITRA- TO MONOGLICERIDEO + ÓLEO VEGETAL.
RENOXAN A (REN.)	ROCHE	PALMITATO DE ASCORBILA+ LECITINA + α -TOCOFEROL.
PA	ROCHE	PALMITATO DE ASCORBILA

Reatores de vidro com camisa externa WERTHEIM
(capacidade 2 e 4 L)
Registrador de temperatura SYN-KOMB R210.
Programador digital de temperatura LAUDA-PM-351.
Agitador pneumático DRUCKLUFT-LABORRUHRER LR3.
Bomba de vácuo NEWBERGER miniport.
Filtro monodisco MERKUR EF 14/2.
Banho de água/óleo termostatizado HAAKE D3.
Ultra-som Bandelin SONOREX super RK 510 H.
Triturador BRAUN.
Bureta automática DOSIMAT 655 - METRHOM-HERISAU.
Cromatógrafo gasoso SIGMA 3B - PERKIN-ELMER.
Integrador LCI-100 - PERKIN-ELMER.
Espectrofotômetro UV-VIS LAMBDA 3 - PERKIN-ELMER.
Refratômetro BAUSCH & LOMB - ABBE 3L, com banho termostati-
zado MGW-LAUDA M 3.
Aparelho RANCIMAT 617 METROHM-HERISAU.
Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência VARIAN-5000, com de-
tector UV-50.
Aparelho de ressonância magnética nuclear pulsante (RMN)
BRUKER MINISPEC- PC100.
Centrífuga SUPRAFUGE 22 - HERAEUS-SEPATECH.
Analisador IATROSCAN MK-5 TLC/FID (Iatron Lab.Inc.-Tokyo)
com estação de manuseio de dados cromatográficos TRILAB 2000
Aplicador e dosador automático SES 3200/IS-07 - SESK.

MÉTODOS

MÉTODOS ANALÍTICOS

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FÍGADO

As determinações de umidade e cinzas foram realizadas segundo o método da AOAC (HORWITZ,1980). O conteúdo de proteína da amostra desengordurada foi determinada pelo método de KJELDAHL, usando-se o fator de 6,25 (%N x 6,25), recomendado pela AOAC (1980). Os lipídios totais obtidos pelo método de BLIGH & DYER (1959).

CARACTERIZAÇÃO

Na caracterização e no estudo da composição do óleo bruto e sua frações foram efetuados utilizando-se os métodos seguintes:

ÓLEO BRUTO

A) Acidez: método oficial Ca 5a-40 da American Oil Chemists Society (A.O.C.S.,1987).

B) Índice de iodo: método oficial Cd 1b-87 da A.O.C.S. (1987).

C) Índice de peróxido: método oficial Cd 8-53 da A.O.C.S. (1987).

D) índice de saponificação: método oficial Cd 3-25 da A.O.C.S. (1987).

E) índice de refração: método oficial Cc 7-25 da A.O.C.S. (1987).

F) Matéria insaponificável: método oficial Ca 6b-53 da A.O.C.S. (1987).

G) Conteúdo de sólidos na gordura (Solid Fat Content): Método oficial Cd 16-81 da A.O.C.S. (1987) por RMN pulsante, sendo as leituras efetuadas entre 10 e 35°C.

H) Hidrocarbonetos: segundo o método descrito por MARQUESAN (1988), modificado como segue: após a saponificação do óleo, uma alíquota de 10 mL de hexano contendo 350 mg de matéria insaponificável, foi colocada numa coluna de sílica gel (2,5x12,5 mm) coletando-se duas frações. A primeira fração resultante da eluição de 60 mL de hexano e a segunda após a eluição de 150 mL de metanol. Os hidrocarbonetos foram obtidos por diferença de peso após a evaporação do hexano. A fração metanólica evaporada serviu para comprovar que todo o material aplicado na coluna havia sido eluído.

I) Fósforo: A determinação de fósforo foi realizada segundo o método de HARTMAN et alii (1985).

J) Tocoferóis: Os tocoferóis totais foram determinados pelo método colorimétrico de CONTRERAS & STRONG (1982).

L) Composição em ácidos graxos: Determinado por cromatografia gasosa dos ésteres metílicos dos ácidos graxos obtidos de acordo com o método de HARTMAN e LAGO (1973). Foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer Sigma 3B com detector de ionização de chama nas seguintes condições:

Coluna de aço inox com 2m de comprimento e 1/8" de diâmetro, empacotada com Chromosorb W e 15% de DEGS (succinato de dietilenoglicol).

Temperatura da coluna 180°C.

Temperatura do detector e injetor 240°C.

Fluxo do gás de arraste (N₂) 25 mL/min.

Os ácidos graxos foram quantificados usando um integrador Perkin-Elmer LCI-100 e identificados através de comparação dos tempos de retenção com padrões. Ésteres metílicos de ácidos graxos da amostra, cujos tempos de retenção não encontravam correspondência, no tempo de retenção dos ácidos graxos padrões, foram identificados pela construção de um gráfico do logarítmo do tempo de retenção em função do número de átomos de carbonos e duplas ligações (COLLINS e BRAGA, 1988).

M) Esteróis: O estudo dos esteróis foi realizado segundo o método II C.8 da IUPAC (1979) como segue. A matéria insaponificável diluída em hexano foi aplicada em placa preparativa de sílica gel (0.5 mm), para separação dos esteróis. Após o desenvolvimento

da placa, utilizando-se os solventes: éter de petróleo e acetato de etila (92,5:7,5), a faixa correspondente aos esteróis foi recuperada e re-extraída com isopropanol. Os esteróis totais foram quantificados por gravimetria, após evaporação do isopropanol até peso constante. A composição foi determinada por cromatografia gasosa dos esteróis totais rediluídos em isopropanol usando coluna de aço inox com 3% OV-17. As condições de operação no cromatógrafo foram:

Temperatura da coluna 250°C.

Temperatura do injetor e detector 300°C.

Fluxo do gás de arraste 30 mL/min.

A identificação dos esteróis foi realizada com auxílio de padrões, através da comparação dos tempos de retenção.

N) Composição glicerídica (mono, di e triacilgliceróis): Foram separados por cromatografia de camada delgada e quantificados no IATROSCAN com auxílio do sistema TRILAB 2000. Aproximadamente 100mg de óleo de fígado foram diluídos em 5 mL de acetona, precipitando os fosfolipídios da mistura, e a seguir aplicada em bastonetes impregnados com sílica gel (IATRON, INC., TÓKIO) usando um aplicador e dosador automático. O sistema de solventes utilizado foi benzeno: cloroformio: ácido acético (70:30:1), até percorrer aproximadamente 9 cm de altura, segundo o método descrito por TATARA et alii (1983). A identificação foi realizada por comparação dos valores dos tempos de retenção (RF) dos componentes da amostra com uma mistura de padrões contendo colesterol palmítato, monopalmitato, mono e di-estearina e ácido oleico, como re-

presentante de cada grupo ou família de compostos.

O) **Vitamina A:** A determinação do teor de vitamina A foi realizado como segue: 200mg de óleo foram saponificados sob refluxo em 50 mL de éter etílico 95% e 10 mL de solução KOH 30%, à temperatura de 60-70°C por 40 minutos. Após a extração com éter de petróleo o extrato etéreo foi seco e completado para 100mL num balão volumétrico. Uma alíquota de 2mL foi evaporada sob nitrogênio e o resíduo dissolvido em 10 mL de metanol. Procedeu-se da mesma forma com o padrão. Utilizou-se uma alíquota de 10 mL para injeção no cromatógrafo líquido, segundo o método de LEENHEER (1985).

As condições de operação do cromatógrafo foram:

Coluna MCH 10 (micro-PAK), de aço inox com 30cm x 4mm.

Fase móvel: metanol 100%

Fluxo da fase móvel: 1mL/min.

Detector: UV 254 nm.

Temperatura: ambiente.

FRAÇÕES OLEINA E ESTEARINA

Nas frações oleina e estearina obtidas foram realizadas as seguintes determinações, utilizando-se a metodologia citada anteriormente:

- A) Índice de peróxido
- B) Índice de iodo.
- C) Composição de ácidos graxos.
- D) Índice de refração.

E) Acidez.

F) Vitamina A

ESTUDO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA

A estabilidade oxidativa do óleo de fígado de tubarão e suas frações com e sem a adição de antioxidantes foi determinada usando o Rancimat (Metrohm), nas seguintes condições:

TEMPERATURA: 80°C

FLUXO DE AR: 20 L/h

PESO DA AMOSTRA: 2,5 g

As amostras foram colocadas nos frascos de reação do Rancimat em duplicata, utilizando uma amostra do óleo bruto ou frações sem antioxidante, como testemunha.

Embora o método RANCIMAT não seja oficial, vários trabalhos têm sido realizados com este equipamento (FRANK, GEIL e FREASO, 1982; Laubli e BRUTTEL, 1986; deMAN e deMAN, 1984; VAN OOSTEN, POOT e HENSEN, 1981; WOESTENBURG e ZAALBERG, 1986; RAUEMIGUEL, 1989), obtendo resultados reprodutíveis e com grande economia de trabalho e de tempo em relação aos métodos oficiais existentes. Neste trabalho seguiu-se, com algumas modificações, a metodologia citada por LAUBLI e BRUTTEL (1986).

Como no Rancimat, a reprodutibilidade da determinação do período de indução (PI) também chamada de resistência à oxidação, depende em grande parte da limpeza do material usado, descrevemos a seguir o procedimento prático de limpeza adotado nesse trabalho, segundo as especificações de MIGUEL (1988), com algumas mo-

dificações.

PROCEDIMENTO DE LIMPEZA

Os componentes do equipamento em contato direto e indireto com as amostras requerem uma limpeza meticulosa após cada sessão de análise, a fim de evitar que qualquer traço de substância residual venha a interferir como pró-oxidante nas amostras a serem analisadas posteriormente.

Vidraria

Elementos que permaneciam em contato direto com o óleo necessitavam de uma limpeza mais prolongada, sendo realizada a seguinte sequência:

Após uma pré-lavagem, a vidraria era imersa em solução de KOH alcóolico-6% à frio por 4 horas, para saponificação completa do óleo residual e enxaguado com água corrente. A seguir era colocada numa solução de detergente EXTRAN MA 01 ALCALINO (MERK) / 10% num aparelho de ultra-som a 35°C, para acelerar e intensificar o processo. Passadas duas horas, os elementos eram cuidadosamente enxaguados em água corrente, imersos em água destilada e secos em estufa.

Frascos coletores dos voláteis

Como esses frascos permaneciam com água destilada sem contato direto com as amostras, sua limpeza é menos demorada.

Após pré-lavagem, imersão em KOH alcóolico-6% à frio por duas horas eram enxaguados e imersos em detergente EXTRAN MA 01 ALCALINO /10% em ultrassom por meia hora a 35°C. A seguir novamente enxaguados em água corrente, água destilada e secos em estufa.

Eletrodos

Os eletrodos eram limpos por imersão numa solução aquosa de ácido nítrico a 50% por 2 minutos, sendo que após 40 horas de uso, eram imersos em solução sulfocrômica por 10 minutos, conservando a temperatura da solução a 50°C. A seguir eram enxaguados em água corrente e por último em água destilada. A distância interna entre as placas de platina foi mantida em 7,5 mm, sendo periodicamente ajustada.

PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Para obtenção de um óleo de composição uniforme cinco fígados foram fragmentados, misturados e congelados em lotes de aproximadamente 5 quilos cada.

Um dia antes do início da extração, os lotes eram descongelados sob temperatura de refrigeração, colocados em recipiente de vidro de 4L com camisa externa, triturados e aquecidos à temperatura de 75°C por 15 minutos sob agitação lenta. A seguir a massa cozida era deixada em repouso nessa mesma temperatura por 20 minutos para deposição da parte proteica. Desta maneira o óleo so-

brenadante era facilmente separado e recolhido.

O óleo de aspecto turvo foi submetido à centrifugação de 7000 rpm por 10 minutos , para retirar água e impurezas.

Para finalizar o processo o óleo foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado em funil de Buchner a vácuo e conservado a temperatura de refrigeração em frascos âmbar sob atmosfera de nitrogênio. O fluxograma geral para obtenção do óleo bruto de fígado esta representado na Figura 10.

FRACIONAMENTO DO ÓLEO BRUTO

Utilizou-se o método de fracionamento a seco. O óleo foi colocado no recipiente de cristalização (reator de vidro com camisa externa com capacidade de 2L), sob agitação lenta e constante. A seguir foi seguido o programa de temperatura mostrado na Figura 11. Para selecionar a temperatura na qual o processo de fracionamento deveria iniciar e definir o programa de temperaturas, utilizou-se o método do conteúdo de sólidos na gordura, por ressonância magnético nuclear (RMN).

