

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Avaliação das características químicas dos óleos de peixe encapsulados
comercializados no estado de São Paulo**

Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita

Tese para obtenção de Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr Jorge Mancini Filho

São Paulo
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Ciências dos Alimentos
Área de Bromatologia

**Avaliação das características químicas dos óleos de peixe encapsulados
comercializados no estado de São Paulo**

Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita

Versão Corrigida

Tese para obtenção de Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr Jorge Mancini Filho

São Paulo
2023

Mahyara Markievicz Mancio Kus Yamashita

Avaliação das características químicas dos óleos de peixe encapsulados
comercializados no estado de São Paulo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Jorge Mancini Filho

1 ° Examinador

2 ° Examinador

3 ° Examinador

4 ° Examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2023.

<http://www.bcq.usp.br/FichaCatalogfica/ficha.php>

K97a

Kus-Yamashita, Mahyara Markievicz Mancio
Avaliação das características químicas dos óleos de
peixe encapsulados comercializados no estado de São
Paulo / Mahyara Markievicz Mancio Kus-Yamashita. -
São Paulo, 2023.
195 p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências
Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental -
Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.
Orientador: Mancini Filho, Jorge

1. Segurança de alimentos. 2. Análise de
alimentos. 3. Ácidos graxos poli-insaturados. 4.
Cromatografia gasosa. 5. Óleo de peixe. I. T. II.
Mancini Filho, Jorge, orientador.

RESUMO

KUS-YAMASHITA, M. M. M. Avaliação das características químicas dos óleos de peixe encapsulados comercializados no estado de São Paulo. 2023. 195f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O óleo de peixe é obtido de peixes gordurosos, entre eles, o atum, a sardinha, cavala, o arenque e as trutas. É utilizado em diversos segmentos industriais, como em suplementos alimentares, alimentos funcionais, produtos farmacêuticos; com o uso mais significativo como suplemento alimentar. O principal interesse de seu uso como suplemento alimentar deve-se à existência de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (AGPI-n 3); dentre eles, o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6), que promovem diversos benefícios à saúde; e devido a suas insaturações, são susceptíveis à oxidação. Os benefícios atribuídos são inúmeros: prevenção de doenças cardiovasculares; são essenciais nos desenvolvimentos cerebral e visual em bebês; emprego em doenças degenerativas e no câncer. Métodos analíticos para a determinação desses ácidos graxos devem ser estudados, a fim de refletir valores idôneos. No desenvolvimento desta tese, objetivou-se adequar e aprimorar a quantificação dos ácidos graxos poli-insaturados em óleos de peixe encapsulado; verificar a qualidade desses óleos, comercializados no Estado de São Paulo, quanto aos teores de ácidos graxos e índices de oxidação, comparando com a Norma Codex Stan 329/2017. Foram analisadas 51 amostras comerciais de óleo de peixe, coletadas pelas Vigilâncias Sanitárias do Estado de São Paulo e realizadas as medições de acidez, índice de peróxido, p-anisidina, valor total de oxidação (ToTox) e quantificação dos ácidos graxos saturados, *trans*, monoinsaturados, poli-insaturados, EPA e DHA. Os métodos utilizados para a determinação de acidez e dos níveis de oxidação foram baseados em metodologias oficiais e a análise de ácidos graxos foi otimizada por planejamento fatorial e validada de acordo com a orientação do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Foi realizado estudo de estabilidade acelerada de quatro amostras de óleo de peixe, com concentrações diferentes de EPA e DHA, e as análises de índice de peróxido, p-anisidina, ToTox e quantificação de EPA e DHA. Foram avaliados, por meio de um planejamento fatorial, em quatro amostras de óleo

de peixe, com concentrações diferentes de EPA e DHA, quais parâmetros (temperatura, tempo, luminosidade, umidade e invólucro) têm mais influência na oxidação dos óleos de peixe. As quatro amostras de óleo de peixe, com concentrações diferentes de EPA e DHA, foram submetidas a diferentes tempos e temperaturas (de 180°C a 280°C, por 2 a 8 horas), em ambiente inerte, com o intuito de formar ácidos graxos *trans* de EPA e DHA. Essas amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, com detector de ionização em chama e por Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Todas as amostras comerciais estavam de acordo com o limite estabelecido de Codex Alimentarius para a acidez; 90,2% estavam em desacordo para índice de peróxido; 23,5% para a p-anisidina; 72,6% para o ToTox. Comparando o valor obtido na análise com os valores declarados no rótulo do produto, 74,5% estavam em desacordo para EPA e 84,3% para DHA. Esses dados foram similares a estudos realizados em diversos países. Quanto ao ensaio de estabilidade, observou-se que, devido aos altos níveis do índice de peróxido, a maioria dos suplementos alimentares, em 30 dias, já atingem os limites para manter sua qualidade e ser consumido com os níveis de oxidação e quantidades de EPA e DHA dentro dos limites. Os parâmetros que mais influenciaram a oxidação foram o invólucro, seguido da temperatura, tempo, luminosidade e umidade, portanto, encapsular o óleo de peixe é de extrema importância para evitar oxidação e perdas de ácidos graxos. Nas amostras submetidas a altas temperaturas para a formação de ácidos graxos *trans*, de acordo com a análise de cromatografia gasosa e de RMN, houve a formação de isômeros de EPA e DHA, e, na análise de RMN, um aumento de ácidos graxos nessas amostras, sugerindo, assim, que esses isômeros estão na configuração *trans*. A avaliação dos suplementos alimentares de óleo de peixe deve ser constante, uma vez que trazem diversos benefícios para a saúde, e garantir a sua qualidade é essencial para alcançar esses objetivos, bem como o cuidado com o processamento e armazenamento deles para evitar os processos de oxidação e formação dos ácidos graxos *trans*.

Palavras-Chave: Óleo de peixe. Ácidos graxos poli-insaturados. Cromatografia gasosa. Ácido docosahexaenóico. Oxidação. Suplemento alimentar. Ressonância magnética nuclear.

ABSTRACT

KUS-YAMASHITA, M. M. M. Evaluation of the chemical characteristics of encapsulated fish oils commercialized in São Paulo State. 2023. 195f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

Fish oil is obtained from fatty fish, including tuna, sardines, mackerel, herring, and trout. It is used in several industrial segments, such as in food supplements, functional foods, and pharmaceutical products; the most significant being its use as a food supplement. The great interest in its use as a food supplement is due to the presence of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA-3), among them the eicosapentaenoic acid (EPA, 20:5) and the docosahexaenoic acid (DHA, 22:6), which promote several health benefits and due to their unsaturation are susceptible to oxidation. The benefits attributed to them are numerous: prevention of cardiovascular diseases, essential in brain and visual development in infants, and relationship with degenerative diseases and cancer. Analytical methods for the determination of these fatty acids must be studied in order to reflect reliable values. This thesis aims to adjust and improve the quantification of polyunsaturated fatty acids in encapsulated fish oils, verify the quality of these oils marketed in the State of São Paulo, regarding the fatty acid contents and oxidation indices, comparing with the Codex Stan 329/2017 Standard. We analyzed 51 commercial samples of fish oil, collected by the Health Surveys of the State of São Paulo and performed the analysis of acidity, peroxide index, p-anisidine, total oxidation value (ToTox), and quantification of saturated, *trans*, monounsaturated, polyunsaturated, EPA and DHA fatty acids. The methods used for the determination of acidity and oxidation levels were based on official methodologies and the method for fatty acid analysis was optimized by factorial planning and validated according to Inmetro guidelines. An accelerated stability study was carried out on 4 fish oil samples, with different EPA and DHA concentrations, and peroxide index, p-anisidine, ToTox, and EPA and DHA quantification analyses were performed. It was evaluated through a factorial design, in 4 samples of fish oil, with different concentrations of EPA and DHA, which parameters (temperature, time, luminosity, humidity and wrapping) have more influence in the oxidation of the fish oils. The 4 fish oil samples with different EPA and DHA concentrations were submitted to different times and temperatures (from 180

to 280 °C, for 2 to 8 hours) in an inert environment in order to form *trans* fatty acids from EPA and DHA. These samples were analyzed by gas chromatography with a flame ionization detector and by nuclear magnetic resonance (NMR). All commercial samples complied with the established Codex Alimentarius limit for acidity, 90.2% were non-compliant for the peroxide index, 23.5% for p-anisidine; 72.6% for ToTox. Comparing the value obtained in the analysis with the values declared on the product label, 41.2% were in non-compliance with EPA and 94.1% for DHA. These data were similar to studies conducted in several countries. Regarding the stability test, it was observed that due to the high levels of the peroxide index, most of the food supplements, in 30 days, already reach the limits to maintain their quality and be consumed with the oxidation levels and amounts of EPA and DHA within the limits. The parameters that most influenced oxidation were the wrapping, followed by temperature, time, light, and humidity, therefore encapsulating fish oil is of extreme importance to avoid oxidation and fatty acid losses. In the samples submitted to high temperatures for the formation of *trans* fatty acids, according to the gas chromatography and NMR analysis, there was the formation of EPA and DHA isomers, and in the NMR analysis, there was an increase of fatty acids in these samples, thus suggesting that these isomers are in the *trans* configuration. The evaluation of fish oil food supplements should be constant, since they bring several health benefits, and ensuring their quality is essential to achieve these goals, as well as the care with their processing and storage to avoid oxidation process and formation of *trans* fatty acids.

Keywords: Fish oil. Polyunsaturated fatty acids. Gas chromatography. Docosahexaenoic acid. Oxidation. Food supplementation. Nuclear magnetic resonance.

*Ao meu avô, Edward Mancio, e ao meu tio, Nabucodonozor Kus,
pelo exemplo da educação.*

Aos meus pais, Mamerto e Lavize, e irmã Lyhandra, por sempre me incentivarem.

Ao meu esposo, Eduardo, pelo apoio de sempre.

Aos meus filhos, Eloísa, Theo e Melina, por serem minha inspiração.

A Deus.

Ao meu orientador, Jorge Mancini-Filho, por toda a ajuda; por tantos ensinamentos; e por aceitar, mais uma vez, embarcar nessa viagem desafiadora da pós-graduação.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, por me proporcionar a possibilidade de realizar esse sonho.

Ao Instituto Adolfo Lutz, pela oportunidade de realizar o doutorado e por dispor suas dependências para concretizá-lo.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, por me auxiliarem com toda a parte burocrática.

Ao professor João Lago e aos alunos da Universidade Federal do ABC (UFABC), pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e precisa contribuição na interpretação desses dados.

A Sabria Aued-Pimentel, por todos os ensinamentos, toda a ajuda e por sempre acreditar no meu potencial. Obrigada por despertar meu espírito de pesquisadora.

A Regina Sorrentino Minazzi Rodrigues, por todo o apoio; pela compreensão no decorrer desse período; por disponibilizar os laboratórios do Núcleo de Química, Física e Sensorial (NQSA) do Centro de Alimentos para concretizar meu doutorado, e por tantas vezes contribuir com tudo.

A Cristiane Bonaldi Cano, pela parceria nessa viagem; pelos minutos, as horas, semanas dedicados à ajuda com as análises e as nossas eternas discussões dos dados gerados, das metodologias inovadoras, pelo apoio psicológico e por não me deixar desistir.

A Simone Alves da Silva, pelo apoio, a correção do texto, as conversas, o incentivo diário.

A Lucile Tiemi Abe Matsumoto e Viviane de Paula Acosta Franco, por me ajudarem sempre, pelas conversas, a amizade, e a substituição na diretoria.

A todos os funcionários do NQSA, meu muitíssimo obrigada, por aguentarem o cheiro de peixe; por sempre me darem condições de realizar meu trabalho; pela compreensão; e, quando eu terminar o doutorado, vamos fazer tudo o que prometi...

A todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz, em especial, aos do Centro de Alimentos, por, direta ou indiretamente, me ajudarem com o desenvolvimento do doutorado.

Aos meus pais, Mamerto e Lavize, por me proporcionarem a educação; por sempre me incentivarem a estudar; por me apoiarem em minhas decisões; por me ajudarem em tudo; e por cuidarem das crianças, quando tive de me dedicar ao doutorado.

Aos meus sogros, Inocêncio e Kimiko, por cuidarem dos meus filhos.

À minha irmã, Lyhandra, e família, pelo incentivo e a ajuda de sempre.

Aos meus tios e primos, que sempre me incentivaram.

