CONCENTRADOS DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS OBTIDOS A PARTIR DE ÓLEO DE CARPA (C*yprinus carpio*) UTILIZANDO O MÉTODO DA COMPLEXAÇÃO COM URÉIA

RODRIGO M. PAIM[1], MICHELI L. MONTE[1], JAQUES RIZZI[1], LUIZ A. A. PINTO[1]*

RESUMO

O trabalho teve como objetivo estabelecer as melhores condições para obter concentrados de ácidos graxos mono e poliinsaturados a partir do óleo branqueado de carpa (*Cyprinus carpio*), utilizando o método de complexação com uréia. Os fatores de estudo foram: relação de uréia-ácido graxo (2:1 e 6:1), temperatura de cristalização (4ºC e -12ºC) e tempo de cristalização (14 e 24 h). As respostas para análise estatística foram o somatório de ácidos graxos saturados (Σ(AGS)); somatório de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (Σ(AGMI+AGPI)); somatório de ácido graxo eicosapentaenoico e docosahexaenóico (Σ(EPA+DHA)). A relação uréia/AG se mostrou muito significativa, de forma diretamente proporcional na obtenção dos concentrados. A relação entre temperatura e rendimento dos concentrados foi de forma inversamente proporcional, e o tempo foi significativo, porém com menor influência. As melhores condições para a obtenção de concentrados foram: maior relação de uréia/AG (6:1), menor temperatura (-12ºC) e menor tempo (14 h). Sendo que nestas condições, os AGMI+AGPI constituíram 85,2% do concentrado, e entre estes os EPA+DHA foram de 9,4%. As frações líquidas apresentaram rendimento em massa de até 65,4%, e seu percentual de ácidos graxos livres ficou em média 35,8 g/100g.

PALAVRAS-CHAVE: Ácidos Graxos. Complexação. Óleo de Carpa. Resíduos de Pescado.

OBTAINMENT OF UNSATURATED FATTY ACID CONCENTRATES OF CARP (C*yprinus carpio*) OIL BY UREA COMPLEXATION METHOD

SUMMARY

This study aimed to obtain concentrates mono and polyunsaturated fatty acids from the bleanched carp (*Cyprinus carpio*) oil, using the method of urea complexation. The study factors were: ratio of urea-fatty acid (2:1 and 6:1), crystallization temperature (4 ° C and -12 ° C) and crystallization time (14 and 24 h). The responses for statistical analysis were: the sum of saturated fatty acids (Σ(SFA)); the sum of monounsaturated and polyunsaturated fatty acids (Σ(MUFA+PUFA)); the sum of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids Σ((EPA+DHA)). The urea/FA ratio showed the higher significance, it was directly proportional to obtainment of concentrates. The temperature was related with concentrates yield of inversely proportional form, and the time was significant, but with less influence. The best conditions for obtaining the concentrates were: higher

[1]Laboratório de Operações Unitárias, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande (FURG). *Autor correspondente: Professor Luiz Antonio de Almeida Pinto, Tel.: (53)3233-8648; fax: (53)3233-8745. E-mail: dqmpinto@furg.br

urea/FA ratio (6:1), lower temperature (-12 ° C) and lower time (14 h). In this condition, the amount of MUFA+PUFA in concentrates were of 85.2%, and the EPA+DHA content were of 9.4%.The liquid fractions obtained mass yield of up to 65.4%, and its percentage of free fatty acids was around 35.8 g/100.

KEY-WORDS: Fatty Acids. Carp Oil. Complexation. Fish Residues.

1. INTRODUÇÃO

O mercado mundial proporciona hoje uma vasta quantidade de suplementos alimentares de ω-3, que são encontrados principalmente nos óleos de pescado, ou em produtos nos quais estes ácidos graxos poliisaturados são agregados. Desta maneira, diversas pesquisas vem sendo realizadas para a obtenção de concentrados de ω-3. A cristalização por resfriamento, a extração fluídica supercrítica, a destilação molecular, a concentração por lipases são métodos para obter estes concentrados [11,17].

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPIs), também denominados de ácidos graxos ω-6 e ω-3, auxiliam na regulação do organismo humano. Estes ácidos auxiliam na prevenção de doenças já que ajudam na funcionalidade de certos órgãos. Dentre os AGPIs destacam-se os ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA). São cada vez mais necessárias pesquisas voltadas para os métodos de obtenção de AGPIs uma vez que estes ácidos não são sintetizados pelo organismo humano, e apresentam grande importância nutricional e farmacêutica. A forma mais utilizada e mais eficiente de obtenção de AGPIs é o método de complexação com uréia. Este método de separação, também chamado de método da inclusão, baseia-se na separação pelo grau de instauração, onde os ácidos mais insaturados são menos complexados com a ureia. Isto ocorre devido ao fato de a ureia cristalizar-se em uma estrutura hexagonal de canais de diâmetro de 8 à 12ºA. Quando a ureia cristaliza-se em presença de moléculas de cadeias retas e longas estes canais acomodam correntes alifáticas e sem ramificações. Os ácidos graxos insaturados não são acomodados nos canais formados na cristalização da uréia devido ao maior volume ocupado por suas insaturações. Para a utilização deste método é importante realizar uma reação de hidrólise, também chamada de reação de alcóolise e/ou transesterificação, que é a reação entre óleos e/ou gorduras e um álcool [6,11,15,17].

A obtenção de concentrados de ω-3 a partir de óleo produzido de resíduos de pescado, além de ser uma alternativa para a preservação do meio ambiente, também é uma forma de agregar valor aos resíduos de pescado. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar as condições para obtenção de concentrados de ácidos graxos mono e poliinsaturados pelo método da complexação com uréia, utilizando óleo branqueado produzido a partir de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Matéria-Prima

A matéria-prima que foi utilizada nos experimentos foram vísceras de carpa (*Cyprinus carpio*) obtidas de uma planta de processamento de pescado. Estas vísceras, logo após o abate dos peixes, foram imediatamente refrigeradas, e transportadas por viatura em recipiente plástico até o laboratório, onde foram estocados em embalagens plásticas e armazenadas em um freezer à temperatura de -18ºC.

2.2 Procedimentos Experimentais

2.2.1. Metodologia de obtenção do óleo branqueado

O processo termomecânico de elaboração de farinha de pescado para obtenção do óleo bruto de carpa seguiu o procedimento de Crexi, Souza-Soares e Pinto [7], constituindo-se das seguintes etapas: cocção, prensagem e centrifugação. As vísceras foram descongeladas durante 12 h à temperatura ambiente. Na extração do óleo bruto foram utilizados 10 kg de vísceras de carpa sendo estas submetidas à cocção em autoclave (Rochedo, modelo Idealclave, Brasil), durante 30 min e temperatura entre 95 e 100°C, seguida de prensagem para separação do licor de prensa dos sólidos.

Para a separação do óleo bruto de carpa do licor de prensa foi realizada em centrífuga (Sigma, modelo 6-15, D-37250, Alemanha), com rotação de 7000×g durante 20 min. O óleo bruto obtido foi refinado através da metodologia descrita por Crexi, Monte, Souza-Soares e Pinto [8]. O refino seguiu as seguintes etapas: degomagem, neutralização, lavagem e branqueamento.