Os cristais formados foram filtrados em papel de filtro sob vácuo à temperatura de -5°C . O fluxo da mistura, óleo líquido/cristais, do reator para o filtro foi lento, ficando desta forma a fração estearina retida no papel de filtro e a fração oleína recolhida num erlenmeyer. A seguir as frações foram aquecidas e secas com sulfato de sódio anidro, filtradas novamente à temperatura ambiente num funil de Buchner sob vácuo e armazenadas em frascos de cor âmbar sob atmosfera de nitrogênio à temperatura

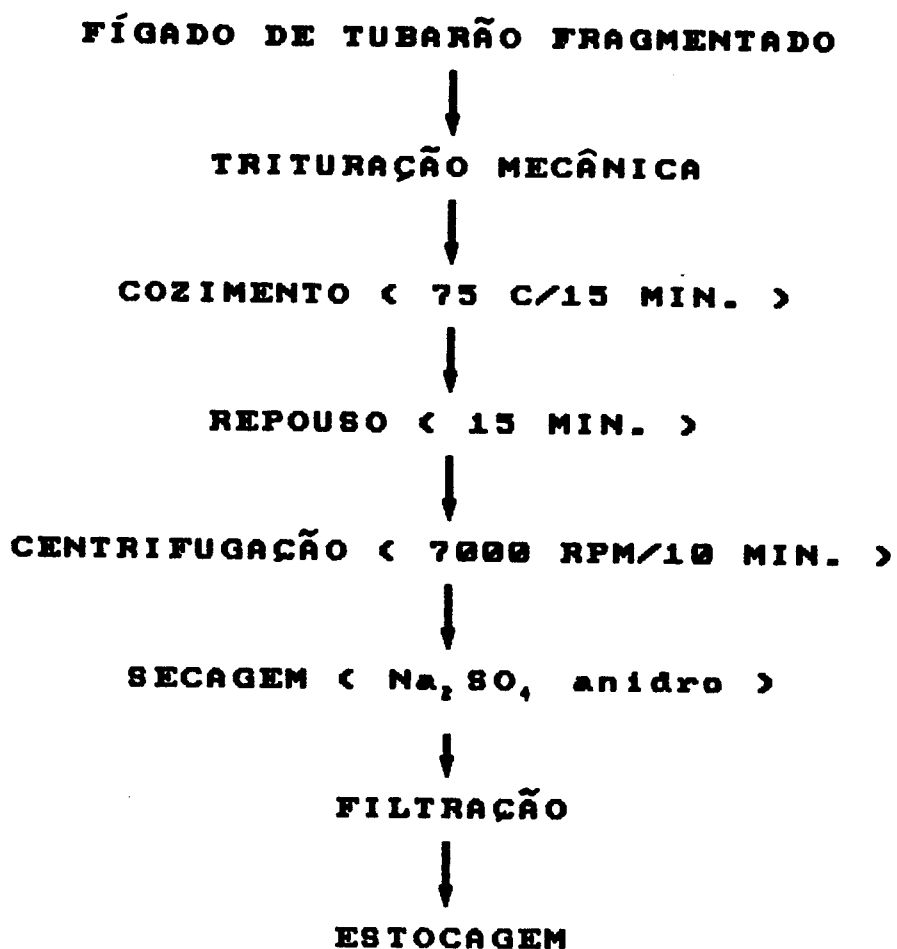


FIGURA 10. Fluxograma de elaboração do óleo de fígado de tubarão

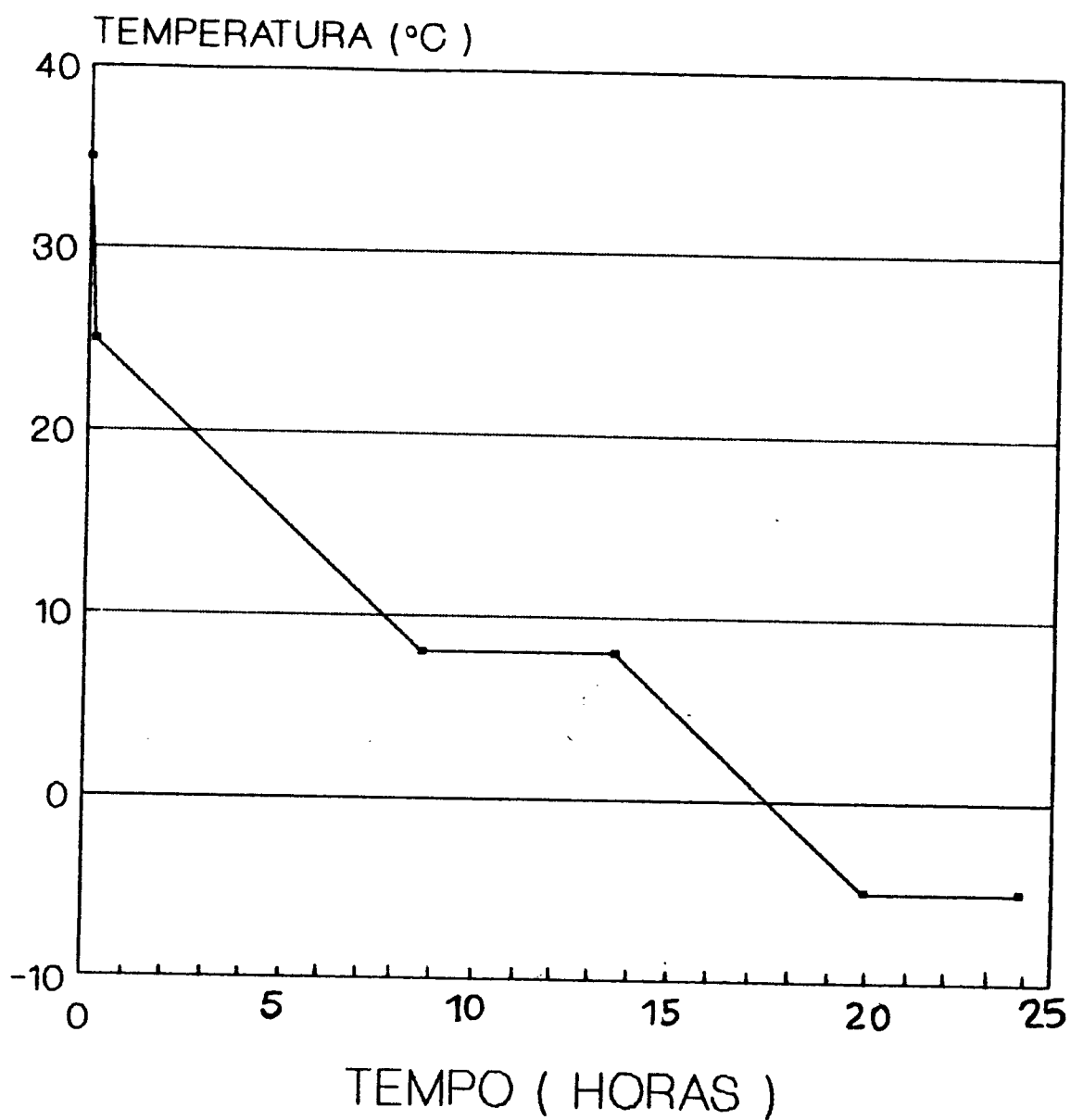


FIGURA 11- Programa de temperatura utilizado no fracionamento do óleo bruto de fígado de tubarão azul (Prionace glauca)

de refrigeração. O esquema do módulo de fracionamento é mostrado nas Figuras 12 e 13.

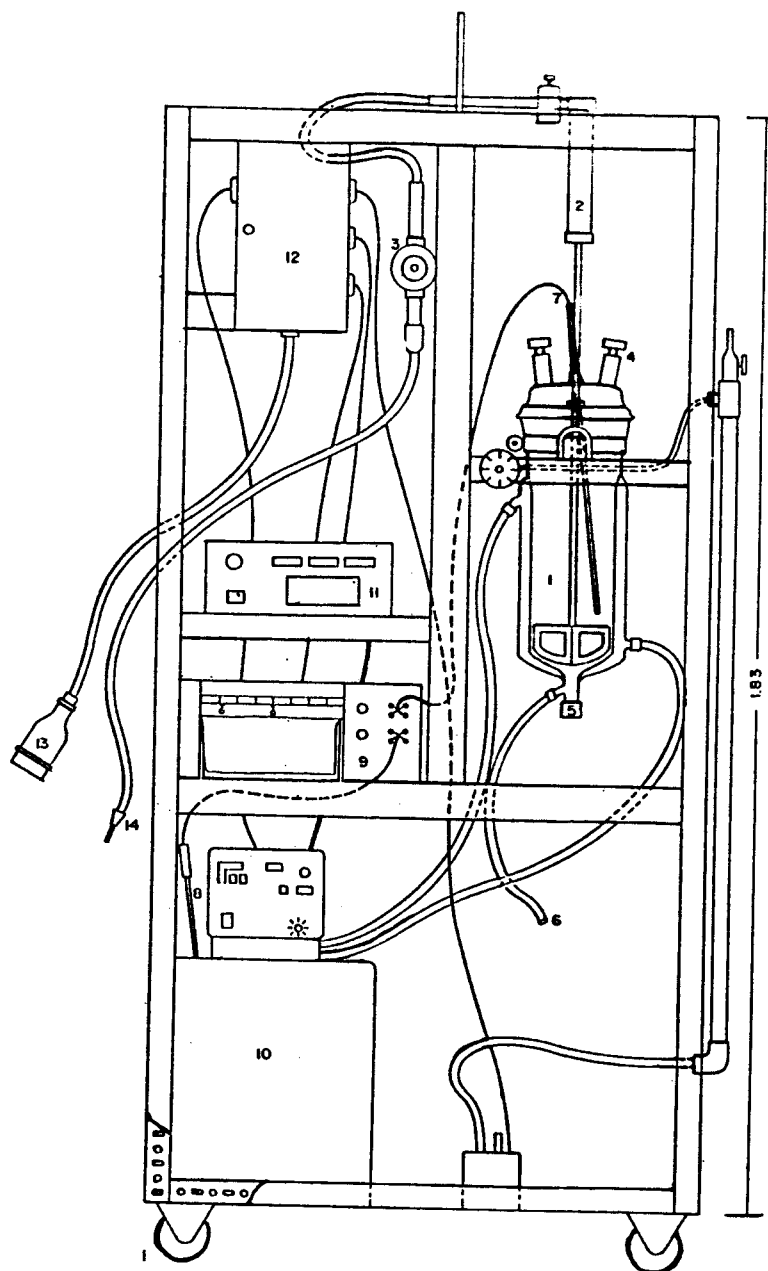
ADIÇÃO DE ANTIOXIDANTES AO ÓLEO E SUAS FRAÇÕES.

As concentrações de antioxidantes utilizados não ultrapassaram ao limite máximo permitido para óleos comestíveis, especificados no Compendio da Legislação de Alimentos (ABIA, 1988). Os valores utilizados podem ser observados na Tabela 7.

Preparou-se uma solução estoque com os antioxidantes, de onde retirava-se o suficiente a ser adicionado a 10 mL de amostra a fim de se obter a concentração desejada.

Para assegurar a completa dissolução dos antioxidantes no óleo, após sua adição, os mesmos foram submetidos a um banho de água com ultra-som numa temperatura de 35°C por alguns minutos. No caso do ANTRACINE 220, que apresentou menor solubilidade no óleo, a temperatura da água do banho foi de 60°C conforme as instruções do fabricante. O TBHQ foi primeiro dissolvido em 0,5 mL de éter etílico e posteriormente evaporado com nitrogenio gasoso.

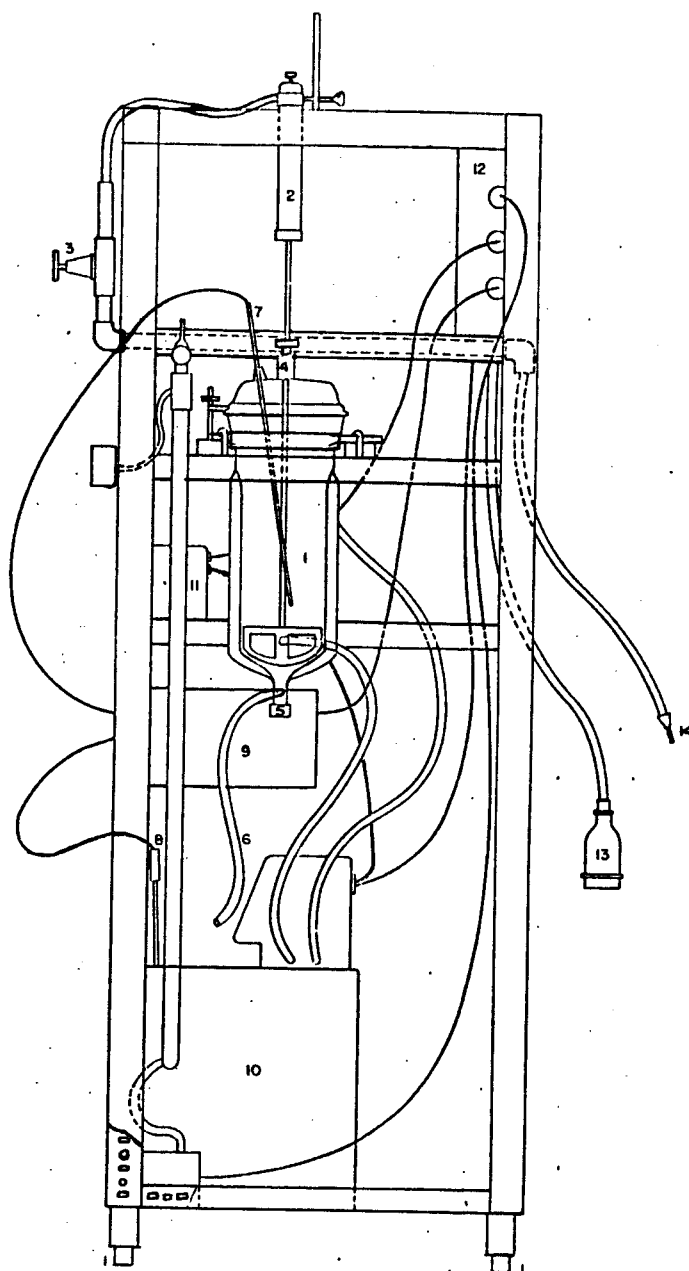
As amostras preparadas desta forma foram conservadas em frascos escuros no refrigerador e utilizadas dentro do período de 15 dias.



Legenda:

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. Reator de vidro (2l) | 9. Registrador de temperatura |
| 2. Agitador pneumático | 10. Banho termostatizado |
| 3. Válvula do ar comprimido | 11. Programador digital de temperatura |
| 4. Alimentação da matéria-prima | 12. Caixa de força |
| 5. Saída da matéria-prima | 13. Tomada de força (5 polos) |
| 6. Tubo de conexão com o filtro | 14. Entrada do ar comprimido |
| 7 e 8. Termopares | |

FIGURA 12. Vista frontal do módulo de fracionamento.