Ao meu marido, Eduardo, pela eterna compreensão com meus estudos e dedicação ao doutorado; pelo cuidado com as crianças e comigo, e por todos os almoços e jantares.

Aos meus filhos, Eloísa, Theo e Melina, por serem minha inspiração; por me proporcionarem a possibilidade de pensar em um futuro com mais amor; por um dia poder ser exemplo para vocês; por poder ensinar que o conhecimento é nosso e ninguém pode tirá-lo de nós.

Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos.

(Isaac Newton)

*É melhor tentar e falhar, do que se preocupar e ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, do que se sentar, fazendo nada até o final.
Prefiro caminhar na chuva, do que, em dias frios, em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora "louco", do que em conformidade viver.*

(Martin Luther King)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Metabolismo das séries de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (AGPI n-3) e ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 (AGPI n-6).	29
Figura 2 - Relação dos ácidos graxos poli-insaturados ômega n-6/n-3 no decorrer dos anos.	32
Figura 3 - Benefícios dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na saúde	53
Figura 4 - Quantidade de EPA e DHA (ômega 3 index) na população de diversos países	61
Figura 5 - Consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 de origem marinha em diversos países	73
Figura 6 - Frascos com óleo de peixe, em ambiente inerte com nitrogênio, lacrados, acondicionados em cápsulas de porcelana em areia	101
Figura 7 - Amostras OP 48, OP 49, OP 50 e OP 51 submetidas a 200°C por 6h, em forno Mufla	102
Figura 8 - Planejamento do estudo das variáveis de oxidação	104
Figura 9 - Histograma das áreas do EPA e DHA geradas no planejamento fatorial	107
Figura 10 - Gráfico de Pareto representando as variáveis que foram otimizadas na metodologia de esterificação dos ácidos graxos	107
Figura 11 - Cromatograma da amostra de referência de óleo de peixe do FAPAS, analisado pelo método de Maia e Amaya-Rodrigues (1993) otimizado, com condições cromatográficas, segundo Fournier <i>et al.</i> (2007)	110
Figura 12 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H para as amostras OP 47	111
Figura 13 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H para as amostras OP 48	111
Figura 14 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H para as amostras OP 49	112
Figura 15 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H para as amostras OP 51	112
Figura 16 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 13C para as amostras OP 47	113
Figura 17 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 13C para as amostras OP 48	113

Figura 18 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³ C para as amostras OP 49.....	114
Figura 19 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ¹³ C para as amostras OP 51.....	114
Figura 20 - Valores de z-score de acidez determinados para as amostras de referência do COI	118
Figura 21 - Curva de titulação potenciométrica da análise de acidez, determinada pelo Titrand 905.....	118
Figura 22 - Valores de z-score de peróxido determinado para as amostras de referência do COI.....	119
Figura 23 - Curva de titulação potenciométrica da análise de peróxido, determinada pelo Titrand 905	120
Figura 24 - Valores do índice de acidez para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. — representa o limite de acidez	122
Figura 25 - Valores do índice de peróxido para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. — Representa o limite de peróxido, de acordo com o Codex Alimentarius	124
Figura 26 - Valores p-anisidina para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. — Representa o limite de p-anisidina, de acordo com o Codex Alimentarius	125
Figura 27 - Correlações dos dados do índice de peróxido e p-anisidina para os óleos de peixe comercializados no Estado de São Paulo	126
Figura 28 - Correlação entre índice de peróxido (A) e p-anisidina (B) e tempo a vencer das amostras de óleo de peixe comerciais.....	127
Figura 29 - Valores ToTox para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. — Representa o limite ToTox, de acordo com o Codex Alimentarius	127
Figura 30 - Percentual de amostras em desacordo com os níveis de oxidação observados em diversos estudos, comparados ao nosso estudo.....	128
Figura 31 - Composição dos óleos de peixes comerciais quanto aos ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos <i>trans</i> (AGT), ácidos graxos monoinsaturados (AGM) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)	131
Figura 32 - Composição de ácidos graxos: ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGM), ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e ácidos graxos <i>trans</i> (AGT) nos óleos de peixe, em diversos estudos.....	132

Figura 33 - Valores de ácidos graxos saturados (AGS) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo	133
Figura 34 - Valores de ácidos graxos <i>trans</i> (AGT) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo	134
Figura 35 - Valores de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo	135
Figura 36 - Valores de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo	136
Figura 37 - Valores analisados de EPA e DHA (g/100g) nas amostras de óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo	137
Figura 38 - Comparação dos valores de EPA (mg/porção) declarados pelo fabricante com o analisado.....	138
Figura 39 - Comparação dos valores de DHA (mg/porção) declarados pelo fabricante com o analisado.....	139
Figura 40 - Quantidade de amostras de óleo de peixe avaliadas por países nos estudos expostos no Quadro 2	141
Figura 41 - Quantidades (%) de amostras em desacordo dos valores de EPA, DHA e EPA+DHA analisados nos estudos (países) com os valores declarados nos rótulos dos produtos	142
Figura 42 - Perfil de ácidos graxos (% de ésteres metílicos de ácidos graxos) nas amostras de óleo de peixe comercializadas no Estado de São Paulo.....	144
Figura 43 - Cromatograma de uma amostra de óleo de peixe.....	149
Figura 44 - Dendograma das variáveis (ácidos graxos) para as amostras de óleo de peixe comercializados no Estado de São Paulo.....	150
Figura 45 - Dendograma das amostras de óleo de peixe comercializados no Estado de São Paulo	151
Figura 46 - Análise discriminante do perfil de ácidos graxos das espécies de peixe, de acordo com o Codex Alimentarius.....	152
Figura 47 - Classificação das amostras de óleo de peixe comercializadas no Estado de São Paulo, de acordo com a espécie	153

Figura 48 - Cromatogramas da amostra OP 47 - identificação dos isômeros dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)	154
Figura 49 - Superfícies de respostas relacionando a temperatura, o tempo e a área de cada ácido graxo após estudo em mufla	155
Figura 50 - Cromatogramas das amostras OP 47 (A), OP 48 (B), OP 49 (C) e OP 51 (D), após aquecimento a 200°C, por 6 horas	156
Figura 51 - Identificação dos isômeros <i>trans</i> dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)	157
Figura 52 - Espectro de RMN para ¹³ C da região de deslocamento característica de ácidos graxos <i>trans</i> para as amostras controle, OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51. ...	158
Figura 53 - Espectros de RMN de ¹³ C na região dos isômeros <i>cis/trans</i> dos ésteres metílicos do DHA para as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51	160
Figura 54 - Valores de índice de peróxido (mEq O ₂ /kg) analisados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerado	162
Figura 55 - Valores de p-anisidina observados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerado	163
Figura 56 - Comportamentos dos valores de EPA (mg/100g) quantificados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerada	164
Figura 57 - Comportamento dos valores de DHA (mg/100g) quantificados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerada	165
Figura 58 - Variáveis que influenciam na oxidação, avaliadas pelo planejamento fatorial 2 ⁵⁻²	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Conteúdo de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em óleos de peixe	22
Tabela 2 - Características dos ácidos graxos eicosapentaenóico, docosahexaenóico e docosapentaenóico	28
Tabela 3 - Limites estabelecidos pelo <i>Codex Alimentarius Stan CXS 329-2017</i> (2021)	41
Tabela 4 - Qualidade de óleos de peixes comercializados em diversos países	42
Tabela 5 - Comparação dos ácidos graxos encontrados nas dietas alemã e dos esquimós da Groenlândia, em 1976, em estudo de Bang, Dyerber e Sinclair (1980)	56
Tabela 6 - Recomendação para ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (EPA + DHA) de diversos órgãos internacionais	74
Tabela 7 - Recomendação de consumo de EPA e DHA pela GOED	76
Tabela 8 - Características dos métodos oficiais utilizados para a determinação de ácidos graxos em óleos de peixe	83
Tabela 9 - Informações relativas às amostras de óleo de peixe encapsulados comercializadas no Estado de São Paulo	87
Tabela 10 - Informação nutricional das amostras de óleo de peixe encapsulados comercializadas no Estado de São Paulo	89
Tabela 11 - Amostras de referências utilizadas para avaliação da exatidão dos métodos analíticos	92
Tabela 12 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionado de ordem 2^{4-1} para otimizar as condições da esterificação dos ácidos graxos em óleo de peixe	97
Tabela 13 - Planejamento fatorial no estudo de esterificação para obtenção dos EMAG em óleo de peixe.....	98
Tabela 14 - Condições de tempo e temperatura a que foram submetidas as amostras de óleo de peixe para a formação de ácidos graxos <i>trans</i> de EPA e DHA	101
Tabela 15 - Condições de tempo e temperatura para estudo de estabilidade acelerada	103
Tabela 16 - Planejamento fatorial fracionado de ordem 2^{5-2} para estudo das condições que afetam a oxidação dos óleos de peixe encapsulados.....	104

Tabela 17 - Valores de ácidos graxos (em g/100g) analisados pelo método de Maia e Amaya-Rodrigues (1993) otimizado para a amostra de referência da FAPAS® de óleo de peixe	109
Tabela 18 - Valores calculados para o teste F e teste t, em relação às análises realizadas com adição de padrão no solvente e na amostra	115
Tabela 19 - Parâmetros de validação dos métodos de cálculo utilizados	116
Tabela 20 – Desvio-padrão relativo de EPA e DHA nos ensaios de precisão e precisão intermediária.	117
Tabela 21 - Valores de índice de acidez, índice de peróxido, p-anidina e ToTox determinados nas amostras de óleo de peixe encapsulados comerciais	121
Tabela 22 - Valores do índice de peróxido (mEq/kg O ₂) nas amostras OP 47, OP 48, OP 49, e OP 51, para o estudo das variáveis que influenciam a oxidação	168
Tabela 23 - Valores de p-anidina nas amostras OP 47, OP 48, OP 49, e OP 51 para o estudo das variáveis que influenciam a oxidação.....	168
Tabela 24 - Valores da soma do ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), em g/100g, nas amostras OP 47, OP 48, OP 49, e OP 51 para o estudo das variáveis que influenciam a oxidação.....	169

LISTA DE SIGLAS

AG	Ácido graxo
AGM	Ácidos graxos monoinsaturados
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGPI n-3	Ácido graxo poli-insaturado da série ômega 3
AGPI n-3/n-6	Razão dos Ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3 e da série ômega 6
AGPI n-6	Ácido graxo poli-insaturado da série ômega 6
AGS	Ácidos graxos saturados
AGT	Ácidos graxos <i>trans</i>
AHA	Associação Americana do Coração
AL	Ácido linoleico
ALA	Ácido α -linolênico
ANC	Anchova
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
ARA	Ácido araquidônico
ARQ	Arenque
CG	Cromatografia gasosa
DCV	Doença cardiovascular
DHA	Ácido docosahexaenóico
DIC	Detector de ionização em chama
DPA	Ácido docosapentaenóico
DPR	Desvio padrão relativo
DRI	Ingestão diária recomendada
EFSA	Autoridade Européia para Alimentação Segura
EMAG	Éster metílico de ácido graxo
EP	<i>European Pharmacopeia</i>
EP	Ponto de equivalência
EPA	Ácido eicosapentaenóico
EUA	Estados Unidos da América
FADS 1	Enzima ácido graxo dessaturase 1
FADS 2	Enzima ácido graxo dessaturase 2
FAO	Organização para a Alimentação e a Agricultura
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GOED	<i>The Global Organization for EPA and DHA Omega-3s</i>
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IFFO	<i>The Marine Ingredients Organisation</i>
IM	Infarto do miocárdio
IN	Instrução Normativa
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
ISO	Organização Internacional de Normalização
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
L·	Radical alquil
LD	Limite de detecção
LOO·	Radical peroxil
LOOH	Hidroperóxido de ácido graxo