A etapa de degomagem foi realizada durante 30 min, a uma temperatura de 80°C e agitação de 600 rpm, com adição de 1,0% de ácido fosfórico (85%) em relação à massa do óleo. Após o óleo foi resfriado até a temperatura de 35ºC sob vácuo (700 mmHg) e a separação das gomas foi realizada por centrifugação à 7000×g por 20 min. A etapa de neutralização iniciou-se com a determinação do índice de acidez do óleo degomado, logo após o óleo foi aquecido à 40ºC, sob vácuo (700 mmHg). Foi adicionado NaOH 20%p/p (utilizando 4,0% de excesso em relação ao índice de acidez determinado após a degomagem). Após neutralização do óleo, elevou-se a temperatura rapidamente à 80ºC para facilitar a separação da borra formada. Assim que a temperatura de 80ºC foi atingida, resfriou-se o óleo até 35ºC, sob vácuo. Após esse procedimento centrifugou-se o óleo, para separação da borra, por 20 min e 7000×g.

Na etapa de lavagem, foi adicionado 10% de água em relação a massa de óleo à 95°C, durante um tempo de contato de 10 min, com agitação de 500 rpm e temperatura do óleo sendo mantida a 50°C. Esta etapa foi repetida três vezes. A etapa de desumidificação teve a duração de 20 min, com uma temperatura entre 90ºC e 95°C e agitação de 500 rpm. A etapa de desumidificação foi realizada pelo aquecimento do óleo neutralizado até 90 ºC, sob vácuo de 700 mmHg e agitação de 100 rpm, até que não ocorresse mais evaporação (aproximadamente 10 min). Após o procedimento, desligou-se o aquecimento e esperou-se até a temperatura atingir 35ºC, sob vácuo.

A etapa de branqueamento foi realizada em duas partes. Inicialmente, a clarificação foi realizada à temperatura de 70°C, agitação de 40 rpm e vácuo de 700 mmHg, com adição de 5% de adsorvente (mistura de terra ativada e carvão ativado na relação de 9:1), sendo o tempo de contato de 20 min. Após, foi feita a filtração do óleo em funil de Buchnner com uma pré-capa de terra diatomácea. Para a pré-capa foi utilizada a quantidade de terra diatomácea 0,5 kg/m^2 de área filtrante.

Com a combinação entre o índice de saponificação (IS), lei de conservação das massas e a lei da composição definida pode-se determinar a massa molar do óleo de carpa (MM), utilizando a reação: 1mol óleo + 3 moles KOH = 3 moles ROO^-K^+ + 1 mol glicerol.

A massa molar do óleo pode ser calculada a partir da Equação 1 [9].

$$MM = \frac{3000 \times 56,1}{IS} \quad (1)$$

2.2.2. Metodologia de obtenção de ácidos graxos livres

O óleo branqueado de carpa foi submetido a reação de hidrólise química. Os ácidos graxos livres obtidos através da reação de hidrólise foram utilizados para o estudo da reação de complexação com uréia.

Para a obtenção dos ácidos graxos livres foi utilizado um reator onde o óleo esteve sob agitação, aquecimento e vácuo. Foi adicionado ao óleo refinado de carpa antioxidante BHT (800 mg/kg), e uma solução de KOH em álcool etílico anidro, a reação ocorreu sob agitação de 600 rpm.

As condições utilizadas na reação de hidrólise química foram as descritas por Crexi, Monte, Monte e Pinto [9], como sendo as melhores para maiores rendimentos na obtenção de ácidos graxos livres: concentração do catalisador (22%), proporção molar álcool etílico/óleo (39:1), temperatura (60ºC) e tempo (1 h).

Após o término da reação de hidrólise, a separação dos ácidos graxos livres foi realizada conforme procedimento descrito por Wanasundara e Shahidi [17], sendo

adicionada à mistura saponificada água destilada na quantidade de duas vezes o volume em relação à massa inicial de óleo. Para a extração da matéria insaponificável foi adicionado hexano (quatro vezes o volume de hexano em relação a massa de óleo inicial) este procedimento foi realizado duas vezes. A matéria insaponificável que contém hexano foi rejeitada.

A matéria saponificável foi acidificada (pH=1,0) com HCl 6N. Após a mistura foi transferida a um funil de separação, e os ácidos graxos foram extraídos com adição de hexano (duas vezes o volume em relação à quantidade inicial de óleos). A camada de hexano, contendo os ácidos graxos livres, foi seca com sulfato de sódio anidro e o excedente foi removido a 40ºC, sob vácuo (700 mmHg), para recuperar os ácidos graxos livres. Estes foram armazenados à temperatura de -18ºC, para sua posterior utilização no estudo da obtenção dos concentrados de ácidos graxos insaturados.

2.2.3 Metodologia da complexação com Uréia

Para obtenção dos concentrados de ácidos graxos mono e poliinsaturados foi utilizado banho termostatizado (Quimis, modelo Q-304-264, Brasil) empregando mistura de álcool e água para se atingir as temperaturas de cristalização desejadas. Na reação de complexação com uréia, a mistura com os ácidos graxos e a solução de uréia em etanol aquoso 95% foi aquecida à temperatura de 60 a 70ºC, sob vácuo (700 mmHg), com agitação até se obter uma mistura homogênea e límpida. Em seguida procedeu-se a etapa de cristalização. As relações da mistura ácido graxo-ureia, as temperaturas de cristalização e os tempos de cristalização foram definidos conforme a matriz do planejamento experimental fatorial apresentada na Tabela 1 da metodologia estatística (item 2.4).

A separação dos cristais formados (contendo AGS) da fração líquida (contendo AGI) foi realizada por filtração à vácuo. A fração líquida foi diluída com volume igual de água destilada e acidificada a pH 4-5 com HCl 6N, após adicionou-se volume igual de hexano e agitou-se a mistura por 1 h, transferindo-a então para um funil separador. A camada de hexano foi lavada com água destilada (igual volume), e em seguida a água de lavagem foi separada e descartada. Após foi adicionado sulfato de sódio anidro e o solvente restante foi removido a 40ºC, sob vácuo.

Os ácidos graxos da fração complexada (cristais) foram recuperados após a adição de igual volume de água destilada e acidificação a pH 4-5 com HCl 6N de maneira similar a fração não complexada. As duas frações foram pesadas e separadas, e a porcentagem de recuperação de cada uma foi calculada conforme Wanasundara e Shahidi [17].

2.3. Métodos Analíticos

As análises utilizadas para a caracterização das vísceras de carpa foram: umidade (925.10) e proteína (960.52) conforme metodologia descrita por AOAC [1], e para a determinação de lipídios foi utilizado o método de Bligh e Dyer [3].

As metodologias analíticas utilizadas para os índices de caracterização dos óleos bruto e branqueado foram realizadas segundo os métodos da AOCS [2]. Os índices foram: ácidos graxos livres (Ca 5a – 40), índice de iodo (Cd 1-25), índice de saponificação (Cd 36–76) e índice de peróxido (Cd 8-53). O valor de ácido tiobarbitúrico (TBA) foi realizado conforme método de Vyncke [16]. Todas as análises foram realizadas em duplicata.