Legenda:

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1. Reator de vidro (2l) | 9. Registrador de temperatura |
| 2. Agitador pneumático | 10. Banho termostatzado |
| 3. Válvula de ar comprimido | 11. Programador digital de temperatura |
| 4. Alimentação da matéria-prima | 12. Caixa de força |
| 5. Saída da matéria-prima | 13. Tomada de força (5 polos) |
| 6. Tubo de conexão com o filtro | 14. Entrada do ar comprimido |
| 7 e 8. Termopares | |

FIGURA 13. Vista lateral do módulo de fracionamento.

TABELA 7. Nome e concentração dos antioxidantes adicionados ao óleo do fígado de tubarão azul e suas frações.

ANTIOXIDANTES	CONCENTRAÇÃO (g/100g de óleo).
ANTRACINE 220 *	0.05
BHT	0.01
P.A.	0.05
RENOXAN A **	0.20 / 0.12 / 0.04
TBHQ	0.02 / 0.01 / 0.005
TOCOMIX D ***	0.05

* 0,02% do componente ativo.

** 0,05% do componente ativo na concentração de 0,20%.

*** 0,03% do componente ativo

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO FÍGADO

Os dados da composição centesimal encontram-se na Tabela 8. Os valores de proteína e lipídios encontrados são próximos dos relatados por GORDIEVSKAYA(1973), sendo de 11,1% e 85,8% respectivamente, para essa mesma espécie. O alto teor de lipídios presente nesses animais reforça a teoria de VAN VLEET(1984), onde uma vez que os tubarões não possuem bexiga natatória, a sua densidade média ou a sua flutuação na coluna de água é determinada pela quantidade de lipídios estocada no fígado.

EXTRAÇÃO DO ÓLEO:

O método de extração por cocção apresenta um custo inferior é uma técnica simples e rápida, frequentemente utilizada nas indústrias para fígados com um alto teor de óleo (MIWA,1972). O rendimento do óleo foi de 38,51%, considerado baixo, devido principalmente ao excesso de cuidados com este item, sendo que a preocupação fundamental nessa etapa não foi com o rendimento, mas assegurar uma alta qualidade do óleo. OGAWA et alii(1973) utilizaram as técnicas de digestão com soda e enzimática para extração do óleo de fígado de tubarão azul, obtendo em média um rendimento de 62,3% para essa espécie.

TABELA 8. Composição centesimal percentual do fígado de tubarão azul (Prionace glauca).

COMPONENTES *	FÍGADO TUBARÃO AZUL
MATÉRIA SECA	68,63
LÍPIDIOS	79,88
PROTEÍNA	11,95
CINZAS	0,48
CARBOIDRATOS **	7,69

* base seca

** por diferença

CARACTERIZAÇÃO E COMPOSIÇÃO

ÓLEO BRUTO

Na Tabela 9 são mostrados os dados obtidos nas determinações referentes à caracterização do óleo bruto. Os valores de índice de peróxido e acidez indicam que a matéria-prima foi conservada em condições adequadas, assim como o tempo e a temperatura utilizadas no processo de obtenção do óleo. Esses valores são menores que os limites máximos de qualidade citados por YONG (1982), de 6% para ácidos graxos livres e de 6,0 miliequivalentes de peróxido por quilo de óleo. O conteúdo de fósforo (Tabela 10) encontrado apresentou-se ligeiramente superior ao recomendado para óleo de pescado (0,02%), segundo as especificações citadas anteriormente. Considerando que todo o fósforo presente no óleo seja proveniente de fosfolipídios, esse conteúdo poderia ser estimado indiretamente, recorrendo-se a um fator de conversão de fósforo elementar em fosfatídios (BLOCK, 1983). No entanto, não encontrou-se na literatura um fator de conversão para óleo de pescados, o fator 30 recomendado pelo método Ca 12-35 da AOCS (1986) é específico para óleo de soja bruto, onde se conhece o peso molecular médio dos fosfatídios.

Os altos índices de refração e de iodo evidenciam a presença de alto teores de ácidos graxos polinsaturados. O índice de refração está muito próximo dos valores reportados por RUSOFF e FRENCH (1940) e PEYRONEL et alii (1984), para várias espécies de seláquios. O índice de saponificação reflete também, o alto peso

TABELA 9. Algumas características do óleo bruto do fígado de tubarão azul (Prionace glauca).

CARACTERÍSTICAS	ÓLEO BRUTO
ACIDEZ (% AC. OLEICO)	0.15
ÍNDICE DE SAPONIFICAÇÃO	148,21
ÍNDICE DE IODO (WIJS)	151,71
ÍNDICE DE REFRAÇÃO (40°C)	1,4778
ÍNDICE DE PERÓXIDO (meq/kg)	0,95
PONTO DE NEVOA (°C)	-3,0

**TABELA 10. Composição do óleo bruto do fígado de tubarão azul
(Prionace glauca).**

COMPONENTES	ÓLEO BRUTO
TRIGLICERÍDIOS (%)	93,93
ÁCIDOS GRAXOS LIVRES (% ác. oleico)	0,15
FÓSFORO (ppm)	3,6
MATÉRIA INSAPONIFICÁVEL (%)	5,43
HIDROCARBONETOS (%)	0,35
ESTERÓIS (%)	1,69
VITAMINA E (mg/g)	0,45
VITAMINA A (UI/g)	1630,0

molecular médio dos ácidos graxos, sendo inferior ao valor de 163,2 reportado por GORDIEVSKAYA (1971) para esta mesma espécie.

A composição do óleo bruto encontra-se relacionada na Tabela 10. O valor de triacilglicerídeos determinado no Iatroscan TLC-FID, concorda com a afirmação de MALINS (1967), de que a classe principal dos constituintes do óleo de pescados são os triacilgliceróis. O teor de insaponificáveis é um pouco inferior aos citados por SALVO et alii (1987) e GORDIEVSKAYA (1971) de 8,33% e 6,2% respectivamente, sendo que valores dessa magnitude são característicos de espécies que habitam águas superficiais. Segundo SUZUKI (1986), os tubarões azuis vivem em todos os mares temperados e tropicais, geralmente em alto mar, e costumam nadar na superfície com as nadadeiras dorsais fora da água. Na matéria insaponificável, os hidrocarbonetos perfazem 6,44% e os esteróis 31,12%, provavelmente o restante seja preenchido pelas vitaminas lipossolúveis (A e E) e coenzima Q, conforme sugerido por EMOKPAE e ANEKWE (1983). Dentre os esteróis predominou o colesterol, constituindo 87,2% do total. O teor de colesterol encontrado situa-se dentro da faixa (0,5 à 1,5%) descrita por ACMAN (1988a) para óleos de pescado em geral.

FRACIONAMENTO DO ÓLEO BRUTO

O óleo bruto submetido ao processo de fracionamento à seco por um período de 24 horas, conforme esquematizado na Figura 11 (Material e Métodos), rendeu 32% de uma fração sólida (estearina) e 68% de uma fração líquida (oleína). O método de fracio-

namento a seco de um modo geral, é um processo mais favorável em relação ao fracionamento com detergente e com solvente, por ser mais simples, não apresentar resíduos químicos e não requerer mão de obra especializada (KEIRI,1985).

Tomando como base o conteúdo de sólidos (SFC) presentes no óleo bruto e suas frações a diferentes temperaturas (Tabela 11), obteve que à temperatura de 20°C o óleo integral praticamente não apresenta triacilglicerídeos sólidos, sendo que a oleína à 10°C não apresenta sólidos. A estearina apresenta uma pequena percentagem de sólidos à 25°C, o que reflete um ponto de fusão superior de seus componentes ácidos graxos e consequentemente menor índice de iodo (Tabela 12) em relação ao óleo bruto. Atualmente o teste do conteúdo de sólidos vem sendo utilizado pela indústria de óleo de palma, como controle de qualidade da oleína fracionada do óleo, assegurando a ausência de cristais em temperaturas ao redor de 10°C (YONG,1987).

Embora não tenha sido detectado a presença de sólidos no óleo bruto à temperatura de 25°C, por medida de segurança iniciou-se o fracionamento com o aquecimento do óleo à temperatura de 35°C, garantindo dessa forma a fusão completa dos núcleos de cristais. Após o aquecimento o óleo era resfriado rapidamente até 25°C (10 min.), minimizando desta forma qualquer efeito sob seu estado oxidativo.

Foram realizados vários testes utilizando-se diferentes programas de resfriamento para o óleo e observou-se que um resfriamento mais rápido (1°C a cada 10 ou 12 minutos) num período de tempo total do processo menor (12 ou 15 horas), resultava na for-

TABELA 11. Conteúdo de sólidos (SFC) do óleo do fígado de tubarão azul (Prionace glauca) e suas frações.

TEMPERATURA (°C)	VALORES MÉDIOS (%)		
	ÓLEO BRUTO	ESTEARINA	OLEINA
10	3,38	17,70	0,0
15	1,14	11,71	0,0
20	0,17	3,52	0,0
25	0,0	1,27	0,0
30	0,0	0,0	0,0

TABELA 12. Algumas características das frações estearina e oleína do óleo de fígado de tubarão azul (Prionace glauca).

DETERMINAÇÃO	ESTEARINA	OLEINA
TRIGLICERÍDIOS (%)	96,52	93,63
ACIDEZ (% ác. oleico)	0,13	0,16
ÍNDICE DE IODO	135,47	171,03
ÍNDICE DE REFRAÇÃO	1,4744	1,7778
ÍNDICE DE PERÓXIDOS (meq/kg)	1,62	1,79

mação de uma massa viscosa com cristais pequenos e macios, que fundia com facilidade. Acredita-se que num resfriamento mais rápido o aumento da viscosidade do óleo dificulte o deslocamento e a aproximação das moléculas, impedindo sua deposição e consequentemente o crescimento da estrutura cristalina. Verificou-se também que um resfriamento mais lento, por um período de 24 horas resultava na formação de cristais grandes, de consistência firme e fáceis de serem filtrados, presumindo-se que sejam do tipo beta-prima. Segundo GUNSTONE e NORRIS (1983b), obtém-se uma boa separação das frações do óleo, quando a cristalização ocorre na forma beta-prima, onde os cristais se aglomeram em agregados grandes, firmes, de tamanho uniforme e fáceis de serem filtrados. Outro fator que notadamente influenciou no tamanho dos cristais foi a velocidade de agitação, sendo que foi considerada satisfatória a velocidade de 18 rotações por minuto. Na ausência de agitação, mesmo num resfriamento lento (24 horas), ocorreu a formação de uma massa muito densa com cristais minúsculos.

Ao estabilizar a temperatura por um período de cinco horas em 80°C, supõe-se que ocorra a formação de um maior número de cristais que atuarão como núcleos de cristalização para o subsequente crescimento. Ao diminuir lentamente a temperatura até -50°C, evita-se um aumento rápido da viscosidade permitindo desta forma que moléculas grandes, como são os triacilgliceróis do óleo de pescado, possam difundir-se mais rapidamente para o centro dos cristais, ocorrendo a deposição de um maior número de moléculas, formando com isso aglomerados maiores. Segundo THOMAS (1985), o cristal cresce por deposição de moléculas idênticas em

um modelo padrão, que encaixam-se segundo uma orientação espacial.

A velocidade e o tempo empregados na filtração, subsequente ao fracionamento, influenciam principalmente na consistência da estearina. Uma filtração lenta, por um período de três horas ou mais, resulta numa estearina mais sólida e seca, com menos oleína ocluída entre os cristais, e um maior rendimento da fração líquida.

A estearina apresentou um aspecto granuloso, de coloração amarelo pálido, e praticamente sem odor; ao contrário da oleína de coloração amarelo claro, translúcido e de odor típico de pescado, provavelmente por carregar pigmentos, retinois e produtos resultantes da deterioração oxidativa, dispersos nessa fração líquida.

O processo de resfriamento utilizado, segundo ACKMAN (1988b), consiste num passo inicial de concentração dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico DHA (Tabelas 13 e 14), sendo que a oleína enriquecida desses ácidos, refinada e estabilizada, pode ser destinada para consumo humano, como suplemento alimentar. As cápsulas de gelatina são consideradas um recipiente estável, ideal para embalagem de pequenas quantidades de óleo, conservando a qualidade do produto durante sua vida de prateleira. Segundo CHANG (1988), mais importante que a presença de sabor e aroma brandos, níveis toleráveis de colesterol e resíduos de pesticidas, devem ser a ausência de produtos de decomposição oxidativa e polímeros térmicos formados principalmente durante a desodorização à altas temperaturas.

TABELA 13. Composição de ácidos graxos do óleo bruto do fígado de tubarão azul (Prionace glauca) e suas frações.

ÁCIDOS GRAXOS(%)	ÓLEO BRUTO	ESTEARINA	OLEINA
C14:0	4,19	4,99	3,96
C14:1	0,46	0,58	0,44
C15:0	0,76	1,21	0,68
C16:0	19,80	26,47	16,33
C16:1	7,72	6,31	7,20
C17:0	1,46	0,43	0,49
C18:0	3,80	5,00	3,26
C18:1	24,84	22,45	26,20
C18:2	0,62	0,55	0,67
C18:3	--	--	--
C20:1	7,79	7,58	8,00
C20:4	2,87	4,98	6,18
C20:5	4,59	3,87	4,75
C22:5	1,74	1,48	1,97
C22:6	18,95	13,64	19,94

TABELA 14. Composição em ácidos graxos saturados, monosaturados e poliinsaturados do óleo bruto do fígado de tubarão azul (Prionace glauca) e suas frações.