LOX	Lipoxigenase
LQ	Limite de quantificação
NDA	Painel de Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergia
O3I	Ômega 3 <i>index</i>
·OH	Radical hidroxil
OMS	Organização Mundial da Saúde
OP	Óleo de peixe (amostras)
pAV	Valor de p-anisidina
PCTFE	Policlorotrifluoretileno
PG	Prostaglandinas
PI	Padrão interno
PV	Índice de peróxido
PVC	Policloreto de vinila
PVDC	Cloreto de polivinilideno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SALC	Salmão de cativeiro
SALS	Salmão selvagem
SDA	Ácido estearidônico
SOD	Superóxido dismutase
SPM	Mediadores pró-resolução especializados
TAG	Triacilglicerídeo
TDHA	Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade
ToTox	Valor total de oxidação
UL	Nível máximo tolerável de ingestão
UV	Luz (radiação) ultravioleta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.2	ÓLEO DE PEIXE.....	21
1.1.1	Obtenção do óleo de peixe	23
1.1.2	Microencapsulação do óleo	25
1.2	ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 E METABOLISMO ...	26
1.3	Oxidação de ácidos graxos poli-insaturados e uso de anti-oxidantes.....	33
1.3.1	Pró-oxidante em sistemas alimentares	35
1.3.2	Avaliações da oxidação de óleos	39
1.4	Características dos óleos de peixes	40
1.5	Relação dos ácidos graxos ômega 3 com a saúde	53
1.5.1	Doenças Cardiovasculares	54
1.5.2	Saúde cognitiva	61
1.5.3	Outros benefícios.....	66
1.6	Recomendações nutricionais	71
1.7	Análise de ácidos graxos	78
1.7.1	Informações na rotulagem nutricional	79
2	OBJETIVOS.....	85
2.1	Objetivo Geral	85
2.2	Objetivos específicos	85
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	86
3.1	Material	86
3.1.1	Amostras	86
3.1.2	Padrões, reagentes e solventes.....	92
3.1.3	Vidrarias	93

3.1.4	Equipamentos e acessórios	93
3.2	Métodos	94
3.2.1	Determinação da acidez	94
3.2.2	Determinação do índice de peróxido.....	95
3.2.3	Determinação de p-anisidina	96
3.2.4	Cálculo do valor total de oxidação	96
3.2.5	Determinação de ácidos graxos.....	97
3.2.6	Identificação dos isômeros <i>trans</i> dos ácidos graxos EPA e DHA	100
3.2.7	Estudo de estabilidade dos óleos de peixes comerciais.....	102
3.2.8	Estudo das variáveis no processo de oxidação nos óleos de peixe encapsulados	103
3.2.9	Análise Estatística.....	105
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	106
4.1	Otimização da metodologia de esterificação dos ácidos graxos.....	106
4.2	Validação da quantificação dos ácidos graxos	115
4.3	Avaliação do método potenciométrico para determinação de acidez e peróxido	117
4.4	Resultados das amostras de óleo de peixe comercial.....	120
4.4.1	Parâmetros analisados de acordo com o Codex Alimentarius	120
4.4.2	Valores comparados com a informação nutricional fornecida pelos fabricantes	130
4.4.3	Perfil de ácidos graxos nas amostras de óleo de peixe comerciais.....	143
4.5	Identificação dos isômeros <i>trans</i> dos ácidos graxos EPA e DHA	154
4.6	Estudo de estabilidade dos óleos de peixes comerciais	161
4.7	Estudo das variáveis no processo de oxidação dos óleos de peixe	166
5	CONCLUSÃO	173
6	REFERÊNCIAS.....	175

1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 são foco de pesquisas desde o final da década de 1980. Em pesquisa na base de dados PubMed, realizada em julho de 2022, foram identificadas mais de 32.500 publicações usando o termo de pesquisa 'ômega-3' e 10 mil publicações usando o termo de pesquisa 'óleo de peixe'. As primeiras publicações identificadas utilizando esses termos datam de 1922 e 1945, e mostram como o tema está em constante estudo e ainda existem muitas questões a serem respondidas e sanadas, visando à segurança dos consumidores.

O óleo de peixes tornou-se um dos suplementos alimentares mais populares no mundo, com milhões de consumidores regulares. Nos Estados Unidos da América (EUA), foi o mais consumido por adultos e o segundo entre as crianças, nos anos de 2014 a 2018, movimentando cerca de US\$ 1 bilhão, anualmente. No Brasil, o uso de suplementos alimentares tem aumentado, anualmente, e apresenta uma projeção de crescimento de 10%, para 2023, com o óleo de peixes entre os mais consumidos.

Essa procura está atrelada a uma gama de benefícios a ele atribuído, como prevenção de doenças cardiovasculares, redução do declínio cognitivo, melhor gerenciamento de doenças inflamatórias (artrite, doença inflamatória intestinal, asma, câncer), e ser essencial nos desenvolvimentos cerebral e cognitivo dos bebês, além de ser indicado na suplementação para gestantes e lactantes.

Os óleos de peixe encapsulados compõem menos de 25% da produção total do setor, uma vez que o foco dessa produção não é a comercialização do produto final para o consumo humano. Desse modo, o processamento do óleo de peixe não abrange os cuidados necessários para evitar a oxidação e/ou perda dos ácidos graxos.

Muitas vezes, o consumidor não tem o conhecimento da origem, do local, da data do início da extração e dos níveis de oxidação desses suplementos. Portanto, devido aos benefícios à saúde atribuídos ao consumo do óleo de peixe, deve-se monitorar a qualidade desse produto, principalmente se é advindo de fonte marinha; se as quantidades de compostos bioativos (EPA e DHA) estão corretas; e qual o nível de oxidação.

Além disso, precauções e cuidados durante as análises, como a manipulação e preparação da amostra, o uso de técnicas adequadas de separação e detecção

analítica, e a expressão adequada dos resultados, são importantes fatores para a obtenção de resultados confiáveis nas avaliações dos óleos de peixe comercializados no Estado de São Paulo, uma vez que o consumidor tem o direito de adquirir um produto que garanta os efeitos desejados, cumprindo os parâmetros preconizados nas legislações.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.2 ÓLEO DE PEIXE

O óleo de peixe é obtido de peixes gordurosos, entre eles o atum, a sardinha, cavala, o arenque e a truta (BAKO; UMOGBAI; AWULU, 2017; TIMILSENA *et al.*, 2017), e é utilizado em diversos segmentos industriais, como em suplementos alimentares, alimentos funcionais, produtos farmacêuticos, adição em alimentos para animais; e como mais significativo, o uso como suplemento alimentar (FINCO *et al.*, 2017).

O interesse nos óleos de peixe é devido à presença de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (AGPI-n 3) nos óleos de peixe, entre eles o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6), que promovem diversos benefícios à saúde e, devido às suas insaturações, são suscetíveis à oxidação (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017).

De acordo com o *Codex Alimentarius* Stan CXS 329-2017 (2021): óleos de peixe destinados ao consumo humano são aqueles derivados da matéria-prima definida na Seção 2 no Código de Prática para Peixe e Produtos Pesqueiros do Stan CXC 52-2003 (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

Os óleos de peixe e os óleos de peixe concentrados são compostos, principalmente, de glicerídeos de ácidos graxos, enquanto os ésteres etílicos de óleos de peixe concentrados são compostos principalmente de ésteres etílicos de ácidos graxos. Os óleos de peixe podem conter outros lipídios e constituintes insaponificáveis naturalmente presentes (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

O *Codex Alimentarius* Stan CXS 329-2017 (2021) cita as seguintes classificações para o óleo de peixe:

- ✓ óleo de peixe concentrado: é aquele que contém 35 a 50% p/p da soma de EPA e DHA;
- ✓ óleo de peixe altamente concentrado: deve conter mais de 50% p/p da soma de EPA e DHA;
- ✓ ésteres etílicos concentrados de óleo de peixe contêm ácidos graxos como ésteres de etanol, dos quais 40 a 60% p/p são da soma de EPA e DHA.

- ✓ ésteres etílicos de óleo de peixe altamente concentrados contêm ácidos graxos como ésteres de etanol, dos quais mais de 60% p/p são como soma de EPA e DHA (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

Na Tabela 1 pode ser observada a quantidade desses ácidos graxos (AG) em diversas espécies de peixe, como a anchova, espécie mais usada para a produção do óleo de peixe, pois tem bom rendimento de extração do óleo e concentrações elevadas de EPA e DHA.

Os principais países produtores e exportadores de óleo de peixe são a Dinamarca, Espanha, Peru e Chile (FINCO *et al.*, 2017; CIRIMINNA *et al.*, 2017). Em 2021, houve uma retração, na produção de óleo de peixe, devido às condições climáticas, impactando até mesmo um dos maiores produtores: o Peru. Por outro lado, países como Chile, Islândia e Índia registraram crescimento em sua produção (IFFO, 2022). Os mercados que mais consomem óleo de peixe são a América do Norte, região em que os EUA contribuem com 85% do consumo; na Europa, destacam-se a Alemanha e o Reino Unido e, como países emergentes, a China e Índia (IFFO, 2022).

Tabela 1 - Conteúdo de ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) em óleos de peixe

Peixe (espécie)	DHA (g/100g)	EPA (g/100g)	EPA + DHA (g/100g)
Atum (rabilho)	1,14	0,36	1,5
Atum (voador)	0,63	0,23	0,86
Salmão (Atlântico, cativo)	1,46	0,7	2,16
Salmão (Atlântico, selvagem)	1,43	0,41	1,84
Salmão-rei (pacífico)	0,73	1,01	1,74
Salmão vermelho (Alasca)	0,70	0,53	1,23
Cavalinha (Atlântico)	0,70	0,50	1,20
Arenque (Atlântico)	1,11	0,91	2,02

(continua)

Tabela 1 (conclusão)

Peixe (espécie)		DHA (g/100g)	EPA (g/100g)	EPA + DHA (g/100g)
Truta	arco-íris (Atlântico, cativeiro)	0,82	0,33	1,15
Truta	arco-íris (Atlântico, selvagem)	0,52	0,47	0,99
Linguado		0,37	0,09	0,46
Bacalhau		0,15	< 0,01	0,15
Haddock	(família do bacalhau)	0,16	0,08	0,24
Bagre	(cativeiro)	0,13	0,05	0,18
Bagre	(selvagem)	0,14	0,1	0,24
Peixe espada		0,68	0,09	0,77
Garoupa		0,21	0,04	0,25
Camarão		0,14	0,17	0,31
Sardine		1,6	1,0	2,3
Anchova		2,21	1,14	3,35

Valores em g/100g de peixe. Fontes: Lee *et al.* (2009); Kris-Etherton *et al.* (2002); Leonardis; Macciola (2004); Bella *et al.* (2022); Harris (2004).

1.1.1 Obtenção do óleo de peixe

O óleo de peixe bruto é geralmente extraído de diversos pequenos peixes e subprodutos do processamento de farinha de peixe, incluindo escamas, vísceras e bexigas de ar (ZHANG *et al.*, 2022).

Existem diversos métodos para obter o óleo de peixe e a escolha depende do projeto, tamanho da operação, das implicações técnicas, do custo, da segurança e confiabilidade. As etapas comuns para qualquer processamento são:

- ✓ Aquecimento: promove a coagulação da proteína, rompimento e liberação dos depósitos de gordura e da água ligada;

- ✓ Prensagem (ou centrifugação): remove grande parte dos líquidos (estas etapas, normalmente, são realizadas após a captura do pescado, ainda a bordo do navio/barco);
- ✓ Separação dos líquidos (água e óleo): nessa etapa, é feita a separação da proteína, que é filtrada e armazenada (as proteínas sólidas tornam-se farinha de peixe);
- ✓ Evaporação: evaporar a água, concentrando as partes solúveis;
- ✓ Secagem: remove toda a água do prensado para tornar-se uma torta estável (CIRIMINNA *et al.*, 2017; BAKO; UMOGBAI; AWULU, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2016).

Após essas etapas, o óleo obtido é chamado de óleo bruto, pois contém impurezas e outros compostos indesejáveis, como ácidos graxos livres, fosfolípidos e compostos voláteis, que afetam negativamente a estabilidade do produto, conferindo aromas e sabores desagradáveis. Para retirar esses compostos indesejáveis, o método utilizado em larga escala na indústria é o refino a vapor, no qual utilizam-se temperaturas entre 180-270°C (FANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2022). A etapa de refino abrange os seguintes processos:

- ✓ Degomagem: para retirar os fosfolípidos;
- ✓ Neutralização: com a adição de álcalis, para eliminar ácidos graxos livres e diminuir a acidez do óleo;
- ✓ Lavagem;
- ✓ Branqueamento: para absorver pigmentos ou contaminantes;
- ✓ Desodorização.

A desodorização é uma etapa crítica do processo, pois emprega temperaturas entre 160°C e 200°C, para eliminar os compostos voláteis e indesejáveis. Pode provocar algumas reações secundárias, como oxidação, polimerização, ciclização, isomerização geométrica e migração de dupla ligação nos AG do óleo, causando perda dos AGPI (OLIVEIRA *et al.*, 2016; FANG *et al.*, 2018).