O método utilizado para a determinação de ácidos graxos livres foi através de titulação da amostra (diluída em uma solução de éter-álcool etílico) com uma solução de hidróxido de sódio, utilizando como indicador fenolftaleína. Os resultados foram expressos em percentual de ácido oleico. Para a determinação do índice de peróxido, foi utilizada a titulação da amostra (diluída em uma solução de ácido acético-clorofórmio) com uma solução de tiossulfato de sódio. Os resultados foram expressos em meq/kg. Na determinação do índice de iodo, titulou-se a amostra diluída em uma solução de clorofórmio tratada com uma solução de Wijs iodeto de potássio, em uma outra de tiossulfato de sódio, usando solução de gel de amido como indicador. Os resultados foram expressos em cgI_2/g. O método empregado para determinação do índice de saponificação foi o da titulação com ácido clorídrico da amostra diluída em uma solução de hidróxido de potássio, utilizando fenolftaleína como indicador. Os resultados foram expressos em mg KOH/g. A determinação do valor de TBA foi realizada utilizando método espectrofotométrico (Quimis, modelo Q-108DRM, Brasil). Calculou-se o valor de TBA utilizando-se uma curva padrão obtida reagindo quantidades conhecidas de 1,1,3,3 tetrametoxipropano e TBA. Os resultados foram expressos como $mg_{malonaldeido\ (MDA)}/kg_{amostra}$.

Para avaliar as variações percentuais da reação de complexação com uréia, foi realizada a análise do perfil de ácidos graxos por cromatografia gasosa. As análises foram realizadas em um sistema cromatográfico (Shimadzu, GCMS-QP2010Plus), equipado com injetor *split*/*splitless* acoplado com detector de massas. Temperaturas de operação do detector: interface, 280 ºC; e fonte a 230 ºC. Detecção no modo *full scan* com varredura m/z 30 até m/z 500, em um tempo de varredura de 0,2 s. O modo de ionização utilizado foi o impacto de elétrons a 70 eV. As condições de operação do cromatógrafo foram: injetor, 250 ºC; coluna, 80 ºC (temperatura inicial, 0 min); seguido de gradiente de 10 ºC/min até 180 ºC e depois 7 ºC/min até a temperatura final de 330 ºC; fluxo de gás He, 1,3 mL/min; pressão, 88,5 kPa; velocidade linear média, 42 cm/s; volume de injeção de 1 µL com razão de *split* de 1:100. A coluna utilizada foi *Crossbond* 5% difenil/95% dimetil polisiloxano (30 m x 0,25 mm

x 0,25 µm, Restek). Os compostos foram identificados pelo tempo de retenção e também foi realizada a confirmação pelo espectro de massas.

O preparo das amostras, para a cromatografia gasosa, foi realizado conforme o método de derivatização para amostras contendo alto percentual de ácidos graxos livres [12]. Neste método é retirada uma alíquota de 0,3 g de óleo e é adicionado 3mL de trifluoreto de boro (BF_3). A amostra então foi mantida à 70ºC durante 20 min, e então foi lavada em solução de água/hexano grau HPLC na relação (1:1). A água de lavagem foi descartada e a solução se hexano contendo os ácidos graxos foi então evaporada em rota-evaporador (Heidolph, modelo Laborota 4000) sob vácuo de 700 mmHg e submersa em banho de glicerina à 40ºC. Após este procedimento 10 µL das amostras derivatizadas foram diluídas com 2 mL de hexano grau HPLC, e logo após injetadas no GC-MS em triplicata.

2.4. Métodos Estatísticos

Foi utilizado um planejamento experimental, do tipo fatorial 2^3, para avaliar os fatores que influenciaram de forma significativa, ao nível de 95% ($p \leq 0,05$), os experimentos da complexação com uréia, como também para verificar quais as faixas de valores desses fatores que apresentavam os melhores resultados [5,13].

Para reação de complexação com uréia os fatores estudados foram: relação uréia-ácido graxo (R), temperatura de cristalização (T) e tempo de cristalização (t). Os valores dos fatores de estudo foram determinados através de testes preliminares e da literatura [11,17]. As respostas consideradas para análise estatística dos resultados foram: rendimento da fração líquida, percentual de ácidos graxos livres (%AGL) da fração líquida e o perfil de ácidos graxos.

Em relação ao perfil graxo, foi analisado: o somatório de ácidos graxos saturados (Σ(AGS)); somatório de ácidos graxos monoinsaturados e poliinsaturados (Σ(AGMI+AGPI)); somatório de ácido graxo eicosapentaenoico e docosahexaenóico (Σ(EPA+DHA)). Também foram avaliadas as variações percentuais dos concentrados após a separação de ácidos graxos saturados e insaturados, comparado ao óleo branqueado: %Σ(AGS); %Σ(AGMI+AGPI); %Σ(EPA+DHA).

O rendimento de percentual de ácidos graxos insaturados, poliinsaturados e saturados foram calculadas conforme apresenta a Equação 2 [9].

$$\%\text{Rend Ácidos Graxos} = \frac{(\Sigma\text{pagC} - \Sigma\text{pagOB} \times 100}{\Sigma\text{pagOB}} \quad (2)$$

sendo Σ*pagC* o percentual de ácidos graxos concentrados,Σ*pagOB* o percentual de ácidos graxos no óleo branqueado

2.4.1. Planejamento Experimental

Os experimentos para concentração dos ácidos graxos mono e poliinsaturados, através do método de complexação com uréia, foram ordenados segundo a matriz de planejamento experimental fatorial para três variáveis independentes (2^3), apresentado na TABELA 1, onde são apresentadas as variáveis de estudo com seus valores reais e nas respectivas formas codificadas.

Tabela 1- Matriz do planejamento experimental 2^3 utilizado para os experimentos de complexação dos ácidos graxos obtidos de óleo branqueado de carpa.

Experimento	Relação Uréia/AG (R)		Temperatura (T)		Tempo (t)	
(nº)	(%)	Codificado	(ºC)	codificado	(h)	codificado
1	2	-1	-12	-1	24	+1
2	6	+1	-12	-1	24	+1
3	2	-1	-12	-1	14	-1
4	6	+1	-12	-1	14	-1
5	2	-1	4	+1	24	+1
6	6	+1	4	+1	24	+1
7	2	-1	4	+1	14	-1
8	6	+1	4	+1	14	-1

Para avaliação das respostas foi utilizado como ferramenta o *software Statistica* 7.0 (Statsoft, USA). Foram gerados os gráficos de Paretos que mostram a análise dos efeitos das variáveis estudadas. Foram realizadas duplicada dos experimentos para garantir a reprodutibilidade dos dados

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da caracterização da matéria prima (vísceras de carpa) usada no processo termomecânico de farinha de pescado foram: conteúdo de umidade de 73 ± 1%, conteúdo de proteína de 14 ± 1% e conteúdo de lipídios de 13 ± 1%. Os resultados apresentados para a matéria prima utilizada foram similares aos de Crexi, Souza-Soares e Pinto [7], de aproximadamente 75%, 12% e 13%, respectivamente. As pequenas diferenças

apresentadas podem estar relacionadas com a variabilidade da espécie, forma e tempo em que a matéria-prima utilizada foi armazenada. Fatores naturais como escassez de comida, ou fatores fisiológicos como desova ou migrações, também influenciam na composição química, ocorrendo maior variação da fração de lipídios [4,10].