ÁCIDOS GRAXOS(%)	ÓLEO BRUTO	ESTEARINA	OLEINA
SATURADOS	30,01	38,10	24,72
MONOINSATURADOS	41,23	37,40	41,48
POLIINSATURADOS	28,15	23,97	32,84

A estearina contendo 23,97% de ácidos graxos polinsaturados, depois de desodorizada e estabilizada com antioxidantes, poderia ser utilizada como ingrediente na fabricação de margarinas. O produto pode ser feito numa proporção de 20 a 25% de estearina e 75 a 80% de óleos vegetais hidrogenados, garantindo desta forma um mínimo de 5% de ácidos graxos polinsaturados ω -3 (HAUMAN, 1990a). De acordo com BARLOW e YONG (1988) vários produtos estão sendo formulados à nível experimental na Europa, com a incorporação de óleo de pescado (10 à 17%), a fim de se obter produtos com ácidos graxos ω -3, tais como maioneses, cremes e óleos para saladas, iogurtes, salames e queijos. Portanto a perspectiva de usar óleos com ácidos graxos polinsaturados como novos ingredientes, potencialmente benéficos em alimentos, apresenta uma oportunidade tanto para a indústria de óleo de pescado como para de alimentos. Cabe aos pesquisadores da área encontrarem soluções técnicas de processamento e embalagem que garantam a qualidade do produto durante a armazenagem, uma vez que esses óleos são susceptíveis a várias alterações deteriorativas.

OLEINA E ESTEARINA

Os resultados de algumas características das frações oleina e estearina obtidos por fracionamento do óleo bruto encontram-se na Tabela 12. No processo de fracionamento, os componentes menores do óleo original tendem a se concentrar numa das frações, e segundo YONG (1987) esta concentração afeta de certa maneira a estabilidade oxidativa das frações. O teor de vitamina A no óleo

fracionado foi de 900 UI/g na estearina e 1940 UI/g na oleina, concentrando-se portanto na fração líquida. A vitamina A é muito reativa, sendo sensível à oxidação pelo oxigênio, pela luz ultravioleta, à radiação ionizante e à própria matéria gordurosa oxidada onde ela se encontra (STROBECKER, 1965). Segundo SIVELL et alii (1984), a vitamina A é armazenada no fígado de peixe principalmente na forma de esteres, ocorrendo uma pequena porção na forma de álcool. Essa afirmação nos leva a crer que a vitamina se apresente esterificada com um ácido graxo mais abundante na fração oleina. A forma retinol (álcool) tem seu ponto de fusão ao redor de 7,5 a 8,0°C, ficando provavelmente cristalizada e dispersa na fração líquida. Os ácidos graxos livres se apresentam ligeiramente mais concentrados na oleina e provavelmente todos os componentes da matéria insaponificável, pelo fato do conteúdo de triglicerídios na estearina ser superior ao óleo bruto original (Tabela 12).

Os índices de iodo e de refração apresentam uma ordem crescente de valores em relação a estearina, óleo integral e oleina respectivamente, em função do teor de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa nessa mesma ordem (Tabela 13).

COMPOSIÇÃO EM ÁCIDOS GRAXOS

A composição em ácidos graxos para o óleo bruto e suas frações (oleina e estearina) é apresentada na Tabela 13 e os cromatogramas na Figura 14. Pode-se observar a presença dos ácidos graxos monoinsaturados com 20 carbonos e dos polinsaturados com

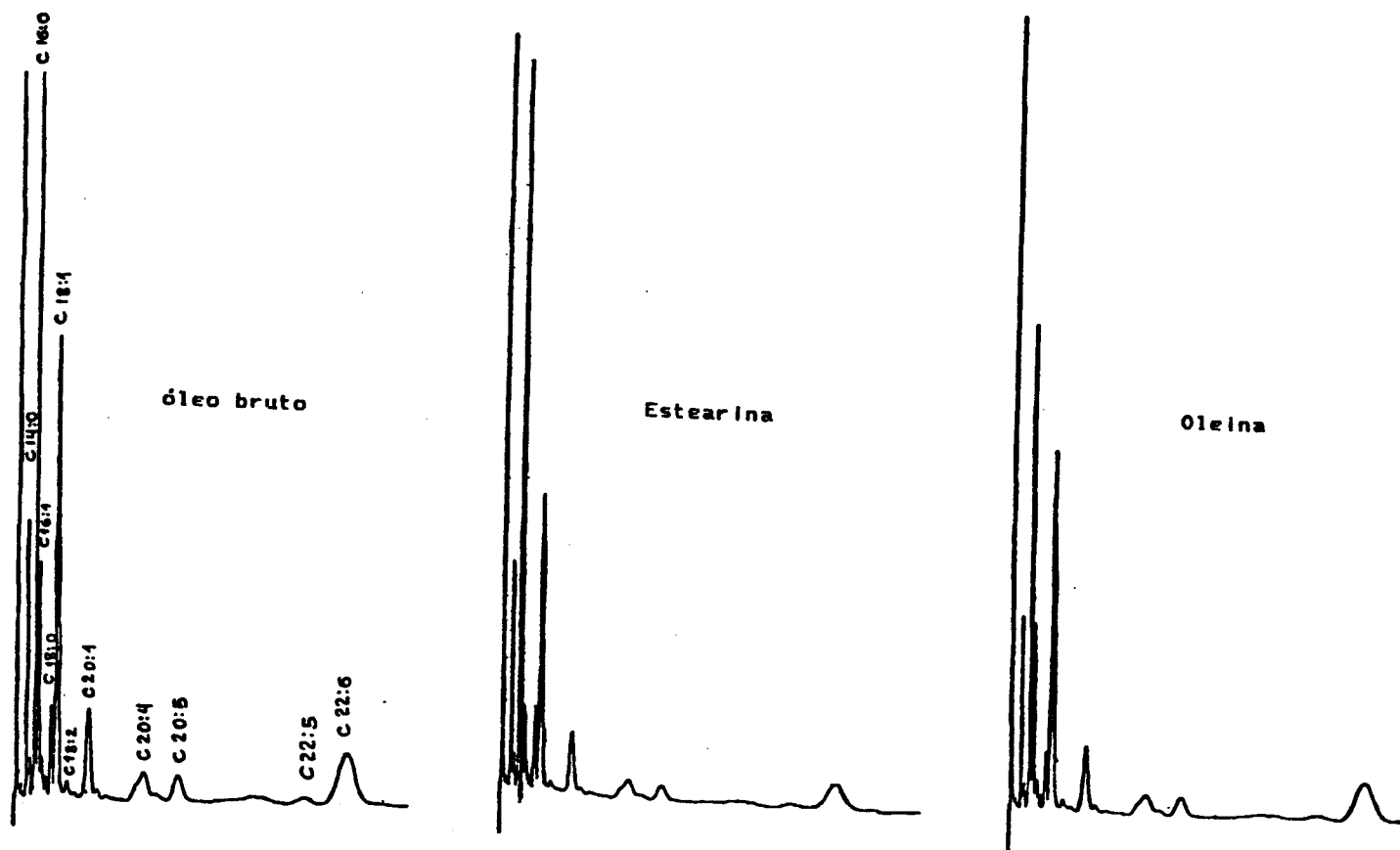


Figura 14. Cromatogramas dos ácidos graxos do óleo bruto do fígado de tubarão azul (*Prionace glauca*) e suas frações.

20 e 22 carbonos, os quais segundo KE et alii(1976), tem uma presença característica em lipídios marinhos, sendo documentados desde o advento das várias técnicas cromatográficas. Como ocorreu no óleo bruto integral (Tabela 14), vários autores como STANSBY (1982), ACKMAN (1979), GURGER (1967) e JACKOUT (1961), encontraram para óleo de pescados, de 25 a 35% de ácidos graxos saturados sendo o ácido palmítico o de maior teor. O alto conteúdo de ácidos graxos polinsaturados (do tipo ω -3) em óleo de fígado de tubarões, também foi reportado por SALVO et alii(1987) e BANJO (1979).

No óleo bruto, os ácidos graxos que participam em maior proporção são o oleico (C18:1), o palmítico (C16:0) e o docosahexaenóico (C22:6) respectivamente. No óleo fracionado observa-se uma proporção relativa diferente. Na fração oleína o ácido graxo que apresenta maior porcentagem é o oleico (C18:1), perfazendo um pouco mais de um quarto (26,6%) da composição total de ácidos graxos; a seguir estão o decosahexaenóico (C22:6) com 19,94% e o palmítico (C16:0) com 16,33%. Na fração estearina o ácido graxo de maior porcentagem em relação ao total é o palmítico, seguido pelo oleico e decosahexaenóico. A porcentagem do ácido graxo eicosapentaenóico (C20:5), característico dos óleos marinhos, apresentou pequenas variações em relação ao óleo bruto e suas frações, porém observa-se o efeito de concentração pelo fracionamento em ácidos graxos polinsaturados de baixíssimo ponto de cristalização na oleína resultante.

O maior efeito do fracionamento se encontra na porção dos ácidos graxos saturados (Tabela 14), sendo que a estearina con-

centrou em média 13,4% a mais de saturados que a oleína. O conteúdo total de ácidos graxos monoinsaturados é superior aos demais no óleo bruto e na oleína, apresentando o mesmo valor em ambas. Na estearina a proporção de ácidos graxos saturados apresentou-se ligeiramente superior aos ácidos graxos monoinsaturados. Em todos os casos o teor de ácidos graxos polinsaturados (32,84%) foi superior na oleína, apresentando uma diferença percentual de 4,69 em relação ao óleo bruto e 8,87 comparado a estearina.

ESTABILIDADE OXIDATIVA DO ÓLEO BRUTO E SUAS FRAÇÕES

A resistência à oxidação do óleo bruto, estearina e oleína foi avaliada através do método Rancimat, nas condições descritas anteriormente (Material e Métodos). Os períodos de indução (PI) calculados a partir das curvas de resistência à oxidação, obtidos em duplicatas de cada amostra, encontram-se na Tabela 15.

A estabilidade oxidativa do óleo bruto em relação às frações estearina e oleína, sem adição de antioxidantes, pode ser observada na Figura 15. Verifica-se que o período de indução do óleo integral (12,0 h) e da estearina (12,6 h) são muito próximos; no entanto a oleína apresentou um período de indução equivalente a dois terços do período de indução do óleo bruto, mostrando menor estabilidade. O fato da oleína ter uma menor estabilidade em relação ao óleo bruto, pode ser atribuído a seu maior conteúdo de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa presentes em sua composição e por apresentar inicialmente um teor de peróxido li-

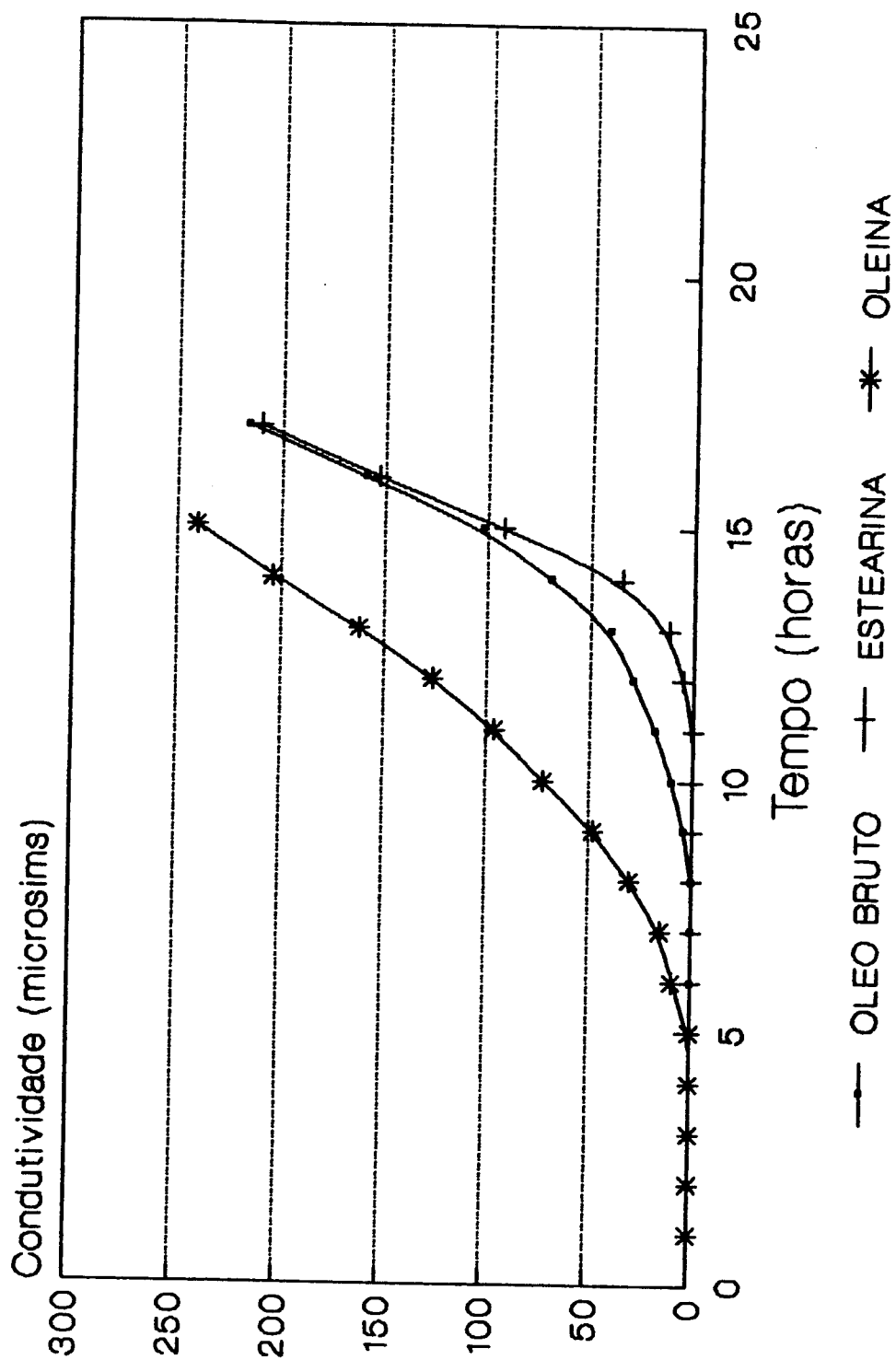


FIGURA 15 - Estabilidade oxidativa do óleo bruto de fígado de tubarão e suas frações. RANCIMAT 80 C x 20 L/h x 2,5 g

TABELA 15. Períodos de indução (PI) das amostras de óleo bruto de fígado de tubarão azul (Prionace glauca) e suas frações.