Zhang *et al.* (2022), demonstrou que após o refino do óleo de peixe o índice de acidez abaixo de 5,5 mgKOH/g para 0,29 mgKOH/g e o índice de peróxido de 1,73 meq/kg para 0,76 meq/kg; fato também observado em trabalho de Lima (2014), em óleo bruto de sardinha, com valores de índice de acidez e peróxido, de 4,4 mgKOH/g e 11,68 meq/kg, respectivamente.

O óleo de peixe também pode ser obtido dos resíduos do processamento do peixe, como da pele, moldura e aparas (tripa, barbatanas, cauda) (DEEPIKA *et al.*, 2014). A quantidade de AGPI n-3 nos subprodutos de salmão é 4 a 5 vezes maior, em comparação com o filé (DEEPIKA *et al.*, 2014).

Após esse processo, obtém-se, então, o óleo de peixe refinado, na sua maioria advindo de anchovas, que contém cerca de 30% de AGPI n-3, e os 70% restantes são uma mistura variável de outros componentes, incluindo colesterol, ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 (AGPI n-6), ácidos graxos saturados, entre outros (CIRIMINNA *et al.*, 2017).

Como os óleos de peixe apresentam grande fragilidade decorrente da oxidação dos AGs, as indústrias utilizam estratégias para minimizar a deterioração dos Ags; garantindo a sua qualidade no processamento, transporte e armazenamento, ou seja, realiza a adição de antioxidantes naturais ou sintéticos nos óleos para minimizar a oxidação, e realiza a micro e/ou encapsulação desses óleos, evitando o seu contato direto com agentes ambientais, inclusive oxigênio, calor, umidade e luz (CIRIMINNA *et al.*, 2017; TIMILSENA *et al.*, 2017).

1.1.2 Microencapsulação do óleo

A microencapsulação, ou encapsulação, é o processo para manter qualquer ingrediente ativo dentro de uma substância de revestimento. O ingrediente encapsulado é chamado de material do núcleo, ou ingrediente ativo, e o material externo de cápsula, de encapsulante, material de parede, ou membrana. Os materiais de parede protegem a substância do núcleo contra os efeitos ambientais (oxigênio, luz, umidade, etc.), melhorando assim sua estabilidade, as condições de manuseio e a aceitabilidade geral. Além de ampliar a vida útil, melhorar a funcionalidade dos aditivos e expandir a gama de aplicações dos princípios ativos (TIMILSENA *et al.*, 2017; KAUSHIK *et al.*, 2015).

Industrialmente, a técnica mais usada de microencapsulamento do óleo de peixe é a secagem por pulverização (TIMILSENA *et al.*, 2017; ESQUERDO *et al.*, 2018). O processo envolve quatro estágios: preparação de uma dispersão ou emulsão; homogeneização da dispersão; atomização da emulsão de alimentação; e desidratação das partículas atomizadas (SERFERT; DRUSCH; SCHWARZ, 2009).

Embora o encapsulamento impeça a oxidação lipídica, é necessário adicionar antioxidantes para garantir a proteção máxima durante o processamento e posterior armazenamento desses componentes (SERFERT; DRUSCH; SCHWARZ, 2009).

A indústria de alimentos tem crescente interesse no desenvolvimento de alimentos enriquecidos com AGPI n-3 e, para isso, utiliza o encapsulamento como estratégia para a proteção dos AGPI n-3, a fim de evitar a sua oxidação, perda de valor nutricional e formação de aromas desagradáveis (FANG *et al.*, 2018). Com essa técnica, podem ser fortificados com AGPI n-3, advindos dos óleos de peixes, diversos alimentos, como: pão, leite, sucos de frutas, chocolate, iogurte, pastas, manteiga de amendoim, e até mesmo carne (CIRIMINNA *et al.*, 2017).

Tanto o óleo de peixe microencapsulado, como os alimentos enriquecidos em AGPI n-3, são eficientes em fornecer esses AGs com a mesma biodisponibilidade (CIRIMINNA *et al.*, 2017).

1.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA 3 E METABOLISMO

Os ácidos graxos são os principais componentes dos lipídios e contêm uma cadeia alifática e um grupo ácido carboxílico. A maioria dos ácidos graxos de ocorrência natural possui número par de carbonos em uma cadeia linear, devido ao processo biológico de alongamento da cadeia, no qual dois carbonos são adicionados cada vez. Os ácidos graxos costumam ser classificados como saturados e insaturados, sendo que os insaturados apresentam ligações duplas. Os ácidos graxos podem ser descritos por nomes sistemáticos, comuns e abreviados (DAMODARAN; PARKIN, 2018; MOZAFFARIAN; WU, 2011).

Os AGPIs são compostos do grupo metileno e, naturalmente, todas as duplas ligações encontradas estão na configuração *cis* (FINCO *et al.*, 2017). As ligações duplas em configuração *cis* farão com que o ácido graxo se organize em uma configuração curvada. Logo, os ácidos graxos insaturados não são lineares, dificultando sua auto-orientação em configurações muito empacotadas.

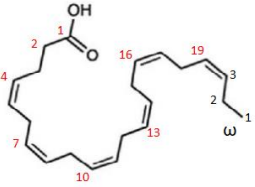
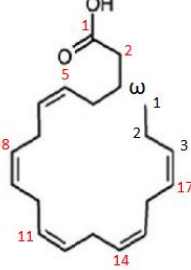
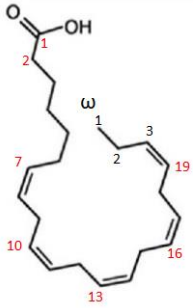
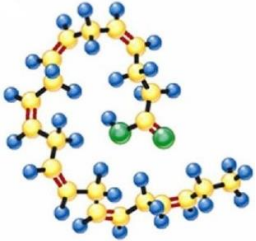
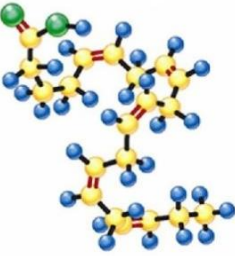
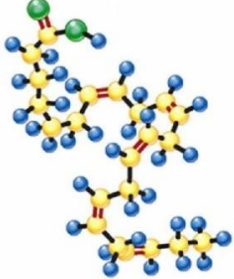
Devido ao impedimento espacial para o empacotamento, a interação de van der Waals entre ácidos graxos insaturados são relativamente fracas. Portanto, esses ácidos ocorrem mais no estado líquido, à temperatura ambiente, ou seja, seu ponto de fusão/temperatura de solidificação é relativamente baixo. Quanto mais ligações duplas forem adicionadas, mais curvada tornar-se-á a molécula, mais fraca a interação de van der Waals e menor o ponto de fusão (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

As posições das ligações duplas no sistema *International Union for Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) estão numeradas por delta (Δ), que indica a posição da ligação dupla a partir do ácido carboxílico. Por exemplo, o ácido oleico, que tem 18 átomos carbonos e uma ligação dupla, seria ácido 9-octadecenoico; e o ácido linoleico, que tem 18 carbonos e duas ligações duplas, seria ácido 9,12-octadecadienoico.

O sistema de numeração alternativa, que indica a posição das ligações duplas a partir do grupo metil terminal do ácido graxo, é conhecido como sistema ômega (ω) (em alguns casos, designado pela notação taquigráfica e “n”). O sistema ω é útil em alguns casos, pois pode agrupar os ácidos graxos, com base em sua atividade biológica e sua origem biossintética, já que muitas enzimas reconhecem os ácidos graxos a partir da terminação metil da molécula, quando esterificada ao glicerol (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

Os AGPIs n-3 mais estudados e importantes no óleo de peixe são: o ácido eicosapentaenóico, EPA (20:5 n-3) e o ácido docosahexaenóico, DHA (22:6 n-3), há pesquisas mais recentes demonstrando benefícios do ácido docosapentaenóico, DPA (22:5 n-3) (Tabela 2). Na Tabela 2 podem ser observadas características dos AGPI n-3. Devido à longa cadeia de hidrocarbonetos, o EPA, o DPA e o DHA são, por vezes, denominados de ácidos graxos de cadeia longa n-3, de modo a diferenciá-los dos ácidos graxos n-3 derivados de plantas que possuem 18 carbonos como o ácido α -linolênico (ALA; 18: 3n-3) e ácido estearidônico (SDA; 18: 4n-3) (13).

Tabela 2 - Características dos ácidos graxos eicosapentaenóico, docosahexaenóico e docosapentaenóico

Ácido graxo	DHA (22:6) n-3	EPA (20:5) n-3	DPA 22:5 n-3
Cadeia carbônica			
Estrutura 3D			
Nome IUPAC	all- <i>cis</i> - 4,7,10,13,16,19- docosahexaenóico	all- <i>cis</i> - 5,8,11,14,17- eicosapentaenóico	all- <i>cis</i> - 7,10,13,16,19- docosapentaenóico
Nome Comum	ácido cervônico	ácido timnodónico	ácido clupanodónico
Ponto de fusão	-44 °C	-54 °C	-80 °C

DHA: ácido docosahexaenóico; EPA: ácido eicosapentaenóico; DPA: ácido docosapentaenóico. IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*. Fontes: Calder (2018); Pubchem (2022); Mozaffarian; Wu (2011).

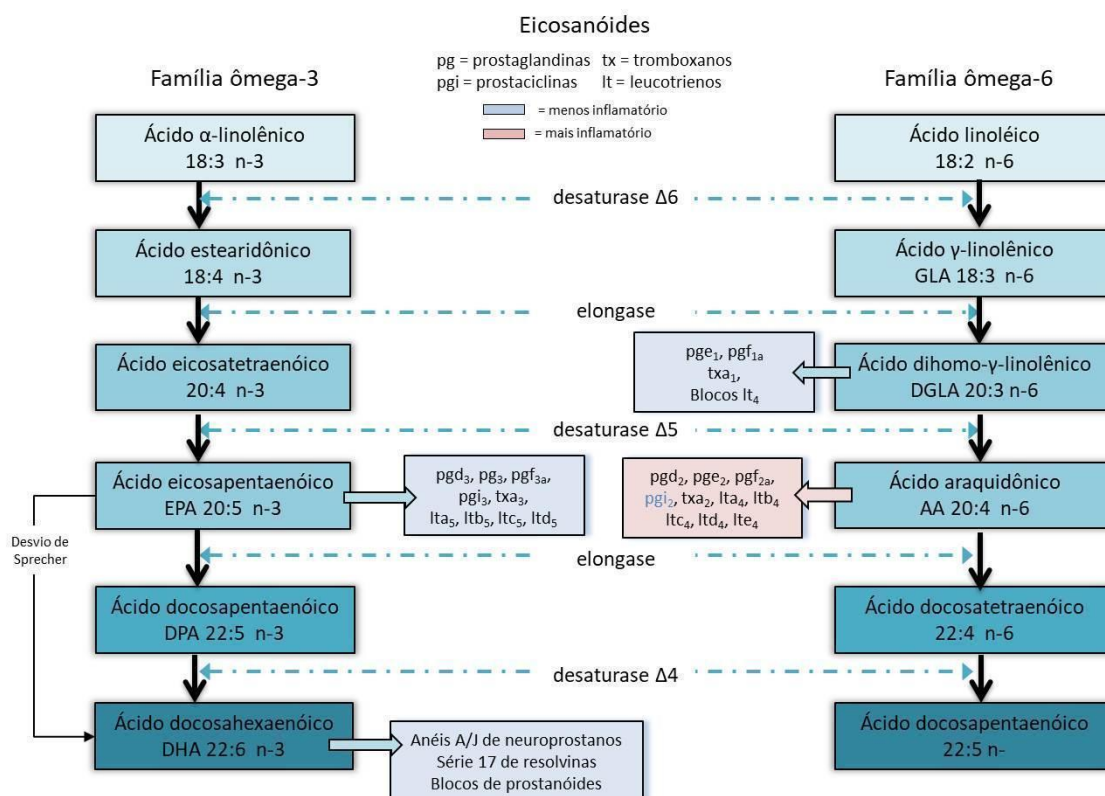
Tanto DHA, EPA e DPA estão metabolicamente relacionados entre si e a outros AGs n-3 e podem ser sintetizados a partir do ácido α -linolênico derivado de plantas (ALA; 18:3 n-3) ou obtido diretamente da dieta (CALDER, 2018). ALA pode ser convertido em EPA e DHA, por processo de dessaturação e alongamento. Estudos mostram que, em homens jovens saudáveis, aproximadamente 8% do ALA dietético é convertido em EPA e 4% é convertido em DHA. Enquanto em mulheres jovens

saudáveis, 21% do ALA da dieta é convertido em EPA e 9% para DHA (HATHAWAY III et al., 2020); o restante de ALA é degradado pela β -oxidação (GANESAN; BROTHENSEN; MCMAHON, 2014).