Foram recuperados 13,2 g e 10,9 g por 100 g de vísceras dos óleos brutos obtidos através do método Bligh e Dyer [3] e processo termomecânico de farinha de pescado, respectivamente. O rendimento de recuperação do óleo bruto foi de 82,6%. Crexi, Monte, Souza-Soares e Pinto [8] estudaram a recuperação do óleo de vísceras de carpa obtendo quantidade máxima de óleo de aproximadamente 85%de recuperação, percentual próximo ao encontrado neste estudo.

3.2. Caracterização Química dos Óleos Bruto e Branqueado

A TABELA 2 mostra os valores encontrados para o índice de ácidos graxos livres (%AGL), índice de peróxidos (IP), índice de iodo (II), índice de saponificação (IS) e TBA para os óleos bruto, branqueado e do óleo obtido pelo método de Bligh e Dyer [3] diretamente das vísceras de carpa.

Tabela 2- Caracterização dos óleos brutos e branqueado obtidos das vísceras de carpa pelo processo termomecânico.

Índices	Óleo Bruto termomecânico	Óleo Branqueado	Óleo Bruto por Bligh Dyer
AGL (%ácido oleico)	2,7±0,2^{a}	0,5±0,1^{b}	3,2±0,3^{a}
IP($meq_{peroxide}$/ kg)	5,2±0,2^{a}	3,0±0,2^{b}	4,7±0,3^{a}
TBA ($mg_{malonaldeido}$//$kg_{óleo}$)	7,1±0,2^{a}	1,7±0,1^{b}	2,3±0,2^{c}
II (cg_{I2}/g)	108±1^{a}	109±2^{a}	109±2^{a}
IS (mg_{KOH}/g)	201±1^{a}	204±2^{a}	202±1^{a}

* Valores médios ± erro padrão (em triplicata). Letras com sobrescritos diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($p \leq 0,05$). AGL: ácidos graxos livres; IP: índice de peróxidos; TBA;, ácido tiobarbitúrico; II: índice de iodo; IS: índice de saponificação

Os valores encontrados para o %AGL, IP,II, IS e TBA estão na faixa de valores encontrados por Crexi, Monte, Souza-Soares e Pinto [8] para óleo oriundo de vísceras de carpa (*Cyprinus carpio)*. As pequenas variações encontradas podem ser explicadas devido a variabilidade das amostras utilizadas para extração do óleo, tais como, sexo, tempo de armazenamento das vísceras, estação do ano em que foi realizada a captura dos pescados, alimentação dos peixes, entre outros.

A TABELA 2 mostra que os valores de %AGL, IP, II e IS para os óleos brutos obtidos pelo processo termomecânico e óleo obtido pelo método de Bligh e Dyer [3] não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) ao nível de significância de 95%. Porém os valores de TBA foram diferentes ($p \leq 0,05$), devido ao aquecimento das vísceras no processo termomecânico, o que promoveu a oxidação lipídica, com decomposição de hidroperóxidos e formação de produtos secundários de oxidação como aldeídos, cetonas e álcoois. Verifica-se também na TABELA 2,através do teste de Tukey, que existe diferença significativa ($p \leq 0,05$) para o percentual de ácidos de graxos livres, índice de peróxidos e TBA quando se compara o óleo bruto com o óleo branqueado das vísceras de carpa. Estes índices apresentaram reduções em seus valores, devido às etapas de degomagem, neutralização e branqueamento, que tem por finalidade melhorarem a qualidade do óleo.

O percentual de ácidos graxos livres (%AGL) obtido para óleo bruto de vísceras de carpa (TABELA 2) ficou um pouco abaixo do encontrado na literatura que é de 3,35% [7,8]. Isto se deve, provavelmente, por se tratarem de amostras diferentes, que não foram submetidas às mesmas condições de alimentação, abate, tempo de armazenamento ou outros fatores. O percentual de ácidos graxos livres para o óleo branqueado das vísceras de carpa apresentaram valores próximos aos valores encontrados por Crexi, Monte, Souza-Soares e Pinto [8], que foram ao redor de 0,45%. Em relação ao índice de peróxido, a TABELA 2 mostra que este valor para o óleo branqueado de carpa está abaixo do limite máximo adequado para sua utilização e na reação de alcoólise e consumo, segundo Moura, Gonçalves, Grimaldi, Soares e Ribeiro [14], que é de 10 $meq_{peróxido}/kg$. Para a ácido tiobarbitúrico (TBA), os valores encontrados, também estão próximos aos apresentados por Crexi, Monte, Souza-Soares e Pinto [8] para óleos bruto e branqueado de vísceras de carpa que foram de 6,7 e 1,5 $mg_{malonaldeído}/kg_{óleo}$, respectivamente.

Os valores dos índices de saponificação e iodo (TABELA 2) para os óleos bruto e branqueado não foram significativamente diferentes ($p > 0,05$). Isto era esperado, pois as etapas do refino (degomagem, neutralização e branqueamento) não afetam a composição de ácidos graxos dos triacilgliceróis. Crexi, Monte, Souza-Soares e Pinto [8] encontraram para óleo branqueado de vísceras de carpa índices de saponificação e de iodo respectivamente de 205 mg_{KOH}/g e de 115 cg_{I2}/g, os quais são próximos aos encontrados neste estudo. Com o índice de saponificação (TABELA 2), foi determinada a massa molar para o óleo de carpa através da Equação 1, sendo o valor encontrado de 834,3 g/gmol.

3.3. Rendimentos percentuais e %AGL obtidos por complexação com uréia.

A TABELA 3 mostra os rendimentos percentuais (%Rend) e os %AGL obtidos nas filtrações que sucederam a complexação com uréia. A filtração foi realizada para separação

da fração líquida (não complexada com uréia e enriquecida de ácidos graxos poliinsaturados ω-6 e ω-3) e da fração sólida (complexada e enriquecida com ácidos graxos saturados).

Tabela 3 – Rendimentos e percentuais de ácidos graxos livres das frações após complexação com uréia dos ácidos graxos de óleo branqueado de carpa.

Experimento (nº)	%Rend (L)	%Rend (S)	%AGL (L)	%AGL (S)
1	45,2±0,1	32,2±0,2	35,9±0,3	35,5±0,4
2	68,8±0,3	31,2±0,2	30,1±0,3	31,9±0,4
3	44,9±0,2	31,4±0,1	42,5±0,4	42,2±0,1
4	65,4±0,2	34,6±0,3	35,8±0,1	35,9±0,2
5	38,0±0,1	49,0±0,2	42,9±0,3	37,8±0,1
6	54,2±0,2	41,7±0,2	34,3±0,2	34,3±0,3
7	60,5±0,2	29,0±0,3	38,9±0,3	37,6±0,04
8	38,4±0,1	48,1±0,1	36,8±0,4	37,5±0,3

Valores médios ± erro padrão (experimentos em duplicada e análises em triplicata).%REND (L), percentual de rendimento líquido (não complexada com uréia); %REND (S, percentual de rendimento retida na ureia (fase sólida); %AGL, percentual de ácidos graxos livres.