AMOSTRA	PI(horas)*	AMOSTRA	PI(horas)*
OB (SEM TRAT)	12,0	EST-BHT(0.01%)	14,0
OB -ANT(0.05%)	25,2	EST-TOC(0.05%)	15,1
OB -TBHQ(0.02%)	39,0	EST-PA(0.05%)	16,9
OB -TBHQ(0.01%)	25,0	EST-REN(0.20%)	28,2
OB -TBHQ(0.005%)	17,0	EST-REN(0.12%)	15,2
OB -BHT(0.01%)	12,7	EST-REN(0,04%)	13,9
OB -TOC(0.05%)	12,5	OLE(SEM TRAT)	8,0
OB -PA(0.05%)	17,4	OLE-ANT(0,05%)	21,5
OB -REN(0.20%)	26,6	OLE-TBHQ(0.02%)	23,8
OB -REN(0.12%)	16,4	OLE-TBHQ(0.01%)	17,5
OB -REN(0.04%)	13,3	OLE-TBHQ(0,005%)	13,8
EST(SEM TRAT)	12,6	OLE-BHT(0,01%)	8,4
EST-ANT(0.05%)	30,9	OLE-TOC(0.05%)	8,9
EST-TBHQ(0.02%)	37,9	OLE-PA(0,05%)	8,3
EST-TBHQ(0,01%)	27,7	OLE-REN(0.20%)	17,1
EST-TBHQ(0,005%)	19,8	OLE-REN(0.12%)	12,2
		OLE-REN(0.04%)	10,9

OB = óleo bruto

EST = estearina

OLE = oleina

ANT = ANTRACINE 220

TOC = TOCOMIX D

* Rancimat 80°C x 20L/h x 2,5 g
de amostra.

REN = RENOXAN A

() = concentração dos antioxidantes

geiramente superior ao óleo bruto. No entanto a estearina, que apresentou um índice de peróxido inicial ligeiramente superior ao óleo integral, devido ao maior teor em ácidos graxos saturados, apresenta maior resistência à oxidação. O comportamento oxidativo das frações obtidas de óleo de fígado foi inverso ao do óleo de dendê, conforme apresentado por TRUJILLO-QUIJANO et alii (1988) e YONG (1987). Segundo os autores, embora a oleína apresente maior conteúdo em ácidos graxos insaturados, ela apresenta uma elevada resistência à oxidação (superior à estearina) por ser rica em tocoferóis, carotenos e ferro. No óleo de fígado de tubarão a contribuição dos tocoferóis a sua estabilidade é insignificante, pois além de sua concentração ser pequena em relação aos óleos vegetais, predomina o alfa-tocoferol. Embora a forma alfa seja a de maior atividade biológica dentre os tocoferóis, é considerada a de menor atividade antioxidante (GOTTSTEIN e GROSCH, 1990).

A efetividade de alguns antioxidantes naturais adicionados ao óleo bruto (OB), estearina (EST) e oleína (OLE), encontram-se na figura 16. As amostras adicionadas de TOCOMIX D, composto por uma mistura de alfa e gama tocoferóis com citrato mono glicerídeo, apresentaram um período de indução ligeiramente superior ao controle, revelando pouca eficiência em prolongar a estabilidade oxidativa desses óleos (nas condições do teste Rancimat). O poder antioxidante do Tocomix D foi ligeiramente superior na estearina, cuja composição apresenta um maior conteúdo em ácidos graxos saturados. OLCOTT e VAN derVAN (1968), observaram que o alfa tocoferol isoladamente foi menos efetivo em prevenir a oxidação em

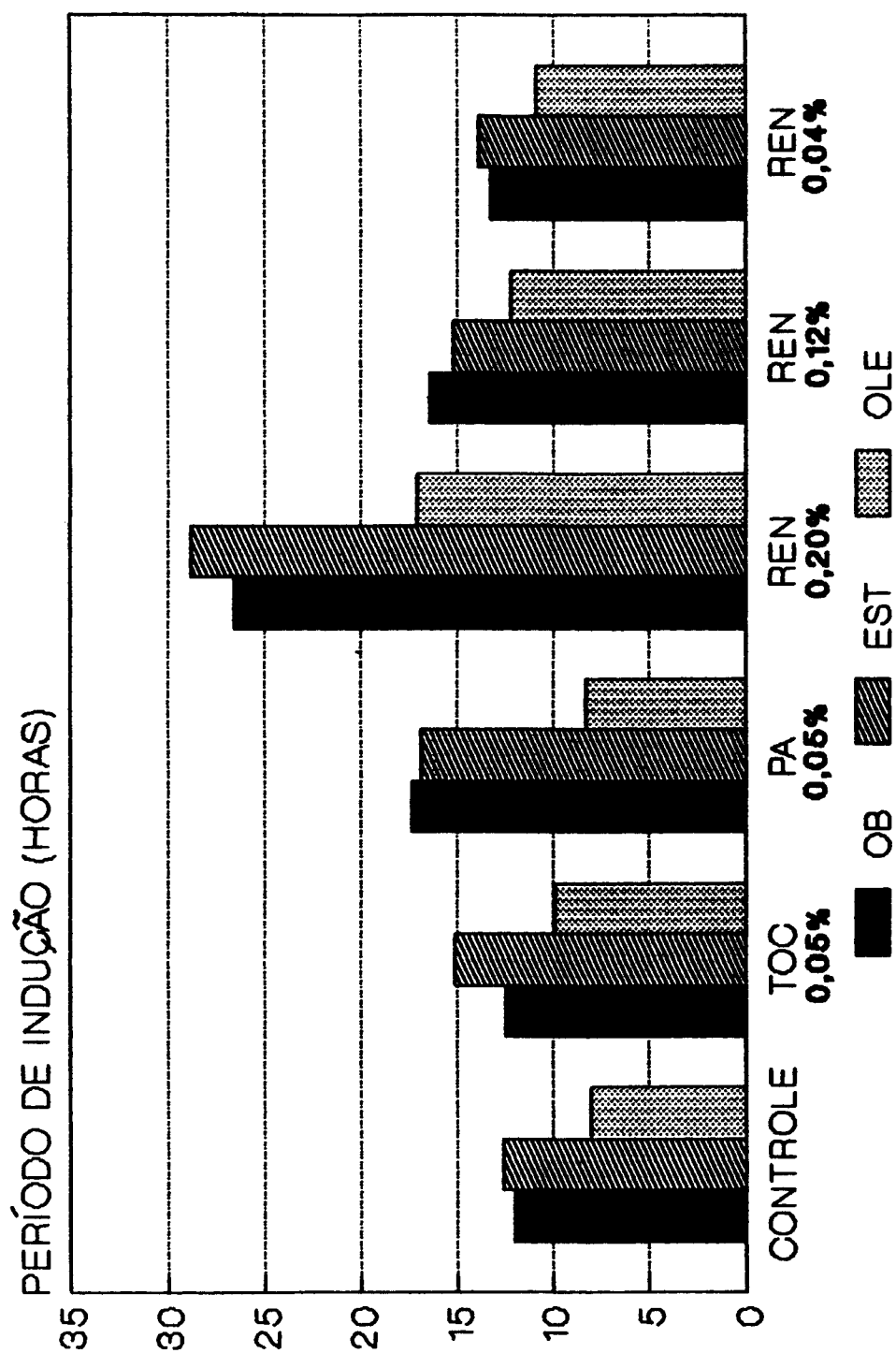


FIGURA 18 - Efetividade de antioxidantes naturais na estabilização do óleo bruto de fígado de tubarão azul e frações

óleo de arenque estocado à 37°C, do que o gama e o sigma tocoferóis. Cort(1974) num estudo comparativo da atividade antioxidante de alguns compostos em gordura de aves, suínos e bovinos encontrou que a eficiência do alfa-tocoferol foi a mesma do BHT e o gama-tocoferol superior ao BHA e BHT. No entanto, KE et alii(1977), estudando a potência antioxidante de vários compostos na oxidação dos lipídios de pele de cavala encontrou uma maior efetividade na seguinte ordem: TBHQ > ALFA-TOCOFEROL > ÓLEO DE SOJA FERMENTADO > BHA > BHT.

O palmitato de ascorbila adicionado ao óleo bruto protegeu-o somente por algumas horas a mais (4 horas) da oxidação. Segundo BOURGEOIS(1981), o palmitato de ascorbila é muito eficaz em prolongar a estabilidade oxidativa de óleos vegetais que contem tocoferóis naturais, mais que o BHT e/ou BHA; entretanto em gorduras animais, como em banha, ele não é eficiente. Cort (1974) constatou que em óleo de soja o P.A. na concentração de 0.01% é mais eficiente que o BHT e o BHA na concentração de 0.02%, de um modo geral, o P.A. isoladamente é pouco eficiente em retardar a oxidação. Dentre as três amostras o P.A. foi menos atuante em prolongar a estabilidade oxidativa da oleína, indicando menor eficiência em proteger óleos com elevado conteúdo em ácidos graxos polinsaturados e ainda baixo conteúdo de tocoferóis.

O antioxidante RENOXAN A(0,20%), composto por uma mistura de palmitato de ascorbila, alfa-tocoferol e lecitina, mostrou-se mais eficiente que o P.A. puro (Figura 16), indicando um efeito sinergista entre os componentes da mistura. BOURGEOIS e CZORNOMAZ (1982) num estudo sobre a atividade antioxidante do P.A., do dl-

alfa-tocoferol e fosfolípidios em banha, obteve, que a ação do P.A. isolado é pequena, no entanto a mistura dos três compostos mostrou-se muito eficiente. Desde 1936, OLCOTT e MATTIL demonstraram que o dl-alfa-tocoferol age em sinergismo com os fosfolípidios, especialmente com a cefalina e segundo SHERWIN (1976), a lecitina vem sendo usada como antioxidante em vários países por apresentar um efeito sinergista na presença de antioxidantes primários.

Numa avaliação do RENOXAN A em diferentes concentrações (0,20%, 0,12% e 0,04%), observa-se que o efeito em prolongar a estabilidade do óleo nas três amostras diminui quanto menor a concentração empregada (Figura 16). Na estearina, as concentrações de 0,20% e 0,12% apresentaram uma atividade similar.

Na Figura 17 observa-se a ação de alguns antioxidantes sintéticos no óleo bruto (OB), estearina (EST) e oleína (OLE), nas condições do teste Rancimat citadas anteriormente (Material e Métodos). A adição do BHT(0,01%), apresentou um período de indução sem alteração em relação ao óleo bruto puro, demonstrando que ele não possui nenhuma atividade antioxidante para esse tipo de óleo. ANTUNES E CANHOS (1983) afirmaram que o BHT pertence ao grupo de antioxidantes estericamente impedidos, no qual a reatividade do grupo fenólico é diminuída por substituintes na posição orto do anel aromático, no entanto tem-se observado um efeito sinérgico na mistura do BHT(0,01%) e BHA(0,01%) em banha. Tanto na estearina como na oleína o BHT apresentou um efeito similar à do óleo bruto, sendo ligeiramente mais eficiente na estearina. Esses resultados concordam com a afirmação de SHERWIN(1976), de que o