Portanto, devido a essa baixa conversão, o consumo de EPA e DHA pela dieta é fundamental (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2022). As principais fontes desses AGs são os frutos do mar, especialmente peixes gordurosos; a gordura e os tecidos de mamíferos marinhos, como baleias e focas; em suplementos alimentares, como óleos de peixe, óleo de fígado de bacalhau e óleo de krill; em alguns óleos de alga (CALDER, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2017).

As enzimas da interconversão de AGPI n-3 são compartilhadas com a via biossintética dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 (AGPI n-6) análoga na conversão de ácido linoleico (AL, 18:2 n-6) em ácido araquidônico (ARA; 20:4 n-6) (Fig. 1).

Figura 1 - Metabolismo das séries de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 (AGPI n-3) e ácidos graxos poli-insaturados ômega 6 (AGPI n-6).



Fonte: Kus-Yamashita; Mancini Filho (2022).

Portanto, há competição entre AGPI n-6 e n-3 pelas enzimas de dessaturação. Tanto a enzima ácido graxo dessaturase 1 (FADS1) quanto a enzima ácido graxo dessaturase 2 (FADS2) preferem ALA a AL. No entanto, uma alta ingestão de AL, como a que caracteriza as dietas ocidentais, interfere na dessaturação e no alongamento do ALA. Da mesma forma que os ácidos graxos *trans* (AGT) interferem na dessaturação e alongamento de AL e ALA. (SIMOPOULOS, 2016).

Os AGPI n-6 e AGPI n-3 não são interconvertíveis, mas metabólica e funcionalmente distintos e, muitas vezes, têm efeitos fisiológicos opostos, portanto, seu equilíbrio na dieta é importante. Quando os humanos ingerem peixe ou óleo de peixe, o EPA e o DHA da dieta substituem parcialmente os AGPIs n-6, especialmente o ARA, nas membranas de provavelmente todas as células, mas, especialmente, nas membranas de plaquetas, eritrócitos, neutrófilos, monócitos e células hepáticas (SIMOPOULOS, 2016).

Os AGPIs obtidos pela dieta são incorporados diretamente nos fosfolípidos das membranas celulares. O aumento da ingestão de EPA e DHA é refletida no aumento da concentração (e proporções) de ambos os AGs nos lipídios do sangue, nas células sanguíneas e em muitos tecidos, incluindo no músculo esquelético, coração, na mucosa intestinal e no tecido adiposo (CALDER, 2018).

Portanto, a quantidade de EPA e DHA é variável, e de acordo com a dieta, enquanto os ácidos graxos saturados (AGS) ou monoinsaturados (AGM) permanecem constantes, sugerindo que os níveis de AGPI da membrana dependem da sua ingestão e não da biossíntese no organismo (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2017; CALDER, 2018). A incorporação de EPA é mais rápida do que a incorporação de DHA, e a perda também. A retenção de DHA deve-se à sua composição estrutural e/ou funcional na preservação dos mecanismos metabólicos (CALDER, 2018).

O aumento no teor de EPA e DHA nas membranas celulares resulta em diminuição da produção de eicosanóides de ARA. Os eicosanóides são derivados oxidados de AGPI com 20 carbonos e metabolizados através das enzimas ciclooxigenase, dando origem a prostaglandinas (PG) e tromboxanos, e das enzimas lipoxigenase, que originam os leucotrienos e são precursores do citocromo P450 (CALDER, 2018).

Devido ao aumento de AGPI n-6 na dieta ocidental, os produtos metabólicos eicosanóides do ARA, especificamente prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos,

hidroxiácidos graxos e lipoxinas, são formados em quantidades maiores do que aqueles derivados dos AGPIs n-3, especificamente EPA (SIMOPOULOS, 2016).

Os eicosanóides do ARA são biologicamente ativos em quantidades muito pequenas e, se formados em grande quantidade, contribuem para a formação de trombos e ateromas; a distúrbios alérgicos e inflamatórios, particularmente em pessoas suscetíveis; e à proliferação de células, impactando na inflamação, na função imune, na coagulação do sangue, na vasoconstrição (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2017; CALDER, 2018; SIMOPOULOS, 2016).

Assim, uma dieta rica em AGPI n-6 transforma o estado fisiológico para um estado pró-inflamatório, pró-trombótico e pró-agregatório, com aumento da viscosidade sanguínea, vasoespasmo, vasoconstrição e proliferação celular (SIMOPOULOS, 2016). EPA e DHA são substratos para rotas biossintéticas mais complexas, que resultam na formação de mediadores lipídicos (resolvinas, protectinas, maresinas), que estão relacionados na resolução da inflamação e modulação da função imune. Recentemente, descobriu-se que o DPA dá origem a uma família similar de mediadores (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2017; CALDER, 2018).

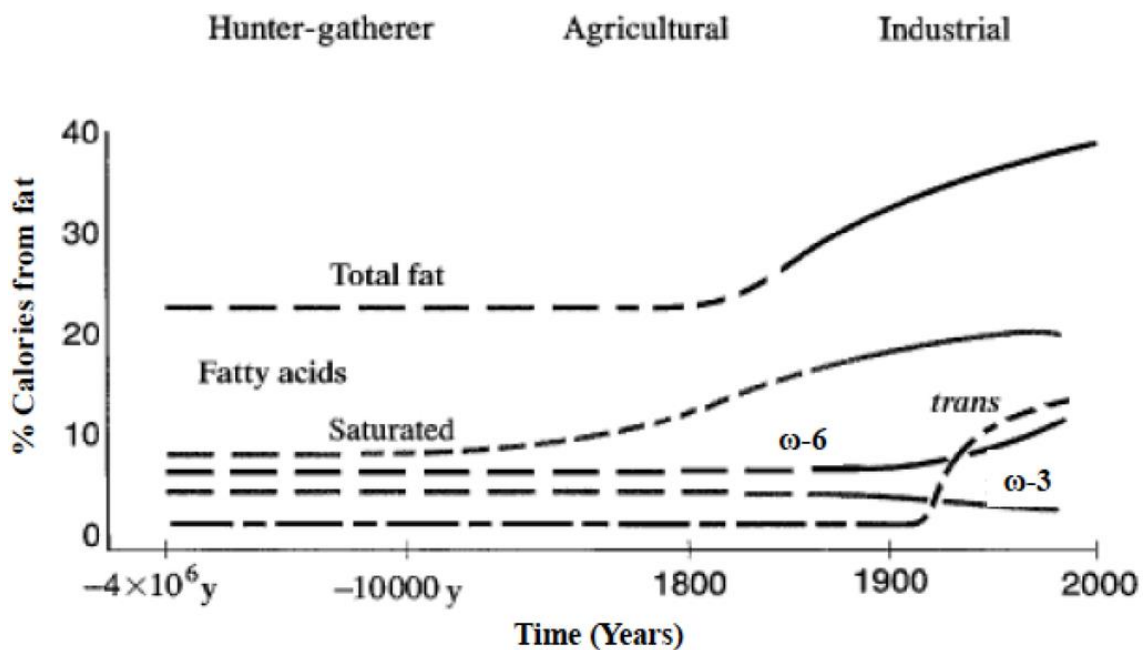
Devido às suas propriedades físicas, EPA e DHA fornecem um ambiente específico nas membranas celulares e modulam a funcionalidade de receptores, transportadores, canais iônicos e enzimas de sinalização (CALDER, 2018), uma vez que a rigidez, ou flexibilidade, das membranas celulares, depende do grau de insaturação do AG que forma os seus fosfolípidos.

Os AGSs, nos fosfolípidios das membranas, refletem em uma estrutura embalada, paracristalina, de movimentos limitados; enquanto os AGPIs, devido às suas duplas ligações, formam uma estrutura “com torções” (Tabela 1), proporcionando maior flexibilidade e movimento na membrana celular (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2017).

Uma mudança absoluta e relativa no consumo de AGPI n6/n3 ocorreu nas dietas da população ocidental, nos últimos 150 anos. Houve um equilíbrio entre AGPI n-6 e AGPI n-3, por milhões de anos, durante a longa história evolutiva do homem, e mudanças genéticas ocorreram, em parte, como resposta a essas influências alimentares. Durante esse período, os AGPI n-3 estavam contidos em todos os alimentos consumidos: carne, plantas silvestres, ovos, peixes, nozes e frutas.

No entanto, mudanças rápidas na dieta, em curtos períodos, como ocorreram nos últimos 100-150 anos, são um fenômeno totalmente novo na evolução humana. Essas mudanças na dieta (Fig. 2) resultam do agronegócio e da agricultura moderna, que levaram à alimentação animal composta principalmente de grãos, em vez de animais, e à produção de óleos vegetais a partir de sementes, como milho, girassol, cártamo, caroço de algodão, e soja, que são ricos em AGPI n-6, mas pobres em AGPI n-3 (SIMOPOULOS, 2010). Desse modo, estima-se que a dieta ocidental atual seja “deficiente” em AGPI n-3, com uma proporção de AGPI n-6/n-3 de 15-20:1, em vez de 1:1, como no caso de animais selvagens e, presumivelmente, dos seres humanos (SIMOPOULOS, 2008)

Figura 2 - Relação dos ácidos graxos poli-insaturados ômega n-6/n-3 no decorrer dos anos.



Fonte: Simopoulos (2008).

A proporção de AGPI n-6/n-3 de 3:1 a 4:1 poderia prevenir a patogênese de muitas doenças induzidas pelas dietas ocidentais de hoje, uma meta de 1:1 a 2:1 parece ser consistente com estudos sobre aspectos evolutivos da dieta, do neurodesenvolvimento e da genética. Ou seja, uma proporção equilibrada de ácidos graxos AGPI n6/n3 é importante para a saúde e para a prevenção de doenças coronarianas e outras doenças crônicas não transmissíveis (SIMOPOULOS, 2010).

Os ácidos graxos AGPIs n-3 são considerados, pela Food and Drug Administration (FDA), como geralmente reconhecido como seguro (GRAS), ou seja, poderão causar alguns efeitos adversos leves e não perturbadores, como um gosto desagradável, mau hálito, e alteração no odor corporal, ou sintomas gastrointestinais leves, como náuseas, vômitos, fezes amolecidas, ou aumento da frequência de fezes. Poucos pacientes relatam sintomas neurológicos, como tontura e insônia; no entanto, a maioria dos sintomas é muito leve e autolimitada (HATHAWAY III *et al.*, 2020).

1.3 OXIDAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS E USO DE ANTI-OXIDANTES

“Oxidação lipídica” é o termo geral utilizado para descrever uma sequência de reações químicas resultantes da interação de lipídios com oxigênio. Durante as reações de oxidação de lipídeos, os ácidos graxos esterificados em triacilgliceróis e fosfolipídios decompõem-se, formando moléculas pequenas e voláteis, que produzem os aromas indesejados conhecidos como rancidez oxidativa (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

A instabilidade dos AGPI n-3 é devida ao grande número de duplas ligações e às suas posições na cadeia carbônica, pois os carbonos bisálicos possuem pouca energia de ativação, perdendo facilmente um hidrogênio e formando, assim, um radical livre que desencadeia o processo de oxidação (ALBERT *et al.*, 2013; HALVORSEN; BLOMHOFF, 2011).

Os radicais livres são moléculas ou átomos que apresentam elétrons não pareados. As espécies de radicais livres podem variar muito, no que diz respeito à energia. O radical hidroxil (\bullet OH), por exemplo, apresenta energia muito elevada e, de fato, pode oxidar qualquer molécula, causando abstração de hidrogênio. A cinética da oxidação de lipídios nos alimentos costuma apresentar uma fase inicial caracterizada pelo aumento exponencial da taxa de oxidação. Essa fase tem influência da temperatura; concentração de oxigênio; grau de insaturação dos ácidos graxos; atividade de pró-oxidantes; e aumento da concentração de antioxidantes (ALBERT *et al.*, 2013; HALVORSEN; BLOMHOFF 2011; DAMODARAN; PARKIN, 2018; TAO, 2015).