Foi realizada a análise da variância com os dados da TABELA 3 para as respostas consideradas (%Rend e %AGL), da fração líquida não complexada com uréia. Verificou-se que todos os efeitos principais e suas interações foram significativos ao nível de 95% ($p \leq 0,05$) para a resposta Rendimentos percentuais (%Rend) das frações não complexadas. A interação T×R exerceu grande influência na obtenção de melhores rendimentos de fração líquida. Através dos efeitos gerados observa-se que o efeito principal de R (relação uréia/AG) apresenta um comportamento diretamente proporcional ao rendimento, enquanto o efeito principal T (temperatura de cristalização) apresenta um comportamento inversamente proporcional. Também a relação uréia/AG exerceu maior influência, quando as variáveis são analisadas individualmente, do que as demais, e que o efeito principal de t (tempo de cristalização) apesar de ser significativo ao nível de significância de 95% exerceu uma influência muito pequena quando comparado com a interação entre T×R. . Assim como os rendimentos percentuais (%Rend) das frações não complexadas com uréia, o percentual

de ácidos graxos livres (%AGL) nestas frações também indica teoricamente onde se atinge uma quantidade maior de ácidos graxos poliinsaturados.

Verificou-se, de forma similar a resposta %Rend (TABELA 3), que todos os efeitos principais e suas interações foram significantes ($p \leq 0,05$) na resposta %AGL da fração não complexada. Também existiu uma grande influência da relação uréia/AG. Esta relação apresenta um comportamento inversamente proporcional ao percentual de ácidos graxos livres, o que já era esperado, uma vez que quanto maior a relação uréia/AG maior será a concentração de uréia no meio, ocasionando uma maior probabilidade de aprisionamento em sua estrutura de ácidos graxos livres saturados, fazendo com que estes fiquem retidos na fase sólida, diminuindo o percentual de ácidos graxos livres na fase líquida.

3.4. Análise dos perfis de Ácidos Graxos:

A TABELA 4 mostra o perfil de ácidos graxos dos óleos bruto e branqueado, das oito frações não complexadas com uréia e da fração saturada (referente à melhor condição encontrada para as frações não complexadas). As classes de lipídios do óleo de carpa nas etapas do refino e a variação percentual das classes de lipídios das frações não complexadas em relação ao óleo branqueado são apresentadas nas TABELAS 5 e 6.

Na TABELA 5, a fração 4L (fração líquida do exp. nº 4) foi a que apresentou menor percentagem de ΣAGS, obtendo valores abaixo de 10%. Este experimento também foi responsável pela maior percentagem tanto para o Σ(AGMI+AGPI) de 85,2%, como para o Σ(EPA+DHA) de 9,4%. Na fração 4S (fração sólida do exp. 4) foi encontrado um grande percentual de ácidos graxos saturados (acima de 48%) e teores menores de Σ(AGMI+AGPI) e Σ(EPA+DHA), aproximadamente 40% e 4% respectivamente.

Ao analisar as variações dos ácidos graxos saturados, é possível verificar na TABELA 6 um decréscimo que varia, aproximadamente, desde 12% até um máximo de 69%. É observado também, que na fração complexada com uréia 4S (experimento nº 4) houve um grande aumento de ácidos graxos saturados em relação ao óleo branqueado (72%). Para a variação %Σ(AGMI+AGPI) houve em todas as frações não complexadas um aumento em relação ao óleo branqueado, este aumento ficou entre 10% e 35%. Crexi, Monte, Monte e Pinto [9] obteve aumento do percentual de variação %Σ(AGMI+AGPI) de 31,4%. O aumento do percentual de variação %Σ(EPA+DHA) variou entre 142% à 295% nas frações líquidas.

Tabela 4 – Perfis de ácidos graxos do óleo bruto, do óleo branqueado, das oito frações líquidas e da fração sólida da melhor condição

	Bruto	Branqueado	Amostra 1 L	Amostra 2L	Amostra 3L	Amostra 4L	Amostra 5L	Amostra 6L	Amostra 7L	Amostra 8L	Amostra 4S
Ácidos Graxos	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
C12:0	0,29±0,02	0,28±0,02	0,25±0,03	0,28±0	0,26±0,01	0,27±0,01	0,26±0,01	0,27±0,02	0,25±0	0,25±0	0,17±0,01
C13:0	0,24±0,01	0,24±0,01	0,22±0,03	0,21±0,01	0,23±0,02	0,19±0,01	0,25±0,01	0,19±0,01	0,23±0,01	0,2±0	0,19±0,01
C14:0	3,26±0,02	3,24±0,03	4,17±0,08	3,48±0,04	4,14±0,06	3,06±0,04	4,33±0,04	2,95±0,05	4,37±0,01	3,66±0,06	5,22±0,19
C15:0	0,91±0,03	0,92±0,01	1,43±0,04	0,88±0,01	1,25±0,02	0,64±0,01	1,75±0,01	0,69±0,02	1,73±0,01	1±0,01	2,6±0,1
C16:1	6,67±0,08	6,61±0,06	8,4±0,09	9,12±0,08	8,76±0,18	9,4±0,15	7,99±0,15	9,57±0,12	8,01±0,05	9,43±0,18	5,82±0,23
C16:0	18,36±0,18	18,51±0,08	10,08±0,15	6,27±0,12	8,41±0,12	4,1±0,17	13,19±0,17	4,9±0,21	12,89±0,07	6,57±0,13	26,58±0,63
C17:0	0,59±0,01	0,6±0,01	0,86±0,01	0,34±0,01	0,7±0,01	0,24±0,02	1,16±0,02	0,3±0,02	1,1±0,01	0,28±0,01	2,29±0,08
C18:2	10,92±0,01	9,43±0,04	10,66±0,35	12,34±0,16	11,16±0,28	15,21±0,08	9,57±0,08	13,38±0,17	9,57±0,02	14,45±0,13	6,44±0,16
C18:1c + C18:3	43,05±0,47	42,16±0,06	38,61±0,44	43,11±0,32	39,94±0,39	41,28±0,42	37,68±0,42	42,53±0,35	37,83±0,05	41,22±0,45	19,91±0,56
C18:0	3,75±0,02	3,78±0,02	2,64±0,07	0,68±0,01	2,14±0,04	0,31±0	3,19±0	0,47±0,01	3,32±0,03	0,35±0,01	7,95±0,34
C19:0	0,00±0	0,00±0	0,19±0,01	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,25±0	0,00±0	0,8±0,02
C20:4 (AA)	1,09±0,05	1,05±0,02	1,98±0,05	2,35±0,01	2,02±0,03	2,61±0,04	1,92±0,04	2,79±0,04	1,88±0,01	2,37±0,01	0,00±0
C20:5 (EPA)	1,5±0,05	1,48±0,01	3,58±0,1	4,23±0,02	3,68±0,05	4,57±0,06	3,16±0,06	4,46±0,05	3,13±0,02	3,99±0,05	1,94±0,06
C20:3	0,63±0,08	0,61±0,03	1,09±0,01	1,3±0,01	1,1±0,01	1,43±0,02	1,03±0,02	1,54±0,02	1,03±0,01	1,26±0,01	0,51±0,01
C20:2	0,66±0,13	0,62±0,01	1,6±0,06	1,64±0,05	1,63±0,02	1,73±0,06	1,41±0,06	1,8±0,04	1,52±0,04	1,67±0,02	0,82±0,02
C20:1	1,33±0,05	1,1±0,03	2,93±0,06	2,09±0,06	3,04±0,05	1,88±0,06	2,66±0,06	1,65±0,02	2,81±0,05	2,28±0,05	2,11±0,07
C20:0	0,13±0	0,13±0,02	0,3±0,01	0,00±0	0,22±0,01	0,00±0	0,56±0	0,00±0	0,4±0,01	0,00±0	1,42±0,05
C21:0	0,18±0,01	0,18±0,01	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,23±0,01
C22:6 (DHA)	0,92±0,04	0,91±0,03	3,72±0,09	4,5±0,02	3,9±0,06	4,86±0,07	2,79±0,07	4,33±0,07	2,66±0,03	3,65±0,16	1,89±0,11
C22:5	0,57±0,03	0,5±0,04	1,73±0,04	2,07±0,02	1,79±0,02	2,27±0,02	1,59±0,02	2,37±0,03	1,61±0,02	1,97±0,02	0,84±0,03
C22:0	0,2±0,01	0,18±0,02	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,6±0,02
C23:0	0,14±0,02	0,1±0,2	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,18±0,01
C24:0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,00±0	0,22±0,01
Total (%)											
AG identificados	95,39±0,23	92,63±0,04	94,44±1,34	94,89±0,05	94,37±0,88	94,05±1,06	94,49±1,06	94,19±1,19	94,59±0,22	96,6±0,62	88,73±0,46
NÃO IDENTIFICADOS	4,61	7,37	5,56	5,11	5,63	5,95	5,81	5,81	5,41	5,4	11,27