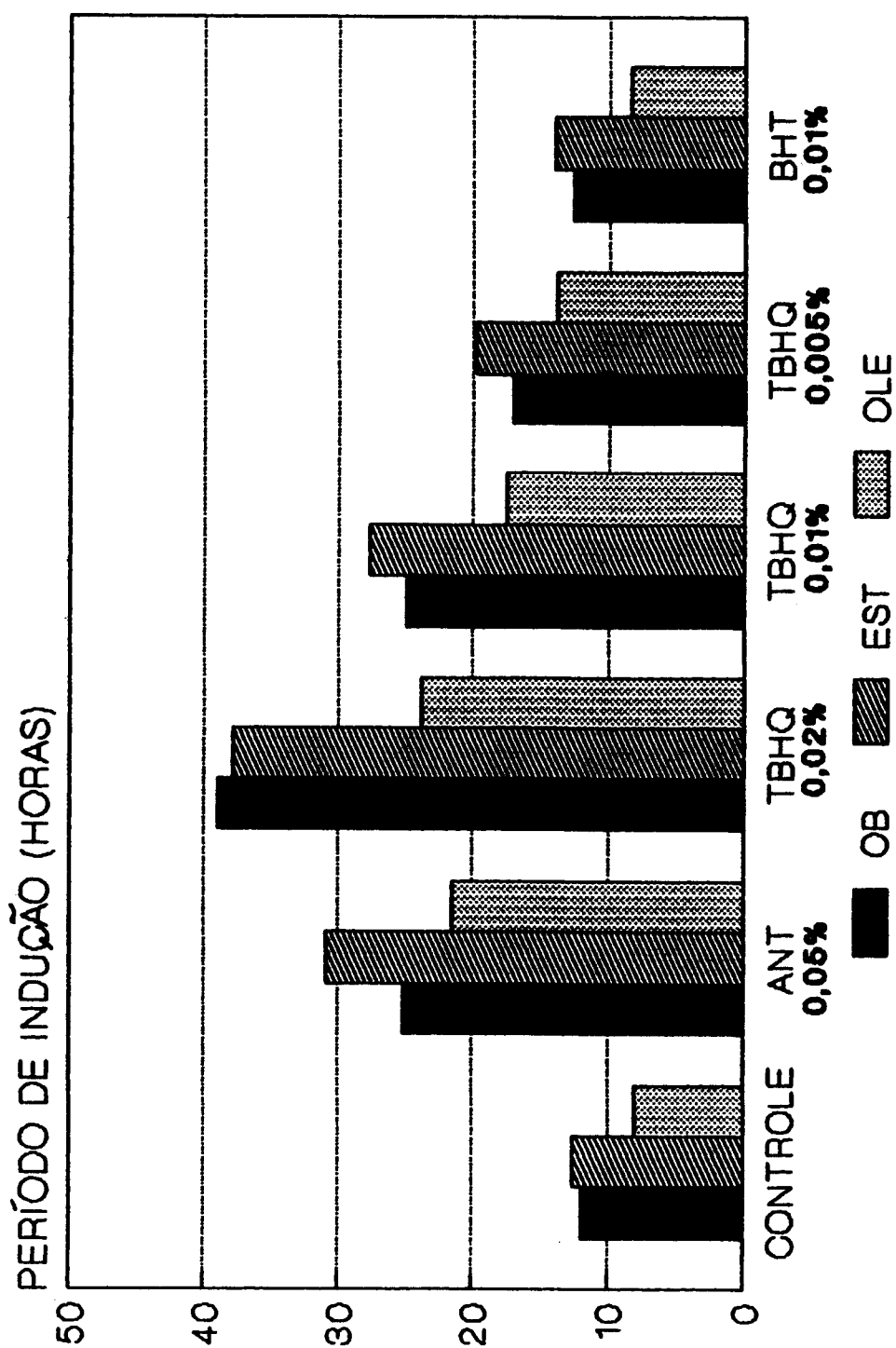


FIGURA 17 - Efetividade de antioxidantes sintéticos na estabilização do óleo bruto de fígado de tubarão azul e frações

BHT provê relativamente baixa efetividade para óleos vegetais mais insaturados, sendo mais utilizado em combinação com outros antioxidantes primários.

O ANTRACINE 220 (0,05%), composto de uma mistura de TBHQ e ácido ascorbico, mais que duplicou o período de indução (25,2 e 30,9 horas) da amostra OB-ANT(0,05%) e EST-ANT(0,05%) respectivamente, em relação ao controle. O ANTRACINE 220 mostrou-se mais efetivo na amostra OLE-ANT(0,05%), indicando que existe um efeito sinergista muito eficaz entre os componentes da mistura retardando a oxidação de óleos altamente insaturados. O sinergismo entre o ácido cítrico e o TBHQ também tem apresentado resultados favoráveis na estabilização do óleo de dendê refinado, sendo recomendado sua utilização durante o transporte (SANG,1984).

De todos os antioxidantes utilizados nessa fase o TBHQ mostrou-se mais efetivo (Figura 17), aproximadamente triplicando o período de indução da amostra OB-TBHQ(0,02%) em relação ao controle. FRISTCHE e JOHNSTON (1988) avaliaram a autooxidação do óleo de pescado em dietas e concluíram que a adição de 0,02% de TBHQ ao óleo de "menhaden" era o mais apropriado, prevenindo sua deterioração por um período mínimo de 72 horas em condições ambientais. THOMOLUS(1982) estudou a ação antioxidante do BHA, BHT e TBHQ em óleo de girassol (à 75°C), encontrando uma superioridade do TBHQ em relação aos demais na prevenção à oxidação. TOLEDO, ESTEVES e HARTMAN(1985) avaliando a eficiência de vários antioxidantes em óleo de soja encontraram que o TBHQ é superior ao BHA, BHT e galatos em prevenir a oxidação, ficando o P.A. numa posição igual ou ligeiramente superior ao BHT. Esses resultados concordam

com os de SHERWIN e THOMPSON(1967) para óleo de algodão, soja e açafrão.

O comportamento das amostras adicionadas de TBHQ a diferentes concentrações podem ser observadas na Figura 17, em todos os casos o comportamento antioxidante foi similar. No OB as amostras adicionadas de ANTRACINE-220 (0,05%) e TBHQ (0,01%) mostraram aproximadamente o mesmo período de indução, ou seja 24,8 e 23,9 horas respectivamente. Nota-se que o ANTRACINE 220, constituído de uma mistura de TBHQ com ácido cítrico, não apresentou um poder antioxidante superior ao TBHQ puro na concentração de 0.02% para o óleo do fígado de tubarão. No entanto na fração oleína os valores do período de indução das amostras OLE-ANT(0,05%) e OLE-TBHQ(0,02%) encontram-se próximos, enquanto no óleo bruto e na estearina, o período de indução das amostras adicionadas de ANTRACINE 220 se aproximaram mais daquelas contendo TBHQ na concentração de 0.01%. Nossos resultados concordam com os de CHAHINE e MCNEILL (1974), onde numa avaliação da efetividade de vários antioxidantes na estabilização do óleo bruto de baleia e na manutenção dessa estabilidade no óleo desodorizado, encontrou a seguinte ordem decrescente de efetividade: TBHQ > BHA > di-BHA > PG. Ele testou uma mistura de TBHQ + 0,01 % de ácido cítrico, sendo que o efeito sinérgico do ácido cítrico sobre a estabilidade oxidativa do óleo foi um tanto menor na presença do TBHQ, acusando um efeito negativo nos resultados de estocagem .

O TBHQ, tanto no óleo bruto como nas suas frações mostrou-se mais eficiente em aumentar a estabilidade oxidativa dos mesmos, nas condições empregadas. Segundo SHERWIN e THOMPSON (1967),

a estrutura do TBHQ mostra que os dois grupos hidroxil estão na posição para, os quais permitem ao composto reagir rapidamente com radicais livres, sendo responsáveis por sua capacidade antioxidante. KURECHI, AIZAWA e KUNUGI (1983) em seus estudos sobre o mecanismos de ação do antioxidante TBHQ e suas mudanças químicas durante sua ação, isolaram dois compostos formados da oxidação do TBHQ durante o processo oxidativo. Um dos compostos isolados, o derivado benzofurano mostrou conservar uma forte atividade antioxidante. Acredita-se que características dessa natureza contribuam para a superioridade da ação antioxidante do TBHQ em relação aos outros antioxidantes testados. Vários autores como HAU-MAN(1990a), TOLEDO et alii(1985); HAAGSMA et alii(1982), SHERWIN(1976), concordam com a superioridade do TBHQ na estabilização de óleos insaturados tais como soja, semente de girassol, açafoa e pescado.

A ordem decrescente de efetividade dos antioxidantes em preservar a estabilidade oxidativa do óleo bruto integral e suas frações foi a seguinte:

ÓLEO BRUTO

TBHQ(0.02%) > REN(0.20%) > ANT(0.05%) > TBHQ(0.01%) >
 PA(0.05%) > TBHQ(0.005%) > BHT(0.01%) > TOC(0.05%)>
 REN(0.12%) > REN(0.04%).

ESTEARINA

TBHQ(0.02%) > ANT(0.05%) > REN(0.20%) > TBHQ(0.01%) >
 TBHQ(0.005%) > PA(0.05%) > REN(0.12%) = TOC(0.05%) >
 BHT(0.01%) = REN(0.04%).

OLEINA

TBHQ(0.02%) > ANT(0.05%) > TBHQ(0.01%) > REN(0.20%) >
TBHQ(0.005%) > REN(0.12%) > REN(0.04%) > TOC(0.05%) =
BHT(0.01%) = PA(0.05%).

Os resultados do estudo da resistência à oxidação, empregando-se os dois grupos de antioxidantes, mostram que os de maior efetividade dentre os antioxidantes naturais foi o RENOXAN A, e o TBHQ no grupo dos sintéticos. Por comparação dos períodos de indução do óleo bruto e suas frações, resultantes da adição dos antioxidantes acima, verifica-se que a efetividade do RENOXAN A na concentração de 0.20% é relativamente similar à do antioxidante TBHQ na concentração intermediária, ou seja 0.01%.

Embora o antioxidante RENOXAN A seja recomendado para estabilização de gorduras animais e óleos vegetais insaturados (ROCHE, 1983), considerando a composição em ácidos graxos excepcionalmente insaturados e o baixo teor de tocoferóis naturais no óleo de fígado de tubarão e frações, seria conveniente realizar estudos posteriores sobre a concentração dos componentes do RENOXAN A (Tabela 6), a fim de verificar se é possível uma mistura de maior poder antioxidante para este tipo de material. Acredita-se que esse antioxidante seja mais indicado pela inocuidade dos seus componentes naturais, sendo aprovados pelas autoridades sanitárias de todos os países, adequando-se a preferência atual dos consumidores por alimentos e aditivos naturais (HAUMAN, 1990b).

V. CONCLUSÕES

O alto teor de óleo (80% base seca) existente no fígado do tubarão azul, permite a utilização de técnicas e equipamentos simples de extração, resultando em custos operacionais menores em relação as técnicas usadas em óleos vegetais.

O óleo de fígado mostrou uma composição elevada em ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa (28%), apresentando uma forte tendência à deterioração oxidativa.

Do fracionamento do óleo do óleo bruto por um período de 24 horas a -50°C, resultou uma fração sólida (estearina, 32%) e outra líquida (oleína, 68%), sendo a estearina ligeiramente mais estável que o óleo bruto, dado a sua composição mais elevada em ácidos graxos saturados (38%).

O fracionamento ocasionou um aumento de 5% no teor de ácidos graxos polinsaturados na oleína, porém a estabilidade dessa fração diminuiu um terço, quando comparados com o óleo bruto.

O antioxidante TBHQ (sintético) foi o mais eficiente na estabilização do óleo de fígado de tubarão e suas frações, aumentando em aproximadamente três vezes seu período de indução, quando usado na concentração de 0.02%.

As menores atividades antioxidantes foram apresentadas pelo BHT (sintético) e o TOCOMIX D (γ - e α -tocoferol, naturais), tanto no óleo bruto quanto nas frações.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- A.B.I.A. Compendio da legislação de alimentos. 3. rev. São Paulo, 1988. p:27-30.**
- A.O.C.S. Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society. 3.ed. Washington,1987. v.1-2**
- F.A.O. Marine oils-fish and whale oil. In: PADLEY,F.B; GUNSTONE, F.D.; HARWOOD,J.L. The lipids handbook. London, Chapman and Hall, 1986. p.130.**
- I.U.P.A.C. Standard methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington, 1979.**
- I.B.G.E. Estatística da Pesca. Fundação Instituto Brasileiro de geografia e Estatística, Rio de Janeiro, 1978-1987**
- S.U.D.E.N.E. Avaliação do potencial de tubarões da costa nordeste do litoral brasileiro. 2.ed. Rio de Janeiro, Edições Marítimas,1986. p.113.**
- ABU-NASR,A.M.; POTTS,W.M.; HOLMAN,R.T. Highly unsaturated fatty acids. II Fractionation by urea inclusion compounds. J. Am. Oil Chem. Soc.31(1):16-20,1954.**

- ACKMAN,R.G. Fish lipids - Part 1. In: CONNEL,J.J. Advances in fish science and technology. Farnham, Fishing News Books, 1979. p.86-102.
- ACKMAN,R.G. Fatty acid composition of fish oil. In: BARLOW,S.M. & STANSBY,M.E. Nutritional evaluation of long-chain fatty acids in fish oil. London, Academic Press, 1982. p.25-88.
- ACKMAN,R.G. Concerns for utilization of marine lipids and oils. Food Technol. 42(5):151-155,1988a.
- ACKMAN,R.G. Oil and fats group international lectures. Chem. Ind. (5):139-145,1988b.
- ACKMAN,R.G. & LINKE,B.A. Autoxidation of polyunsaturated fatty acids compounds in mackerel oil: formation of 2,4,7-deca trienals. J. Am. Oil Chem. Soc. 52(9):349-353,1975.
- ACKMAN,R.G.; RATNAYAKE,W.M.N.; OLSSON,B. The "basic" fatty acid composition of Atlantic fish oils: Potential similarities useful for enrichment of polyunsaturated fatty acids by ureia complexation. J. Am. Oil Chem. Soc.65(1):136-138,1988.
- ADDIS,P.B. Occurrence of lipid oxidation in foods. Food Chem. Toxicol. 24 (10/11):1021-1080,1986.

- AMORIM,A. & ARFELLI,C.A. Comunicação pessoal. Santos, Instituto de Pesca, 1990.
- AMORIM,A. & ARFELLI,C.A. Informe da I reunião do grupo de trabalho sobre pesca e pesquisa de tubarões e raias no Brasil. Santos, Instituto de Pesca, 1985. p.51-54.
- AMORIM,A.; ARFELI,C.A.; BRAGA,F.M.S. Resumos da III reunião do grupo de trabalho sobre pesca e pesquisa de tubarões e raias no Brasil. Santos, Instituto de Pesca, 1987. p.3-4.
- AMORIM,A.; ARFELLI,C.A.; GADID,O.B.F. Aspectos gerais sobre a biologia dos tubarões. Brasília, SUDEPE, 1986. p-16-18.
- ANTUNES,A.J. & CANHOS,V.P. Aditivos em alimentos. São Paulo, Secretaria da Indústria, Comercio, Ciência e Tecnologia, 1983. p.116.
- AURE,L. Manufacture of fish-liver oil. In: STANSBY,M.E. Fish oils. Westport, Avi, 1967. p.193-221.
- BALTES,J. L'huile de palme: technologie et utilisations-II. Rev. Fr. Corps Gras. 22(6):305-311,1975.
- BANJO,A.O. Composition and properties of shark liver oil and liver residue. J. Food Technol. 14 (2):107-113,1979.