A via de oxidação de ácidos graxos pode ser composta por três etapas gerais: iniciação, propagação e terminação.

- ✓ Iniciação: Essa etapa descreve a abstração do hidrogênio de um ácido graxo para a formação de um radical ácido graxo conhecido como radical alquil ($L\cdot$). Uma vez que o radical alquil é formado, o radical livre é estabilizado pela deslocalização sobre a ligação dupla, resultando em deslocamento da ligação dupla e, no caso de ácidos graxos poli-insaturados, a partir da formação de ligações duplas conjugadas. O deslocamento da localização pode produzir ligações duplas nas configurações *cis* ou *trans*, com predominância da *trans*, devido à sua maior estabilidade. A facilidade para a formação de radicais de ácidos graxos aumenta com o crescimento da insaturação. Em ácidos graxos poli-insaturados, as ligações duplas se apresentam em uma configuração de pentadieno com carbono metilênico intermediário. Como a ligação covalente carbono-hidrogênio desse carbono é enfraquecida por duas ligações duplas, sua energia de dissociação de ligação é ainda menor. À medida que a energia de dissociação da ligação carbono-hidrogênio diminui, a abstração do hidrogênio torna-se mais fácil e a oxidação de lipídeos, mais rápida. Estima-se que o ácido linoleico (18:2) seja de 10 a 40 vezes mais suscetível à oxidação do que o ácido oleico (18:1). Na maioria dos casos, as taxas de oxidação dobram, com a adição de um carbono metilênico (DAMODARAN; PARKIN, 2018);
- ✓ Propagação: A primeira etapa da propagação envolve a adição de oxigênio ao radical alquil. A combinação de radicais alquil com um dos radicais do oxigênio triplete resulta na formação de uma ligação covalente. O outro radical do oxigênio permanece livre. O radical resultante é conhecido como radical peroxil ($LOO\cdot$). A energia elevada dos radicais peroxil permite que promovam a abstração de hidrogênio de outra molécula. Como a ligação covalente carbono-hidrogênio de ácidos graxos insaturados é fraca, essas substâncias são suscetíveis ao ataque de radicais peroxil. A adição de hidrogênio ao radical peroxil resulta na formação de um hidroperóxido de ácido graxo ($LOOH$) e na formação de novos radicais alquil em outros ácidos graxos. Portanto, a reação é propagada de um ácido graxo para outro (DAMODARAN; PARKIN, 2018);
- ✓ Terminação: Essa reação descreve a combinação de dois radicais para a formação de espécies não radicais. Na existência de oxigênio, o radical livre predominante é o radical peroxil, uma vez que o oxigênio será adicionado aos radicais alquil em taxas de difusão limitadas. Logo, sob condições atmosféricas,

as reações de terminação podem ocorrer entre radicais peroxil e alcooxil (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

A oxidação de lipídios costuma ser chamada de auto-oxidação. O prefixo “auto” significa “que age por si”, portanto, o termo “auto-oxidação” é usado para descrever a geração por perpetuação própria de radicais livres a partir de ácidos graxos insaturados quando há oxigênio durante a oxidação lipídica. Na etapa de iniciação, a abstração de hidrogênio de ácidos graxos insaturados resulta na produção de um único radical livre.

A adição de oxigênio ao radical alquil para a formação de um radical peroxil e a abstração subsequente de hidrogênio, a partir de outro ácido graxo ou antioxidante, para a formação de um hidroperóxido lipídico, na etapa de propagação, não resultam em aumento líquido de radicais livres. Logo, se a “auto-oxidação” for a única reação na oxidação de lipídeos, a formação de produtos de oxidação aumentará linearmente a partir do tempo zero (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

A reação de AG insaturados, contendo estruturas de pentadieno com oxigênio, é possível, devido aos átomos de hidrogênio facilmente extraíveis da cadeia carbônica, o que permite a inserção de oxigênio molecular. Após a reação com o oxigênio do ar que nos rodeia, algumas das ligações químicas nas moléculas de ácido graxo reorganizam-se e outras reações ocorrem para formar novas moléculas. Todos os lipídios contendo ácidos graxos insaturados oxidam-se, ao longo do tempo, seja em óleos de cozinha, ou em cápsulas de óleo de peixe, e podem causar rancidez no óleo, por isso as empresas tentam gerenciar esse processo (ALBERT *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2016).

1.3.1 Pró-oxidante em sistemas alimentares

Os pró-oxidantes, encontrados em todos os sistemas alimentares, são compostos ou fatores que causam ou aceleram a oxidação de lipídeos. Muitos pró-oxidantes não são catalisadores verdadeiros, pois são alterados durante a reação (p. ex., o oxigênio singlete é convertido em hidroperóxido e o íon ferroso é convertido ao estado férrico). Os pró-oxidantes podem acelerar a oxidação de lipídeos por interação direta com ácidos graxos insaturados para a formação de hidroperóxidos lipídicos ou

para a promoção da formação de radicais livres (p. ex., metais de transição ou decomposição de peróxidos estimuladas por radiação UV).

Deve-se notar que os hidroperóxidos lipídicos não contribuem para aromas indesejáveis e, portanto, não causam rancidez de forma direta. No entanto, os hidroperóxidos são substratos importantes da rancidez, pois sua decomposição costuma resultar em cisões nos ácidos graxos que produzem compostos voláteis de baixa massa molecular, responsáveis por aromas indesejáveis (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

1.3.1.1 Principais pró-oxidantes em sistemas alimentares

Os principais pró-oxidantes são:

- ✓ Oxigênio singlete: A formação mais comum de produção do oxigênio singlete é por fotossensitização. Clorofila, riboflavina e mioglobina são os fotossensores de alimentos que podem absorver energia da luz, formando um estado singlete excitado, o qual é convertido para o estado triplete excitado. Esse pode reagir diretamente com substratos, como ácidos graxos insaturados, e abstrair um hidrogênio para causar a iniciação da oxidação lipídica (DAMODARAN; PARKIN, 2018).
- ✓ Lipoxigenase (LOX): Diversos tecidos vegetais e animais contêm enzimas conhecidas como LOXs, as quais produzem hidroperóxidos lipídicos. A LOX de sementes de plantas, como soja e ervilha, existe em diversas isoformas) As LOXs de plantas são enzimas citoplasmáticas que contêm ferro sem grupo heme. O ferro, na LOX inativa, está no estado ferroso. A ativação ocorre pela oxidação do ferro ao estado férrico, um processo que costuma ser promovido por peróxidos. A LOX, então, catalisa a abstração do hidrogênio do carbono metilênico, a fim de formar o radical alquil e a conversão do ferro da LOX, o qual retorna ao estado ferroso, resultando na formação de um complexo LOX-radical alquil graxo. Um elétron do íon ferroso é então doado ao radical peroxil com a finalidade de formar um ânion peroxil. Quando o ânion peroxil reage com o hidrogênio, para formar o hidroperóxido, o ácido graxo é liberado da enzima. Uma vez que o oxigênio é removido do sistema, a enzima abstrai um hidrogênio de um ácido graxo e o ferro é convertido ao estado ferroso. Como não há oxigênio, o radical alquil é liberado e a LOX volta à sua forma inativa. As LOXs

também têm sido descritas em tecidos animais, em especial, em tecidos com muita associação ao sistema circulatório (p. ex., guelras de peixes).

- ✓ Hidroperóxidos: Os hidroperóxidos lipídicos são encontrados em todos os alimentos que contêm lipídios, e também em alimentos quando é utilizado como auxiliar em processamento e quando é produzido por enzimas como a superóxido dismutase (SOD). Os triacilgliceróis de alimentos apresentam 1-100nmol de hidroperóxidos por grama de lipídeo. Isso corresponde a um número 400-1.000 vezes superior às concentrações de hidroperóxidos estimadas *in vivo* (p. ex., lipídeos plasmáticos), o que sugere que a oxidação ocorre durante a extração e o refino de óleos e gorduras. Os hidroperóxidos lipídicos podem ser decompostos por temperaturas elevadas, durante o processamento térmico, ou por diversos pró-oxidantes. Após a decomposição, eles produzem radicais adicionais; um fator que pode ser responsável pelo aumento exponencial da oxidação observada após a fase lag ou período de indução, ocorrente em muitos alimentos. A decomposição de hidroperóxidos lipídicos também leva à formação de radicais alcooxil, os quais podem ingressar em reações de β -clivagem. A reação de β -clivagem é a principal via de decomposição de ácidos graxos em compostos de baixa massa molecular, os quais são voláteis o suficiente para serem percebidos como ranço oxidativo (DAMODARAN; PARKIN, 2018).
- ✓ Metais de transição: Os metais de transição são encontrados em todos os alimentos, pois são constituintes comuns de material biológico, água, ingredientes e materiais de embalagem. São os principais pró-oxidantes dos alimentos, diminuindo a estabilidade oxidativa de alimentos e tecidos biológicos por sua capacidade de decompor hidroperóxidos em radicais livres. Os radicais hidroxil são produzidos a partir de peróxido de hidrogênio, enquanto os radicais alcooxil são produzidos a partir de peróxidos lipídicos. Quando o ferro e o hidroperóxido estão envolvidos com essa via, ocorre a reação de Fenton. A concentração, o estado químico e o tipo de metal influenciarão na velocidade da decomposição do hidroperóxido. O cobre e o ferro são os metais de transição que mais costumam causar essas reações em alimentos, enquanto o ferro geralmente é encontrado em concentrações superiores, em comparação ao cobre. Esse é mais reativo no estado cuproso (Cu^+), decompondo o peróxido de hidrogênio com velocidade 50 vezes superior à decomposição

promovida pelo íon ferroso (Fe^{2+}). O estado redox também é importante, sendo que o Fe^{2+} decompõe hidrogênio 105 vezes mais rápido do que o Fe^{3+} . Além disso, o Fe^{2+} é mais hidrossolúvel do que o Fe^{3+} , o que indica que estará mais disponível para promover a decomposição de hidroperóxidos em alimentos hidrossolúveis. O tipo de peróxido também é importante, nesse processo. Por exemplo, o Fe^{2+} decompõe hidroperóxidos lipídicos cerca de 10 vezes mais rápido do que o peróxido de hidrogênio (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

- ✓ Luz e temperaturas elevadas: A UV e a luz visível podem promover a decomposição de hidroperóxidos para produzir radicais livres. Logo, embalagens que diminuem a exposição à luz podem atenuar a velocidade da oxidação lipídica. Além disso, temperaturas elevadas promovem a decomposição de hidroperóxidos lipídicos. De fato, o acúmulo de hidroperóxidos lipídicos não costuma ser percebido em óleos de fritura, pois a ruptura deles ocorre rapidamente após serem formados (DAMODARAN; PARKIN, 2018). A AGPI n-3, se oxidar sob a luz, também é influenciada por impurezas, como proteína ou metais pesados e seu conjugado; os fosfolípidos são mais propensos à oxidação do que os triglicerídeos. Como a peroxidação é uma reação em cadeia acelerada, pequenas concentrações de peróxidos, no óleo de origem, ou a exposição a condições de oxidação, durante o processamento, podem ter um notável efeito na taxa de oxidação. Cabe ressaltar que o processo de desodorização para remover o odor de peixe geralmente envolve alta temperatura, o que pode acelerar a oxidação secundária. Provavelmente, a peroxidação significativa nos suplementos ocorrerá à temperatura ambiente e durante o armazenamento. Além disso, mesmo no óleo armazenado no escuro, a 4°C , esses ácidos graxos podem se oxidar no primeiro mês de acondicionamento (ALBERT *et al.*, 2013).

Os lípidos altamente insaturados, como EPA e DHA, são especialmente propensos à oxidação e requerem manuseio especial para evitar que, nesses produtos, essa reação ocorra. Algumas dessas medidas incluem o uso de antioxidantes para retardar a taxa de oxidação, limitando a exposição ao oxigênio durante a fabricação; o refino dos óleos pode ocorrer a vácuo e a armazenagem deve ser em meio inerte, com uso de gás nitrogênio, pois desloca o ar. Essas estratégias

parecem ser efetivas e são amplamente utilizadas na fabricação de produtos com ômega-3 (ISMAIL *et al.*, 2016).