Tabela 5 - Classe de lipídios (% total de ácidos graxos) nos óleos bruto, refinado e nos experimentos de complexação realizados.

Ácido Graxo	Óleo bruto (%)	Óleo branq. (%)	Concentrados (%)								
			1L	2L	3L	4L	5L	6L	7L	8L	4S
ΣAGS	28,0	28,1	20,1	12,1	17,35	8,81	24,69	9,77	24,54	12,31	48,45
Σ(AGMI+AGPI)	67,3	64,47	74,3	82,8	77,2	85,24	69,8	84,42	70,05	82,29	40,28
Σ(EPA+DHA)	2,42	2,39	7,2	8,73	7,58	9,43	5,95	8,79	5,79	7,64	3,83

ΣAGS; somatório de ácidos graxos saturados; Σ(AGMI+AGPI): somatório de ácidos graxos mono e poliinsaturados; Σ(EPA+DHA): somatório de eicosapentaenoico e docosahexaenóico.

1L, 2L, 3L, 4L, 5L, 6L, 7L e 8L são as frações líquidas (não complexadas) dos respectivos experimentos; 4S é a fração sólida da melhor condição líquida da complexação experimento nº4).

Tabela 6 – Percentual de variação das classes de lipídios das frações líquidas não complexadas em relação ao óleo branqueado.

%Variação	1L	2L	3L	4L	5L	6L	7L	8L	4S
%Σ AGS	-28,5	-57,0	-38,4	-68,7	-12,3	-65,3	-12,8	-56,2	72,0
%Σ(AGMI+AGPI)	15,2	30,4	21,1	34,4	10,7	33,1	10,4	29,7	-36,5
%Σ(EPA+DHA)	205,4	265	217,1	294,5	148,9	267,7	142,2	219,6	60,2

Através da análise de variância dos dados da TABELA 5, para as respostas ΣAGS, Σ(AGMI+AGPI) e Σ(EPA+DHA), da fração líquida não complexada com uréia, foram obtidos, os gráficos de Paretos e os cubos de respostas (FIGURAS 1-6).

Na FIGURA 1 (gráfico de Paretos) pode-se observar que todos os efeitos principais e suas interações foram significativos ($p \leq 0,05$) para a resposta ΣAGS da fração não complexada. Nesta figura também é destacada a grande influência que o efeito principal da relação uréia/AG exerceu nesta resposta em relação aos demais efeitos das variáveis. Esta influência foi inversamente proporcional ao ΣAGS para as frações líquidas, pois ao aumentar a relação, a quantidade de ácidos graxos saturados nas frações líquidas diminui, pois estes ficam retidos na uréia com maior facilidade. A temperatura apresentou-se como o segundo fator de maior influência. Ela é relacionada de forma diretamente proporcional aos ácidos graxos saturados nas amostras não complexadas com uréia, uma vez que temperaturas maiores dificultam a cristalização da uréia, fazendo com que estes ácidos graxos sejam menos complexados, aumentando seus teores na fração líquida (não complexada). O tempo exerce um efeito muito pouco significativo quando comparado com a relação uréia/AG e a temperatura.

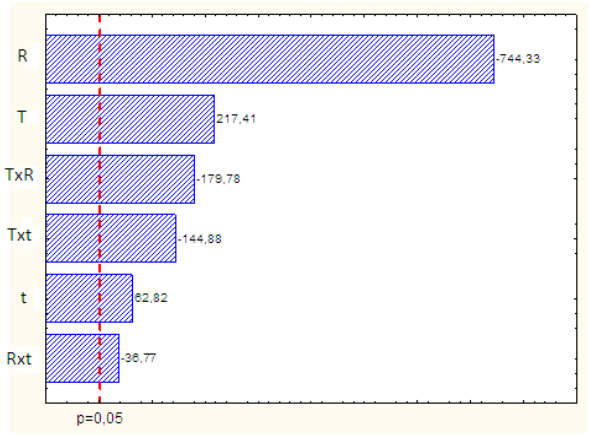

Figura 1 – Gráfico de Paretos dos efeitos das variáveis de estudo sobre o ΣAGS da fração não complexada com uréia dos ácidos graxos obtidos de óleo de carpa.

A FIGURA 2 apresenta o cubo de resposta dos experimentos das frações líquidas para o ΣAGS da fração não complexada, onde as arestas representam as variáveis e seus respectivos níveis, e nos vértices são apresentadas as respostas teóricas obtidas pela análise estatística. É possível observar, ao analisar a relação uréia/AG, que ao aumentar os níveis dos experimentos de -1 (2:1) para +1(6:1) houve uma diminuição do percentual de ΣAGS, ou seja um decréscimo de 7,8% na concentração dos ácidos graxos saturados nas amostras líquidas. Ao aumentar os níveis de temperatura de -1 (-12ºC) para +1 (4ºC),

ocorreu um aumento da concentração de ΣAGS de cerca de 8%. Já em relação ao tempo de cristalização ocorreu pouca diferença significativa no percentual de ΣAGS ao aumentar os níveis de tempo de -1 (14 h) para +1 (24 h).