BARLOW,S. Beneficial medical effects of fish oils. Infofish Mark. Dig. (1):38-40,1987.

BARLOW,S. & YONG,V. New uses for fish oils. Food Manuf.(10): 75-78,1988.

BATEMAN,L. Olefin oxidation. Rev. Chem. Soc. 8:147-167,1954.

BEARE-ROGERS,J. Nutritional atributes of fatty acids. J. Am. Oil Chem. Soc. 65(1):109-117,1988.

BEEBE,J.M.; BROWN,P.R.; TURCOTTE,J.G. Analitical-scale high-performance liquid chromatography of omega-3 fatty acid esters derived from fish oils. J. Chromatogr.,468: 225-233,1989.

BIRKER,P.W.L. & PADLEY,F.B. Physical properties of fats and oils. In: HAMILTON,J.R. & BHATY,A. Recent advances in chemistry technology of fats and oils. England, Elsevier Applied Science, 1987. p.1-10.

BLIGHT.E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can. J. Biochem. Phisiol.(37):911-917,1959.

BLOCH,M. Estudos sobre fosfatídios em óleo de soja. Campinas, FEA, 1983. Tese (mestr.)- Univ. Est. Campinas.

BOURGEOIS,C.F; CZORNOMAZ,A.M.; PAGES,P. Etudes concernant a solubilization du palmitate d'ascorbyle dans les huiles vegetales. Rev. Fr. des Corps Gras 29(8/9):319-324,1982.

BOURGEOIS,C.F. Proprietés antioxygènes des tocophérols et du palmitate d'ascorbyle dans les matières grasses. Rev. Fr. Corps Gras. 28(9):353-356,1981.

BORGEOIS,C.F. & CZORNOMAZ,A.M. Utilization du palmitate d'ascorbyle de l'alfa-tocophérol et des phospholipides pour stabiliser de saindoux. Rev. Fr. Corps Gras.29 (3):111-116,1982

BROCKEFORDHOFF,H.; HOYLE,H.J.; WANG,P.C. & LITCHFIELD,C. Positional distribution of fatty acids in depot triglycerides of aquatic animals. Lipids 3(1):24-29,1968.

BRODY,J. Fisheries by products technology. Westport, Avi, 1965. p.47-85.

BUCK,D.F. Antioxidants in soya oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 58(3):275-279, 1981.

BURANUDEEN,F. & RAJADURAI,R. Squalene. Infofish Mark. Dig. (1):42-43,1986.

- BURMEISTER, M.A. Determination of vitamin A content of shark liver oil. *Leaflet Ser.*, 4(10):1-4, 1968.
- CARLSSON, D.J.; SUPRUNCHUK, T.; WILES, D.M. Photooxidation of unsaturated oils: effects of singlet oxygen quenchers. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 53(10):656-659, 1976.
- CHAINED, M.H. & MACNEILL, R.F. Effect of stabilization of crude whale oil with tertiary butyl hydroquinone and other antioxidants upon keeping quality of resultant deodorized oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51(3):37-41, 1974.
- CHAN, H.W.S.; COXON, D.T.; PEERS, K.E.; PRICE, K.R. Oxidative reactions of unsaturated lipids. *Food Chem.*, 9(1/2):21-34, 1982.
- CHANG, S.S. Processing of fish oils. In: STANSBY, M.E. *Fish oils* Westport. Avi, 1967. p.283-288.
- CHANG, S.S. Fish oil industry awaits next approval: what's in those capsules? *Inform* 1(2):117, 1990.
- COLLINS, C.H. & BRAGA, G.L. *Introdução à métodos cromatográficos*. 3.ed. Campinas, Ed. UNICAMP, 1988. p.154.
- CONTRERAS, G.E. & STRONG III, F.G. Determination of tocopherol (vitamin E) by reduction of cupric ion. *J. Ass. Anal. Chem.* 65:1215-1221, 1982.

- CORT,W.M. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. J. Am. Oil Chem. Soc.51(7):321,1974.
- CRAICK,J.C.A. The lipid of six species of sharks. J. Mar. Biol. U.K. 58:913-921,1978.
- deMAN,J.M. & deMAN,L.A. Automated AOM test for fat stability. J. Am. Oil Chem. Soc. 61(3):534-536,1984.
- deMAN,J.M.; TIE,F.; deMAN,L. Formation of short chain volatile organic acids in the automated AOM method. J. Am. Oil Chem. Soc.64(7):993-996,1987.
- DOMART,C.; MIYAUCHI,D.T.; SUMERWELL,W.N. The frationation of marine oil fatty acids with urea. J. Am. Oil Chem. Soc. 2(9):481-483,1955.
- DUGAN,L.R. Lipids. In: FENNEMA,O.R. Principles of food science. New York, Marcel Dekker, 1976. p.138-204
- DZIEZAK,J. Presevatives:antioxidants. Food Tecnology 40 (9): 94-102,1986.
- DZIEDZIC,S.C. & HUDSON,B.J.F. Phosphatidil ethanolamine as a synergist for primary antioxidants in edible oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 61(6):1042-1045,1984.

- DYEBERG, J. & BANG, H.O. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis. *Lancet* (7):117, 1978.
- EASTMAN - CHEMICAL PRODUCTS INC. Kingsport. Tennessee 37662.
Publication n0ZG 109A, 1974.
- EINING, R.G. & ACKMAN, R.G. Omega-3 PUFA in marine oil products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64(4):449-502, 1987.
- EMOKPAE, A.O. & ANEKWE, G.E. Characterization of the non saponificavel fraction of the liver lipids of the shark Charchiarias taurus by mass-spectrometry. *Comp. Biochem. Physiol.* 74B(3):661-665, 1983.
- FARMER, E.H.; KOCH, H.P.; SUTTON, D.A. The course of autoxidation reactions in polyisoprenes and allied compounds. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 20(11):541, 1943.
- FRANK, E.N. Lipid oxidation: mechanisms, products and biological significance. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 61(12):1908-1917, 1984.
- FRANK, J.; GEIL, J.V.; FREASO, R. Automatic determination of oxidation stability of oil and fatty products. *Food Technol.* 36(6):71-76, 1982.
- FRANKEL, E.N. Chemistry of free radical and singlet oxidation of lipids. *Prog. Lip. Res.* 23(4):197-221, 1985,

- FRANKEL,E.N.; NEFF,W.E.; ROHWEDDER,Y.K.; KHAMBAY,B.P.S.; GARWOOD R.F.; WEEDON,B.C.L. Analysis of autoxidized fats by gas chromatography mass spectrometry II . methyl linolenate. *Lipids* 12(12): 1055-1061,1977.
- FRITSCHKE,K.L. & JOHNSTON,P.V. Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J. Nutr.*118(4):485-426,1988.
- GELPI,E. & ORO,J. Gas-cromatografic-mass spectromic analisis of isoprenoid hidrocarbons and fatty-acids in shark liver oil products. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 45(3):144-147,1968.
- GERSHBEIN,L.L. & SINGH,E.J. Hidrocarbons of dogfish and cod livers and herring oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 46 (10):554-557, 1969.
- GOPAKUMAR,K. & THANKAPDAN,T.K. Squalene,its source, uses and industrial aplications. *Sea Food Export J.* (3):17-21,1986.
- GORDIEVSKAYA,V.S. Shark flesh in the food industry. Vladivostok, Pacific Scientific Research Institute of Marine Fisheries and Oceanografy (TINRO), 1971. p.9-24
- GOTTSTEIN,T. & GROSCH,W. Model study of different antioxidant properties of and tocopherols in fats. *Fat Sci. Tecnol.* 92(4):139-144,1990.

- GUNSTONE, F.D. & NORRIS, F.A. *Lipids in food chemistry, biochemistry and technology*. Oxford, Pergamon Press., 1983, p.139-165.
- GRAY, J.I. Measurement of lipid oxidation: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 55 (6):539-546, 1978.
- GRUGER, E.M. Fatty acid composition of oils from 21 species of marine fish, freshwater fish and shellfish. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 41:662-667, 1964.
- HAAGSMA, N.; GENT, C.M.; LUTEN, J.B.; JONG, R.W. & DOORN, E. Preparation of a concentrate from cod liver oil. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 59(3):117-118, 1982.
- HARDORN & ZURKER. In: deMAN, J.M.; TIE, F. & deMAN, L. Formation of short chain volatile organic acids in automated AOM method. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 64(7):993-996, 1987.
- HARDY, R. Fish lipids - Part 2. In: CONNELL, J.J. *Advances in Fish Science and Technology*. Farnham, Fishing News Books, 1979. p.104
- HARDY, R. & KEAY, J.N. Seasonal variations in the chemical composition of cornish mackerel, Scomber scombrus (L), with detailed reference total lipids. *J. Food Technol.* (7):125-137, 1972.

HARDY,R.; SMITH,J.; MACKIE,P.R. A column chromatographic method for the fractionation of fish neutral lipids. J. Chromatogr. 57:142-144,1971.

HARRIS,W.S. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. J. Lipid Res. 30 (6):785-807,1989.

HARTMAN,L.; LAGO,R.C. & ESTEVES,W. Determination of phosphorus in Brazilian soya bean oils by the saponification method. Fette Seif. Anstrichm. 87(11):458-460,1985.

HARTMAN,L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Prat. 22(8):475-476,1973.

HARTMAN,L. & ESTEVES,W. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. São Paulo, Secretaria da Indústria e Comércio, 1983. p.169

HAUMAN,B.F. Fish oil industry awaits next approval. Inform 1 (2):114-116, 1990a.

HAUMAN,B.F. Antioxidants: firm seeking products they can label as "natural". Inform 1(12):1002-1013, 1990b.

- HARDY,R.; SMITH,J.; MACKIE,P.R. A column chromatographic method for the fractionation of fish neutral lipids. J. Cromatogr. 57:142-144,1971.
- HARRIS,W.S. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. J. Lipid Res. 30 (6):785-807,1989.
- HARTMAN,L.; LAGO,R.C. & ESTEVES,W. Determination of phosphorus in Brazilian soya bean oils by the saponification method. Fette Seif. Anstrichm. 87(11):458-460,1985.
- HARTMAN,L. & LAGO, R.C.A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. Lab. Prat. 22(8):475-476,1973.
- HARTMAN,L. & ESTEVES,W. Tecnologia de óleos e gorduras vegetais. São Paulo, Secretaria da Indústria e Comercio, 1983. p.169
- HAUMAN,B.F. Fish oil industry awaits next approval. Inform 1 (2):114-116, 1990a.
- HAUMAN,B.F. Antioxidants: firm seeking products they can lable as "natural". Inform 1(12):1002-1013, 1990b.

- HAZEL, J.R. The influence of temperature adaptation on the composition of neutral lipid fraction of Rainbow trout (Salmo gairdneri) liver. J. Exp. Zool. (207):33-42, 1979.
- HEARN, T.L.; SGOUTAS, S.; HEARN, J.A.; SGOUTAS, D.S. Polyunsaturated fatty-acids and fat in fish flesh for selecting species for health benefits. J. Fd Sci. 52(5):1430-1431, 1987.
- HEPBURN, F.N.; EXLER, J.; WEIHRAUCH, J.L. Provisional tables on the content of omega-3 fatty acids and other fat components of the selected foods. J. Am. Diet. Assoc. 86(6):788-793, 1986.
- HERMSDORFF, G. & PECKOLT, O.L. Riqueza vitamínica dos óleos de fígados dos peixes desmobrânquios brasileiros. B. Minist. Agric. (7/9), 1939.
- HEROLD, P.M. & KINSELLA, J.E. Fish oil consumption and decreased risk of cardiovascular disease: a comparison of findings from animal and human feeding trials. Am. J. Clin. Nutr. 43:566, 1986.
- HORWITZ, W. Official Methods for Analysis of Association of Official Analytical Chemists. Washington, AOAC, 1980. 1018p
- HSIEH, T.C.; WILLIAMS, S.; VEJAPHAN, W.; MEYERS, S.P. Characterization of volatile components of menhaden fish (Bravoortia tyrannus) oil. J. Am. Oil Chem. Soc. 66(1):114-117, 1989

- JACQUOT,R. Organic constituents of fish and other aquatic animal foods. In: BORGSTROM,G. **Fish as food**. New York, Academic Press, 1961. p.146-209
- KARAHADIAN,C. & LINDSAY,R.C. Evaluation of the mechanism of Dilauryl thiodipropionate antioxidant activity. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 65(7):1159-1165,1988.
- KE,P.J.; NASH,D.M.; ACKMAN,R.G. Mackerel skin lipids as an unsaturated fat model system for the determination of the antioxidative potency of TBHQ and other antioxidant compounds. **J. Am. Oil Chem. Soc.** 54(10):417-420,1977.
- KEIRI,M.S.A. Present and prospective development in the palm oil industry. **J. AM. Oil Chem. Soc.** 62(2):210-219,1985.
- KHAYAT,A. & SCHWALL,D. Lipid oxidation in seafood. **Food Technol.** 37(7):130-140,1983.
- KING, D.; LEACH, I.; POULTER,R.G. Utilization of sharks. **Fish. Newsl.** 30(7):21-28,1984.
- KINSELLA,J.E. Food lipids and fatty-acids: importance in food quality, nutrition and healths. **Food Technol.** 30 (7): 124-230, 1988.