1.3.2 Avaliações da oxidação de óleos

Existem duas opções analíticas usadas para medir a oxidação em óleos, o valor de peróxido (PV), que mede os produtos primários da oxidação, e o valor de p-anisidina (pAV), que mede os compostos secundários da oxidação. Os métodos que medem PV e pAV são amplamente utilizados para determinar a qualidade oxidativa de óleos e alimentos suplementados com esses compostos.

O PV é uma medida quantitativa de peróxidos em um óleo, uma vez que esses compostos são os primeiros gerados na oxidação dos AGs; portanto, o PV é uma medida de oxidação primária (ALBERT *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2016). O método é bastante robusto e usado em ampla variedade de óleos (ALBERT *et al.*, 2013).

Entretanto, por se tratar dos primeiros produtos de oxidação, podem aparecer precocemente na oxidação de lipídeos. E durante as etapas mais avançadas de oxidação, as concentrações desses compostos diminuem, bem como suas taxas de formação, que se tornam mais lentas do que as de decomposição (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

Desse modo, um valor baixo de PV não indica que o óleo é de qualidade, pois, devido à volatilidade, esses compostos primários não contribuem diretamente para aromas e sabores indesejáveis. Além disso, sob certas condições (como temperaturas elevadas [óleos de fritura] ou conteúdo elevado de metais de transição), a concentração de produtos primários pode apresentar pouco aumento líquido, pois suas taxas de decomposição são relativamente altas.

Isso produziria resultados enganosos, já que um óleo muito rançoso pode apresentar concentrações muito baixas de produtos primários da oxidação de lipídeos, e, conseqüentemente, baixo valor de PV (DAMODARAN; PARKIN, 2018; ALBERT *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2016).

Os produtos secundários da oxidação de lipídios são compostos que surgem da decomposição de hidroperóxidos de ácidos graxos por reações de β -clivagem; essas reações podem gerar centenas de compostos distintos, tanto voláteis como não voláteis, como aldeídos e álcoois (DAMODARAN; PARKIN, 2018; ALBERT *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2016). As carbonilas, um dos produtos de decomposição, podem

ser medidas por conjugação com p-anisidina, para formar produtos que absorvem em 350 nm.

Esse método é útil, pois pode medir carbonilas não voláteis e de alta massa molecular. A pAV também é usada para medir a oxidação em produtos como óleos de peixes, que costumam passar por destilação intensa por vapor, durante o refino. Por essa razão, o valor de pAV é útil em óleos de peixes, por fornecer a indicação da qualidade do óleo antes da destilação por vapor, uma vez que os compostos não voláteis de alta massa molecular são retidos pelo óleo (DAMODARAN; PARKIN, 2018; ALBERT *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2016). A determinação de pAV tem forte correlação com a análise sensorial, pois avalia os compostos causadores de odores e sabores indesejáveis em óleos rançosos (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

Uma terceira medida para avaliar a oxidação dos óleos é o valor total de oxidação do óleo (ToTox). Esse parâmetro foi concebido como uma maneira de avaliar a oxidação de maneira mais completa, incluindo medidas de oxidação primária e secundária (ALBERT *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2016). Revelando o estado atual do produto (valor de peróxidos) e seu histórico (valor de para-anisidina), assim, as diferenças no valor de ToTox são mais importantes do que os valores individuais (YILDIRIM; ÇANTAŞ, 2020). O ToTox é amplamente utilizado para expressar a qualidade oxidativa dos óleos com AGPI n-3 (ALBERT *et al.*, 2013; ISMAIL *et al.*, 2016).

1.4 CARACTERÍSTICAS DOS ÓLEOS DE PEIXES

Em geral, a indústria de óleos de peixes está cada vez mais atenta à qualidade, empreendendo esforços para assegurar a pureza e a estabilidade de seus produtos. A qualidade dos óleos com EPA e DHA, utilizados em suplementos alimentares, bem como ingredientes farmacêuticos, é especificada em monografias farmacopéicas, e por regulamentos regionais, que normalmente avaliam o estado de oxidação, o teor de ácidos graxos e os contaminantes ambientais, bem como os métodos empregados para medir essas determinações.

Em 2017, foi publicado o padrão de qualidade para óleo de peixe pelo *Codex Alimentarius*, e revisado em 2021. Alguns requisitos estabelecidos por esse padrão de qualidade, Stan CXS 329-2017 (2021), podem ser observados na Tabela 3. (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

Tabela 3 - Limites estabelecidos pelo *Codex Alimentarius Stan CXS 329-2017 (2021)*

Parâmetros	Limites
Acidez	≤ 3 mg KOH/g
Índice de peróxido (PV)	≤ 5 mEq O ₂ /kg
Índice de anisidina (pAV)	≤ 20
Valor total de oxidação (ToTox)	≤ 26

Fonte: *Codex Alimentarius (2021)*.

A GOED (Organização Global para EPA e DHA Ômega-3s) é uma associação de fabricantes de produtos com AGPI n-3. Os membros da GOED seguem os critérios de qualidade estabelecidos e produzem e comercializam óleos ricos em AGPI n-3, que cumpram limites de oxidação primária, oxidação secundária, ToTox, quantidades de EPA, DHA e limites de contaminantes. Esses requisitos são aplicáveis apenas aos produtos abrangidos pelo Goed Monografia, e os membros não são obrigados a seguir essas diretrizes (GANESAN; BROTHERSEN; MCMAHON, 2014).

Na Tabela 4, podem ser observados diversos estudos relacionados com a qualidade dos óleos de peixe comercializados em diferentes países.

Tabela 4 - Qualidade de óleos de peixes comercializados em diversos países

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Ackman; Ratnayake e Macpherson (1989)	EUA, Reino Unido e Canadá	17 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA - 5 amostras abaixo de 80% do declarado; DHA - 1 amostra abaixo de 80% do declarado
Badolato <i>et al.</i> (1991)	Brasil	19 – óleo de peixe (Brasil e Inglaterra)	EPA e DHA - rotulagem	EPA e DHA – 1 amostra de 80% do declarado
Fantoni; Cuccio e Barrera-Arellano (1996)	Brasil	12 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido	EPA e DHA - apenas 5 amostras com declaração; todas de acordo; PV - 7 de 16 amostras acima do limite
Shim <i>et al.</i> (2003)	EUA	26 - suplementos alimentares: 24 de óleo de peixe e 2 de algas	EPA e DHA - rotulagem	EPA - 14 amostras abaixo de 80% do declarado; 1 amostra acima de 120% do declarado; 5 amostras não declararam; DHA - 18 amostras abaixo de 80%; 3 amostras acima de 120% e 3 não declararam
Tatarczyk <i>et al.</i> (2007)	Áustria	9 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA + DHA - 2 amostras com valores maiores do que 130% do declarado

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Fierens e Corthout (2007)	Bélgica	19 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido p-anisidina	EPA e DHA - todas as amostras de acordo com o declarado; PV - 5 amostras acima do limite; pAV - 2 amostras acima do limite
Hamilton <i>et al.</i> (2010)	Austrália	15 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA - 4 amostras abaixo de 80% do declarado; DHA - 5 amostras acima de 120% do declarado
Kolanowski (2010)	Polônia	19 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido	EPA e DHA - todas de acordo com o declarado; PV - 2 amostras acima do limite
Opperman; Benade e Marais (2011)	África do Sul	45 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem Dienos conjugados - oxidação	EPA - 56% (n = 25) abaixo de 89% do valor declarado; 13% valores acima de 110% do declarado; DHA - 51% (n = 23) abaixo de 89% do valor declarado; 13% valores acima de 110% do declarado; Dienos conjugados - 73% (33) - valores maiores do que o limite;

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Halvorsen e Blomhoff (2011)	Noruega	29 - óleo de peixe	índice de peróxido	PV - 4 amostras acima do limite
Özyurt <i>et al.</i> (2013)	Turquia	5 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem índice peróxido p-anisidina ToTox	DHA e EPA: 1,92% e 4,06% (baixo); Valores de EPA e DHA inferiores do que os declarados nos rótulos; PV - abaixo do limite pAV - 5,4% a 8,9 - dentro dos limites; ToTox - dentro dos limites
Staňková <i>et al.</i> (2013)	República Checa	35 - óleo de peixe	EPA e DHA - perfil	EPA - maioria de 12% a 23%; 3 de 60% a 70%; 7 de 5% a 10%; 5 abaixo de 5%; DHA - maioria de 7% a 17%; 6 de 20% a 30%; 2 entre 50% e 60%; 5 abaixo de 5%
Ritter; Budge e Jovica (2013)	EUA	16 - óleo de peixe líquido	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido	EPA - 3 amostras abaixo de 80%; EPA e DHA - 7 amostras em desacordo com o valor declarado; PV - 5 amostras acima do limite

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Opperman e Benade (2013)	África do Sul	63 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido dienos conjugado	EPA - 48% abaixo de 90% do declarado; 10% acima de 110% do declarado; DHA - 31% abaixo de 90% do declarado; 35% acima de 110% do declarado; Dienos conjugados - 44% das amostras acima do limite; PV - 84% das amostras acima do limite
Rupp <i>et al.</i> (2013)	Países do Norte Europeu (Islândia, Irlanda, Noruega e Reino Unido), Países da Europa Central (Bélgica, República Checa e Alemanha), Países do Sul Europeu (Croácia, Grécia e Romênia) e países da região Asiática-Pacífico (Austrália, Índia e EUA)	63 - óleo de peixe	índice de peróxido alcenos (espectrofometria)	PV - países do norte europeu - 21 de 22 amostras acima do limite; países centrais da Europa - 14 de 17 amostras acima do limite; países do sul europeu - 11 de 11 amostras acima do limite; países da região Asiática-Pacífico - 11 de 13 amostras acima do limite Alcenos (200 mmol/mL todas as amostras acima do limite

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Yi <i>et al.</i> (2014)	Hong Kong	10 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA - 4 abaixo do valor declarado e 3 acima; DHA - 1 abaixo e 5 acima
Srigley e Rader (2014)	EUA	46 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA + DHA: 2 amostras com valor superior a 120% do declarado; 7 amostras com valores inferiores a 80% do declarado
Albert <i>et al.</i> (2015)	Nova Zelândia	36 - óleo de peixe	EPA e DHA (rotulagem) índice de peróxido p-anisidina ToTox	EPA e DHA: 3 das 32 - iguais ou superiores ao rótulo; 2 - 1/3 do valor declarado; PV - 86% superior; pAV - 25% acima; ToTox - 50% acima, 3 de 36 - estão de acordo
Jackowski <i>et al.</i> (2015)	Canadá	171 - óleo de peixe	índice de peróxido p-anisidina ToTox	PV - 17% das amostras acima do limite; pAV - 41% das amostras acima do limite; ToTox - 39% das amostras acima do limite; 50% das amostras com pelo menos um valor de oxidação acima do permitido

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Kleiner; Cladis e Santerre (2015)	EUA	47 - suplementos alimentares; 2- óleos de fígado de bacalhau; 4 - óleos de alga; 10 - óleos de krill; 31 - óleos de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA - 10 com quantidades menores que 100%; 6 com menos de 80% do declarado; DHA - 12 quantidades menores do que 100%, 8 com menos de 80% do declarado; 74% com quantidades menores do que as declaradas nos rótulos; 16% com quantidades menores do que 80% do declarado
Ismail <i>et al.</i> (2016)	Diversos países	Estudo Goed	índice de peróxido p-anisidina	2.187 PV - 82 (3,7%) acima do limite; 2.111 pAV - 44 (2,1%) acima do limite
Nichols; Dogan e Sinclair (2016)	Austrália e Nova Zelândia	10 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido p-anisidina	EPA e DHA - todas acima de 100% do declarado; 7 acima de 120% PV - todas dentro do limite pAV - 2 acima de 30 e 5 acima de 20

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Lee <i>et al.</i> (2016)	Coreia do Sul	24 - óleo de peixe	EPA e DHA - perfil acidez índice de peróxido	EPA - 5,1g a 59,2g/100g - todas as amostras muito abaixo do valor declarado; DHA - 10,9g a 73,9g/100g - todas as amostras muito abaixo do valor declarado; acidez - todas as amostras de acordo com o limite; PV - 15 amostras acima do limite
Osadnik e Jaworska (2016)	Polônia	19 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	todas as amostras de acordo com o declarado;
Bannenberg <i>et al.</i> (2017)	Nova Zelândia	47 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido p-anisidina ToTox	EPA e DHA - 4 amostras abaixo de 90% do declarado; todas dentro da variação de 20%; PV - 13 amostras acima do limite; pAV - 18 amostras acima do limite; ToTox - 22 amostras acima do limite
Galuch <i>et al.</i> (2018)	Brasil	15 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA + DHA: 3 amostras abaixo do valor declarado; 2 valores muito baixos