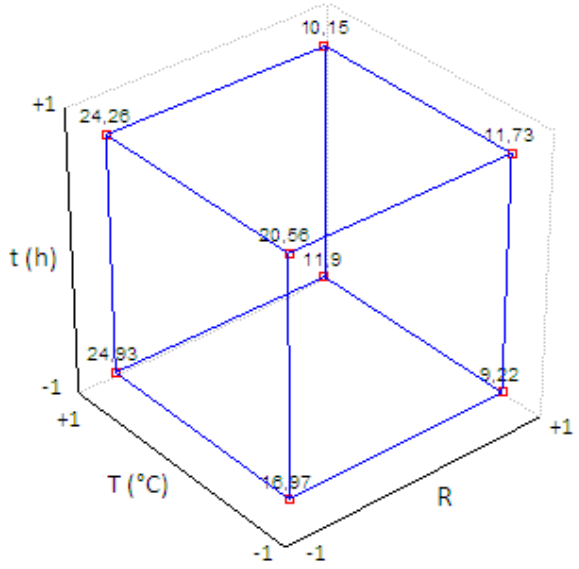

Figura 2 – Cubo de resposta das variáveis de estudo em função do ΣAGS em relação as frações não complexadas com uréia dos ácidos graxos obtidos de óleo de carpa.

As FIGURAS 3-6 apresentam os gráficos resultantes da análise estatística referente ao Σ(AGMI+AGPI) e Σ(EPA+DHA). Neste estudo, verifica-se o grande efeito que a relação uréia/AG apresenta na concentração os ácidos graxos mono e poliinsaturados (Σ(AGMI+AGPI)), e entre os poliinsaturados eicosapentaenoico (EPA) e docosaexaenoico (DHA).

Para Σ(AGM+AGPI) e Σ(EPA+DHA), FIGURAS 3 e 4 (gráficos de Paretos) respectivamente, ao contrário do que ocorreu nos ácidos graxos saturados (ΣAGS) nas frações líquidas, a relação uréia/AG é diretamente proporcional, e apresentou um efeito muito superior as demais variáveis em relação a este estudo. A medida que aumentou a concentração de uréia na etapa de complexação, diminuiu a quantidade de saturados nas frações não complexadas, o que fez aumentar a concentração de ácidos mono e poliinsaturados nas frações líquidas. A temperatura foi outro fator importante, embora com menor influência do que a relação uréia/AG. A temperatura foi inversamente proporcional ao Σ(AGMI+AGPI) e Σ(EPA+DHA), pois, ao diminuir a temperatura facilita-se a cristalização da uréia, retendo mais facialmente os ácidos graxos saturados.

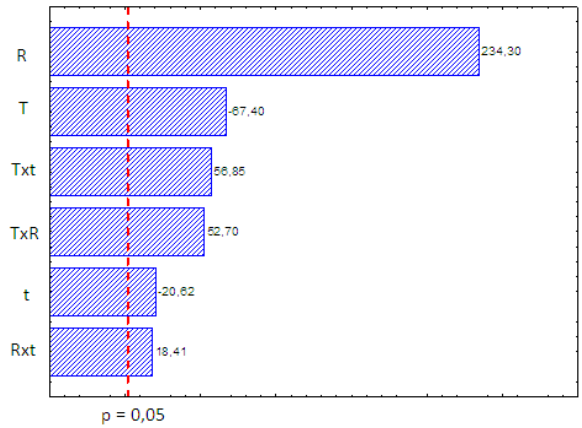

Figura 3 – Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis de estudo sobre o Σ(AGMI+AGPI) na fração não complexada com uréia dos ácidos graxos obtidos de óleo de carpa.

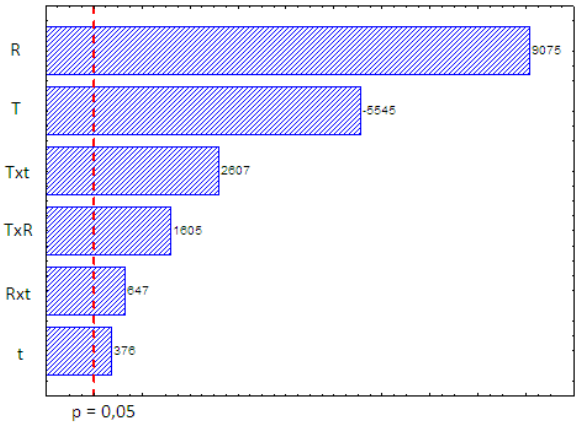

Figura 4 – Gráfico de Pareto dos efeitos das variáveis de estudo sobre o Σ(EPA+DHA) na fração não complexada com uréia dos ácidos graxos obtidos de óleo de carpa.

A partir da FIGURA 5 (cubo de resposta) é possível verificar o comportamento do Σ(AGMI+AGPI) ao se variar os fatores de estudo. Quando a relação uréia/AG foi aumentada do nível -1(2:1) para +1(6:1) ocorreu um aumento de 7,57% no Σ(AGMI+AGPI) nas frações líquidas. Assim como, se diminuir a temperatura de cristalização de +1 (4ºC) para -1 (-12ºC) ocorreu um aumento do Σ(AGMI+AGPI) de 8%. O tempo mais uma vez não se mostrou muito significativo em comparação as outras variáveis, já que ao variar o tempo do nível -1 (14h) para +1 (24h) ocorreu um aumento de apenas 0,8%.

A partir da FIGURA 6 é possível observar o comportamento do Σ(EPA+DHA) ao se variar os fatores de estudo em relação as frações não complexadas com uréia. Quando a relação uréia/AG foi aumentada do nível -1 (2:1) para o +1 (6:1), ocorreu um aumento de 2,2% no Σ(EPA+DHA). Assim como ao diminuir a temperatura de cristalização de +1 (4ºC)

para -1 (-12ºC), ocorreu um aumento do Σ(EPA+DHA) de 2,1%. O tempo mais uma vez se mostrou pouco significativo em comparação as outras variáveis.

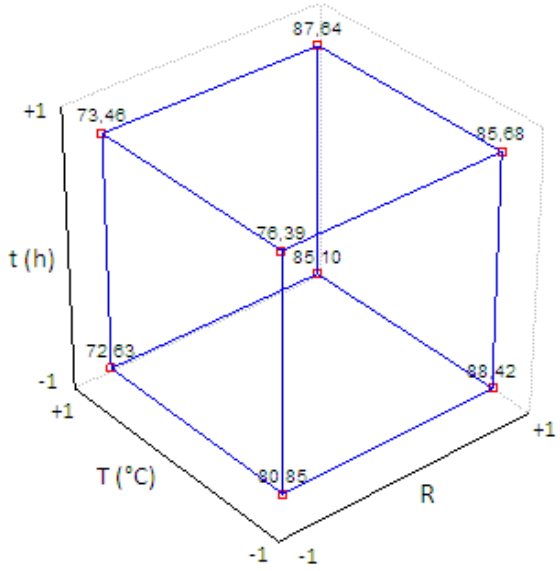

Figura 5 - Cubo de resposta das variáveis de estudo em função de Σ(AGMI+AGPI) em relação as frações não complexadas com uréia dos ácidos graxos obtidos de óleo de carpa.