- KINSELLA, J.E. **Seafoods and fish oils human health and disease.**
New York, Marcel Dekker, 1987. p.177-237
- KREUZER, R. & AHMED, M.L. **Shark utilization and marketing.** Rome,
Food and Agriculture Organization of the United
Nations, 1978. p.1-45
- KURECHI, T.; AIZAWA, M.; KUNUGI, S. Study on the antioxidants XV-
II: oxidation product of tertiary butyl hydroquinone (TBHQ). *J. Am. Oil Chem. Soc.* 60(11):1878-1882, 1983.
- LABUZA, T.P. Kinetics of lipid oxidation in foods. *CRC Crit. Rev. Food Technol.* 2(3):355-405, 1971.
- LAMBERTSEN, G. **Lipids in fish fillet and liver. A comparison of fatty acid composition.** Reports on technological research concerning Norwegian fish industry. Bergen, Norway, 1972. 16p
- LANSON, H.W. **Standards for fats & oils.** Westport, AVI, v.5. 1985. p.15-19
- LAUBLI, M.W. & BRUTTEL, P.A. Determination of the oxidative stability of fats and oils: comparison between the Active Oxygen Method (AOCS cd 12-57) and the Rancimat method. *J. Am. Chem. Soc.* 63(6):792-795, 1986.

- LEENHEER,A.P.; HANS,J.; LAMBERT,W.E.; deRUITER,G.M. Vitamin A: retinol, carotenoids and related compounds. In: LEENHEER,A.P. LAMBERT,W.E.; deRUYTER,G.M. Modern cromatographic -analysis of the vitamins. New York, Marcel Dekker, 1985,v.30. p.1-72
- LITCHFIELD,C.; GREENBERG,A.J.; ACKMAN,R.G. & EATON,G.A. Lipids of the Pacific beaked whale. Lipids 13(12):860-866,1978.
- LOLIGER,J. Natural antioxidants. In: HAMILTON,R.J. & ALLEN,J.C. In: Rancidity in foods. London, Applied Science Publisher, 1983. p.89-107.
- LOONEY,R.F. Oil and fats. In: DEBUSSY,J.H. Materials and tecnology. London, Longman Group, v.3, 1975. p.1-139
- LOVE,R.M. The Chemical Biology of fish. London, Academic Press, v.2, 1980. 943 p
- LUNDBERG,W.O. General deteoration reaction. In: STANSBY, M.E. Fish oils. Westport, Avi, 1967. p.141-147
- MALINS,D.C. Classes of lipids in fish. In: Stansby,M.E. Fish oils. Westport, Avi, 1967. p.31-42

MARQUESAN, M.A. Obtenção e caracterização de um concentrado de tocoferóis (vitamina E) a partir do destilado da desodorização do óleo de soja. Campinas, FEA, 1988. Tese (mestr.) - Univ. Est. Campinas.

MIGUEL, A.M. Utilização do Rancimat para determinação do período de indução de óleos comestíveis. Campinas, FEA, 1988. Tese (mestr.) - Univ. Est. Campinas.

MIWA, K. Fish oil and fish liver oil. In: Utilization of marine products: Book for marine fisheries research course. Tokyo, Overseas technical Cooperation, 1972. p.111-119

MORTON, R.A. Extraction of vitamin A containing from shark livers. Leaf. Ser., 3(9):1-3, 1968.

NAWAR, W.W. Lipids. In FENNEMA, D.R. Food chemistry. New York, Marcel Dekker, 1985. p.140-223

NILSSON, W.B.; GAUGLITZ JR., E.J.; HUDSON, J.K.; STOUT, V.F.; SPINELLI, J. Fractionation of menhaden oil ethyl esters using super critical fluid CO₂. J. Am. Oil Chem. Soc. 65 (1):109-117, 1988.

OLCOTT, H.S. Antioxidants. In: STANSBY, M.E. Fish oils. Westport Avi, 1967. p.56-65.

- OLCOTT, H.S. & VAN DER VEEN. Comparision of antioxidant activities of tocol and its methyl derivatives. *Lipids* 3(4): 331, 1968.
- OGAWA, M.; KOMAKI, T. & NUNES, M.L. Industrialização de cações no nordeste brasileiro. Aproveitamento do óleo vitaminado do fígado. *Arq. Ci. mar* 13(2):105-107, 1973.
- PADLEY, F.B.; GUNSTONE, F.D.; HARWOOD, J.L. Marine oils-fish and wale oils. In: PADLEY, F.B.; GUNSTON, F.D.; HARWOOD, J.L. *The lipid handbook*. London, Chapman and Hall, 1986. p. 130-141
- PARENTE, E.S. & NUNES, M.L. Sobre a industrialização de cações do nordeste brasileiro. II- Aproveitamento da pele. *Arq. Ci. Mar* 13 (2):99-103, 1973.
- PEYRONEL, D; ARTAUD, J; IATRIDES, M.C; RANCUREL, P.; CHEVALIER, J. Fatty-acids and squalene composition of mediterranean Centrophorus SPP egg and liver oil in relation to age. *Lipids* 19(9):643-648, 1984.
- PICLET, G. Le poisson aliment: composition - intérêt nutritionnel. *Cah. Nutr. Diét.* 22(4):317-336, 1987.
- PICHE, L.A.; DRAPER, H.H.; COLE, P.D. Malondialdehyde excretion by subjects consuming cod liver oil vs a concentrate of n-3 fatty-acids. *Lipids* 23(4):370-371, 1988.

PONGRAZ,G. Antioxidant mixtures for use in foods. Int.J. Vit.
Res. 43(4):517-525,1973.

PRESTON,G.L. Market requiriments for shark products. SPC
Fish. News1. 30:29-31,1984.

QUEIROZ,M.I. & FURLONG,E.B. Avaliação do grau de oxidação do
óleo de pescado. Hig. Alim. 4(4):201-210,1985.

RATNAYAKE,W.M.N.; OLSSON,B.; MATTHEWS,D.; ACKMAN,R.G.
Preparation of omega-3 concentrates from fish oil via urea
complexation. Fat Sci Technol.(10):381-386,1988.

RAUEN-MIGUEL,A.M.; ESTEVES,W.; STAGENHAUSS,G.; BARRERA-ARELLANO,
D. Estudo da variabilidade experimental do período de indução
do óleo de soja determinado através do Rancimat. Bol.SBCTA, 23
(3/4):201-207,1989.

REICHWALD,V.I. Chemie der fischlipids. Fette Seif. Anstr.
77(8):328-334,1976.

RITTACO,M. & LUCIANO,V. Grau de adsorção do oxigênio durante a
autooxidação da substância gordurosa. Ciencia e Tecnologia
1976. p.15-26.

RONSIVALLI,L. Sharks and their utilization. Mar. Fish. Rev.
(2):1-13,1978.

- RUSOFF, L.L. & FRENCH, R.M. Teses and standarts for shark livers oils from sharks caught in Florida waters. *Ata Acad. Sci. Proc.* (5):133-135, 1940.
- SALVO, F.; TOSCANO, M.; DUCO, G.; ALFA, M. Compositione in acidi grassi dell olio di fegato di selacei. *Riv. Ital. Sost. Gras.* 64 (4):157-160, 1987.
- SAINCLIVIER, M. L'Industrie alimentare halieutique. Rennes, Sciences Agronomics, 1983. p.29-50
- SANDERS, T.A.B. Nutritional significance of rancidity. In: ALLEN, J.C. & HAMILTON, R.J. *Fats and oils*. New York, Applied Science, 1983, p.59-105.
- SANG, L. A review on the use of citric acid in the processing of oils and fats. *Oleagineux* 39(2):89-95, 1984.
- SARGENT, J.R.; GATTEN, R.R.; MCTOSH, H.R. The metabolism of neutral lipids in the species of dog fish, Squalus acanthias. *Lipids* 7(4):240-245, 1972.
- SCHULER, P. Autoxidation of fats and its prevention with antioxidants. Information Service. Food Industries Department. Roche. 1980, p-4.

- SIMOPOULUS,A.P. Summary of the conference on the health effects of polyunsaturated fatty acids in seafoods. J. Nutr. 116: 2350-2354,1986.
- SIVELL,M.; BULL,N.L; BUSS,D.H; WIGGINS,R.A; SCUFFAM,D.; JACSON, A. Vitamin A activity in foods of animal origin. J. Sci.Food Agric. 35 (8):931-939,1984.
- SHENOY,A.S. & DEY,V.K. Shark and its utility. Seafood Exp. J. (1):5-11,1984.
- SHERWIN,E.R. Antioxidants for vegetable oils. J. Am. Chem. Soc. 53(6):430-436,1976.
- SHERWIN,E.R. & LUCKADOO,B.M. Studies on antioxidant treatments of crude vegetable oils. J. Am. Oil Chem. Soc. 47(1):19-23,1970
- SHERWIN,E.R. & THOMPSON,J.W. Tertiary- butylhydroquinone. An antioxidant for fat and oils and fat containing foods. Food Technol. 21(6):106-110,1967.
- SINGER,P.; JAEGER,W.; WIRTH,M.; VOIGT,S.; NAUMANN,E.; ZIMONTKOWSKI,S.; HAJON,S. & GOEDICKE,W. Lipid and blood pressure-lowering effect of mackerel diet in man. Artherosclerosis, 49:99-102,1983.

- SLOOSSER,V. A study of U.S. shark marquets. St. Peterburg,
National Marine Fisheries Service, 1983. 23p.
- SONNTAG,N.O.V.; FORMO,M.W.; JUNGGERMAN,E.;NORRIS,F.A. Composition
and characteristics of individual fats and oils. In: SWERN,D.
Bailey's industrial oil and fat products. New York, John
Wiley, 1979. v.1. p.442-451.
- STANSBY,M.E. Misconceptions about nutritional properties of fish
oils. In: STANSBY,M.E. Fish oils. Westpot, Avi, 1967.
p.283-288.
- STANSBY,M.E. Reliability of fatty acid values purpoting to
represent composition of from different species of fish. J.
Am. Oil Chem. Soc. 58 (1):13-16,1981.
- STANSBY,M.E. Properties of fish oils and their aplication. In:
MARTIN,R.E. Chemistry & biochemistry of marine foods
products. Westport. Avi, 1982. p. 75-90
- STORER,T.I. & USINGER,R.T. Zoologia geral. São Paulo, Ed. Nacio-
nal-Ed. Universidade de São Paulo, 1971. p.555-563
- STROBECKER,R. & HENNING,H.M. Vitamin Assay: tested Methods.
Bergstrom, Verlag Chemie, 1965. p.33-54

SUZUKI,C.R. Guia de peixes do litoral brasileiro. 2.ed. Rio de Janeiro. Edições Marítimas, 1986. p.113

SUZUKI,T. Pharmaceutical marine products. In: Utilization of marine products. Book for marine fisheries research course, Tokyo, Overseas Technical Cooperation, 1972. p.118-120

SYVAOJA,E.L.; SALMINEN,K.; PIIRONEN,V.; VAPO,P.; KEROJOKI,O.; KOIVISTOINEN,P. Tocopherols and tocotrienols in finnish foods: fish and fish products. J. Am. Oil Chem. Soc. 62(8):1245-1248,1985.

TANIKAWA,E. Marine products in Japan. Tokyo, Ed. KOSEIAKAKU, 1985. p.457-465

TAGUCHI,K.; IWAMI,K.; KAWABATA,M.; IBUKI,F. Antioxidant effects of wheat gliadin and hen's egg white in powder model system: protection against oxidative deterioration of saflower oil and sardine oil. Agric. Biol. Chem. 52(2):539- 545,1988.

TATARA,T.; FUGI,T.; KAWASE,T.; MINAGAWA,M. Quantitative determination of tri-, di-, monooleins and free oleic acid by the thin layer chrmatography-flame ionization detector system using internal standards and boric acid impregnated chromarod. Lipids 18(10):732-736,1983.

- TERAO, J. & MATSUSHITA, S. Products formed by photosensitized oxidation of unsaturated fatty-acid esters. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 54(6) :234, 1977.
- TIRTIAUX, F. Le fracionamento industriel des corps gras par cristallisation dirigée - procédé Tirtiaux. *Oléagineux* 31:279-285, 1976.
- TOLEDO, M.; ESTEVES, W.; HARTMAN, V. Eficiência de antioxidantes em óleo de soja. *Ci. Tecnol. Alim.* 5(1):1-11, 1985.
- THOMAS III, A.E. Fractionation and winterization: Processes and products. In THOMAS, H.A. *Bailey's industrial oil and fat products*. New York, John Wiley, v.3, 1985. p.1-25
- THOMOPOULUS, C.D. Etude de l'action antioxydante à 75°C de BHA, BHT e TBHQ. *Rev. Fr. Corps Gras* 29(8-9):329-331, 1982.
- TRUJILLO-QUIJANO, J.A.; ESTEVES, W. e WIRTH, H.G. Considerações técnico-econômicas sobre o fracionamento de óleo de dendê. *SBCTA* 22(1/2):37-53, 1988.
- VAN OOSTEN, C.W.; POOT, C. & HENSEN, A.C. The precision of the Swift stability test. *Fette Seif. Anstrichm.* 83(4):133-135, 1981.
- VAN VLEET, E.S. Neutral lipids components of eleven species of Caribbean sharks. *Comp. Biochem. Physiol.* 79b(4):549-554, 1984

YONG,F.V.K. Refining and fractionation of palm oil. In:
GUNSTONE II,F.D. Palm oil. Great Britain, John Wiley &
Sons. III Series, v.15, 1987. p.62-69

YONG,F.V.K. The production and use of fish oils. In BARLOW,S.M. &
STANSBY,M.E. Nutritional Evaluation of long chain fatty
acids in fish oil. London, Academic Press, 1982. p.1-23

ZWOBADA,F. Additives and edible oils. Rev. Fr. Corps Gras
26(11):435-440,1979.

WOESTEENBLIRG,W.J. & ZAALBERG,J. Determination of the oxidative
stability of edible oils. Interlaboratory test with the auto
mated Rancimat method. Fette Seif. Anstrim.88(2):53-56,1986.