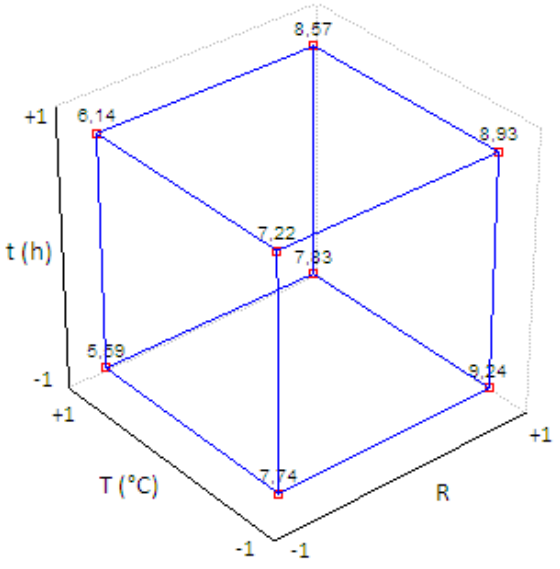

Figura 6 - Cubo de resposta das variáveis de estudo em função do Σ(EPA+DHA) em relação as frações não complexadas com uréia dos ácidos graxos obtidos de óleo de carpa.

A partir dos resultados obtidos pela análise estatística através dos perfis graxos dos óleos, o experimento nº 4 foi o que apresentou os melhores resultados, sendo as condições de trabalho: maior relação de uréia/AG (R = 6:1), a menor temperatura (T = -12ºC) e o menor tempo (t = 14 h). Analisaram-se as seguintes classes de lipídios: ΣAGS que

apresentou menor percentual retido entre as frações não complexadas com uréia (8,8%); Σ(AGMI+AGPI) que apresentou o maior percentual destas classes de lipídios (85,2%), e Σ(EPA+DHA) que apresentou maior percentual 9,4%. Também foi verificada a alta eficiência do método de complexação com uréia pelo altos teores de ácidos graxos saturados contidos na fração cristalizada (sólida) do experimento nº 4L e nº 4S.

4. CONCLUSÃO

O rendimento do óleo bruto obtido das vísceras de carpa pelo processo termomecânico foi de 82,6%. Os perfis graxos dos óleos bruto e branqueado não apresentaram diferenças significativas ($p>0,05$) em quase todos os ácido graxos. Os óleos das oito frações líquidas e da fração sólida, obtidos na complexação com uréia, apresentaram diferenças significativas na maioria dos conteúdos de EPA e DHA.

Foi verificada a alta influência da relação uréia/AG na variação percentual de ácido graxos saturados (%ΣAGS), obtidos nas frações não complexadas com uréia, sendo de forma inversamente proporcional. Ao se aumentar esta relação de (2:1) para (6:1) ocorreu uma diminuição na %ΣAGS de 27,5%. Para a temperatura, ocorreu um decréscimo de 28,4% na %ΣAGS ao diminuir de 4ºC para -12ºC. Observou-se um aumento de 12,5% na %Σ(AGMI+AGPI) ao se aumentar a relação de uréia/AG). Também houve um aumento de 12,4% nesta resposta quando diminuiu a temperatura de 4ºC para -12ºC, sendo que o tempo foi pouco influente. Já para a %Σ(EPA+DHA), ocorreu um aumento de 62,7% quando aumentou-se a relação uréia/AG, e um aumento de 89,6% quando foi diminuida a temperatura.

Portanto, para os experimentos realizados, conclui-se que as condições de maior relação de uréia/AG (R = 6:1), a menor temperatura (T = -12ºC) e o menor tempo (t = 14 h) foram as que apresentaram melhores resultados para a obtenção de concentrados de ácidos graxos mono e poliinsaturados (85,2%), e entre estes os EPA+DHA (9,4%).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] AOAC. **Official Methods of Analysis.** (16th ed.). Arligton, Virginia, USA: Association of Official Analytical Chemists, 1995.

[2] AOCS. **American Oil Chemists' Society**. Official and Tentative Methods of American Oil Chemists' Society, 3rd edn. Champaig, IL,USA, 1980.

[3] BLIGH, E. G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v.27, p.911-917, 1959.

[4] BORLONGAN, I. G.; BENITEZ, L.V. Lipids and fatty acid composition of milkfish (Chanos chanos Forsskal) grown in freshwater and seawater. **Aquaculture**, v.104, p.79-89, 1992.

[5] BOX, G. E. P.; HUNTER, W. G.;HUNTER, J.S. **Statistics for experiments: an introduction to design, data analysis and model building**. New York, EUA, John Wiley & Sons, 1978.

[6] CARVALHO, P. O., CAMPOS, P. R. B., NOFFS, M. D., OLIVEIRA, J. G., SHIMIZU, M. T.; SILVA, D. M. Aplicação de lípases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poliinsaturados. **Química Nova**, v.26, n.1, p.75-80, 2003.

[7] CREXI, V. T., SOUZA-SOAREZ, L. A.; PINTO, L. A. A. Carp (*Cyprinus carpio*) oils obtained by fishmeal and ensilage processes: characterístics and lipid profiles. **International Journal of Food Science and Technology**, v.44, p.1642-1648, 2009.

[8] CREXI V. T., MONTE, M. L., SOUZA-SOARES, L. A.; PINTO, L.A.A. Production and refinement of oil from carp (*Cyprinus carpio*) viscera. **Food Chemsitry**, v.119, p.945-950, 2010.

[9] CREXI V. T, MONTE M. L, MONTE M. L; PINTO L. A. A. Polyunsaturated fatty acid concentrates of carp oil: chemical hydrolysis and urea complexation**- Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.89, p.329-334, 2012.

[10] DE SILVA, S. S.; GUNASEKERA, R. M.; AUSTIN, C. M. Changes in fatty acid profile of hybrid red tilapia *Oreochromis mossambicus* X O. niloticus, subjected to short-term starvation and comparison with changes in seawater raised fish. **Aquaculture**, v.153, p.273-290, 1997.

[11] LIU, S.; ZHANG, C.; HONG, P.; JI, H. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v.73, p.203-209, 2006.

[12] METCALFE, L.D.A.A.; SCHIMITZ, J.R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 38, 514-515, 1966.

[13] MYER, R.H. **Response surface methodology**. Ney York,USA, Library of Congress, 1976.

[14] MOURA, J. M. L. N., GONÇALVES, L. A. G., GRIMALDI, R., SOARES, M. S.; RIBEIRO A. P. B. Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos ω-3. **Química Nova**, v.29, p.956-953, 2006.

[15] SHAHIDI, F.; WANASUNDARA U.N. Omega-3 fatty acid concentrates: nutritional aspects and production technologies. **Trends in Food science & Technology**, v.9, p.230-240, 1998.

[16] VYNCKE, W. Direct determination of the thiobabituric acid value in trichoroacetic acid extracts of fish as a measure of oxidative rancidity. **Fette Seifen Anstrichmittel**, v.12, p.1084-1087, 1970.

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

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) pela concessão de bolsa de estudos.