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Neia <i>et al.</i> (2019)	Brasil	5 - suplementos oral/enteral com óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	2 amostras EPA + DHA abaixo do valor declarado
Gouvêa <i>et al.</i> (2019)	Brasil - Brasília	27 - óleo de peixe	27 - EPA e DHA - rotulagem 10 - índice de peróxido, p-anisidina ToTox	DHA - 5 amostras acima de 120%; EPA - 3 amostras abaixo de 80%; PV - 2 de 10 acima do limite; pAV - todas de acordo com o limite; ToTox - 2 de 10 acima do limite
Heller <i>et al.</i> (2019)	Austrália	26 - óleo de peixe	índice de peróxido p-anisidina ToTox	PV - 38% acima do limite; pAV - 25% acima do limite; ToTox - 33% acima do limite
Jairoun; Shahwan; Zyoud (2020)	Emirados Árabes Unidos	44 - óleo de peixe	índice de peróxido p-anisidina ToTox	PV - 40,9% acima do limite; pAV - 6,8% acima do limite; ToTox - 27,3% acima do limite

(continua)

Tabela 4 (continuação)

Referências	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Damerou <i>et al.</i> (2020)	Finlândia	45 - 40 óleos e peixe e 5 óleos de krill	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido p-anisidina ToTox	EPA e DHA - 3 amostras abaixo de 80% do declarado; 1 amostra muito abaixo; PV - 11 amostras acima do limite; pAV - 1 amostra acima do limite; ToTox - 4 amostras acima do limite
Brotas; Carvalho e Pereira (2020)	Brasil - Bahia	13 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	1 amostra abaixo de 59% do declarado
Torshin <i>et al.</i> (2020)	Rússia	10 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	4 amostras abaixo de 80% do declarado
Rucklidge e Shaw (2020)	Nova Zelândia	10 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	Todas as amostras de acordo
Karsli (2021)	Turquia	15 - suplementos - 6 em cápsulas e 9 em xarope	EPA e DHA - rotulagem	EPA - de 81,69% a 113,94% do valor declarado; DHA - de 72,20% a 136,46% do valor declarado

(continua)

Tabela 4 (conclusão)

Referência	País	Quantidades de amostras - tipo	Análises realizadas	Resultados observados
Martinez e McDonald (2021)	Austrália	4 - óleo de peixe (recomendado para pets)	EPA e DHA - rotulagem	3 amostras abaixo de 80% do valor declarado
Navigato; Masci e Caproni (2021)	Itália	3 - óleo de peixe	EPA e DHA - rotulagem	EPA - 1 amostra abaixo de 80% do declarado; DHA - 1 amostra acima de 120%
Ozyurt <i>et al.</i> (2022)	Turquia	20 - 10 em cápsulas e 10 em xarope	EPA e DHA - rotulagem índice de peróxido acidez	EPA e DHA - 2 amostras com valores abaixo de 80%; PV - 3 amostras acima do limite; Acidez - 4 amostras acima do limite

Fonte: Autora. EPA: ácido eicosapentaenóico (20:5 n-3); DHA: ácido docosaheptaenóico (22:6 n-3); PV: índice de peróxido; pAV: p-anisidina.

Foram avaliados 38 estudos de mais de 20 países, no período de 1989 a 2022. A maioria dos estudos (36), comparou os valores declarados de EPA e DHA ou a soma deles no rótulo com os resultados obtidos na análise, sendo que em 32 estudos continham pelo menos um suplemento alimentar de óleo de peixe em desacordo com os limites estabelecidos pela legislação.

Em 18 estudos, foi avaliado o estado de oxidação primária pela análise do índice de peróxido. Em 16, havia amostras com valores superiores ao limite de 5 mEq/kg O₂. O estado de oxidação secundária foi examinado em 14 estudos, com análises de para-anisidina, alcenos (espectrofotométrico) e dienos conjugados; desses, apenas dois estavam de acordo com os limites estabelecidos para cada caso. A medida do valor total de oxidação (ToTox) foi determinado em sete estudos e em seis os valores estavam acima do limite de 26.

A discrepância entre o conteúdo real de AGPI n-3 e o informado na embalagem foram observados em diversos locais; em contrapartida, alguns autores observaram concentrações, para esses AGs, bem próximas da declarada no rótulo. Essas controvérsias nos estudos podem ser devidas à não uniformização de metodologias (não se tem conhecimento das metodologias utilizadas pelas indústrias para a informação dos valores nos rótulos); os valores de AGPI n-3 podem sofrer alteração devido à oxidação durante o transporte, o encapsulamento, a embalagem e o armazenamento, assim, o valor no rótulo não reflete a realidade. À medida que o óleo se oxida, as concentrações de EPA e DHA diminuem, sugerindo uma eficácia reduzida (ALBERT *et al.*, 2015).

A maioria dos estudos sobre a composição dos óleos de peixe e oxidação foram realizados anteriormente à publicação do padrão de qualidade e identidade do *Codex Alimentarius STAN 329-2017* (CODEX ALIMENTARIUS, 2021), por esse motivo, os trabalhos citados não tinham um padrão de recomendações de valores para as análises realizadas, ou seja, utilizaram as recomendações de diferentes organismos. Nesse documento do *Codex Alimentarius*, encontram-se valores para peróxido, anisidina, valor total de oxidação (ToTox), perfil de ácidos graxos, entre outros (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

1.5 RELAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA 3 COM A SAÚDE

Os AGPIs são considerados essenciais para o crescimento normal e a vida saudável; sua inclusão em alimentos consumidos em vários estágios da vida permite um fornecimento constante desses AGs desde a infância até a idade adulta. Uma vez que, esses AGPIs, desempenham um papel potencialmente significativo na modulação dos processos de desenvolvimento do ser humano; em curto e longo prazos, os resultados para a saúde estão relacionados ao crescimento e à composição corporal; às respostas imunes e alérgicas; além da prevalência de doenças crônicas relacionadas com a nutrição (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017). Na Figura 3 é possível observar alguns benefícios dos AGPI n-3 no organismo. Os mais significativos, e com mais estudos, serão discutidos a seguir.

Figura 3 - Benefícios dos ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 na saúde



Fonte: Adaptado de Pateiro *et al.* (2021).

EPA e DHA são também reconhecidos como precursores para a síntese de novos mediadores pró-resolução especializados (SPMs). Os SPMs incluem resolvinas, protectinas e maresinas. As resolvinas são sintetizadas tanto de EPA

(série E) como de DHA (série D), enquanto as maresinas e protectinas são sintetizadas de DHA (Fig. 1). Como o seu nome indica, as SPMs ativam a resolução da inflamação. Assim, a falta dos AGPIs n-3, especialmente EPA e DHA, pode não favorecer a resolução da inflamação e promover a patogênese de várias doenças nas quais o processo inflamatório está envolvido (CALDER, 2018; DJURICIC; CALDER, 2021).

Como resultado das suas várias ações anti-inflamatórias e de resolução de inflamações, o aumento da ingestão de EPA e DHA tem sido estudado em pacientes com artrite reumatóide, e doses elevadas desses AGPIs n-3 induziram a benefícios clínicos. Os efeitos anti-inflamatórios de EPA e DHA também são estudados em doenças caracterizadas por inflamações de baixo grau, tais como as doenças metabólicas, declínio cognitivo, e sarcopenia.

Contudo, os possíveis benefícios dos AGPIs n-3 nessas doenças envolvem também efeitos em vários processos, para além da inflamação. Por exemplo, EPA e DHA modificam benéficamente os lipídios do sangue e a agregação plaquetária, contribuindo para um menor risco de DCV. Os efeitos sobre os lipídios no sangue relacionam-se com a regulação das vias de síntese e degradação lipídica; em parte por meio da ação dos fatores de transcrição e expressão genética, especialmente no fígado, enquanto os efeitos sobre a agregação plaquetária relacionam-se com a modificação dos perfis dos eicosanóides.

Além disso, os AGPIs n-3 desempenham importante papel como antioxidante e regulam as vias de sinalização. As membranas mitocondriais têm elevado conteúdo de DHA, e a investigação sugere que o DHA é crucial para a síntese de trifosfato de adenosina por fosforilação oxidativa. Oppedisano e colaboradores (2020) verificaram que o DHA reduziu o estresse oxidativo mitocondrial e a atividade da enzima citocromo C oxidase, ao mesmo tempo em que aumentou a atividade da superóxido dismutase dependente do manganês (OPPEDISANO *et al.*, 2020; CALDER, 2018; DJURICIC; CALDER, 2021).

1.5.1 Doenças Cardiovasculares

Em trabalho pioneiro, Bang, Dyerberg e Nielsen (1971) iniciaram o despertar dos benefícios dos AGPI n-3. Os autores compararam os níveis das lipoproteínas e triacilglicerídeos da população da Alemanha com 130 esquimós

que viviam na Groenlândia, local em que a incidência de doença coronariana era muito baixa (3 casos/1963-1967).

A alimentação do povo esquimó (caçadores/pescadores) era baseada em carne de baleias, focas, aves marinhas, e peixes - predominantemente alabote da Groenlândia, capelim, e algum tipo de salmão. Esses alimentos são ricos em proteínas (280g) e gordura (135g), e pobre em carboidratos. Contrariando a recomendação de alimentação, na época, para evitar as doenças cardiovasculares (DCV).

A explicação dos autores para o nível bastante baixo do plasma de colesterol, apesar do elevado consumo de gordura animal, é provavelmente a grande quantidade de gordura poli-insaturada consumida na alimentação (carne de baleias, focas, aves marinhas, e peixes) (BANG; DYERBERG; NIELSEN, 1971).

Para confirmar as suas suspeitas, Bang, Dyerberg e Sinclair, em 1976, analisaram os alimentos consumidos pelos esquimós (um grupo de 50 pessoas, coletou e caçou os alimentos por 3 a 7 dias - 178 amostras) e compararam com a dieta europeia.

As diferenças encontradas entre as dietas foram na quantidade de proteínas, pois os esquimós consumiam mais do que o dobro dos alemães; a quantidade de gordura era similar, entre os grupos; e os alemães consumiram 9g a mais de carboidratos do que os esquimós. O perfil dos AGs determinados na dieta foi muito desigual, e podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Comparação dos ácidos graxos encontrados nas dietas alemã e dos esquimós da Groenlândia, em 1976, em estudo de Bang, Dyerber e Sinclair (1980)

Componente (%)	Dieta esquimó	Dieta alemã
12:0	1,1	5,9
14:0	3,7	7,5
16:0	13,6	25,5
16:1	9,8	3,8
18:0	4,0	9,5
18:1	24,6	29,2
18:2	5,0	10,0
18:3	0,6	2,0
20:0	0,1	4,3
20:1	14,7	0,4
20:4	0,4	0
20:5	4,6	0,5
22:1	8,0	1,2
22:5	2,6	0
22:6	5,9	0,3
Saturados	22,8	52,7
Monoinsaturados	57,3	34,6
Poli-insaturados	19,2	12,7
AGPI n-6	5,4	10,0
AGPI n-3	13,7	12,7

AGPI n-6: ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 6; AGPI n-3: ácidos graxos poli-insaturados da série ômega 3. Fonte: Adaptado de Bang, Dyerberg e Sinclair (1980).

As maiores diferenças foram observadas para os AGMs 16:1, 20:1 e 22:1, e os AGPs 18:2, 18:3, 20:5, 22:5 e 22:6; os esquimós consumiram em

quantidade maior do que os alemães, demonstrando que na dieta dos esquimós predomina o AGPI n-3, advindo dos animais marinhos (BANG; DYERBERG; SINCLAIR, 1980).

Em 1979, Dyerberg e Bang publicaram um novo estudo, em que verificaram a quantidade de AGs no sangue desses mesmos grupos já estudados. Os estudiosos observaram que os AGPI n-3 constavam em maior quantidade no sangue do que os AGPI n-6, nos esquimós (n-3/n-6 de 1,38); enquanto os AGPI n-6 (n-3/n-6 de 0,10) eram predominantes na população alemã; essa relação de n-3/n-6 também foi verificada em estudos de Simopoulos (2010), e pode ser observada na Figura 2 (DYERBERG; BANG, 1979; SIMOPOULOS, 2010).

A influência dos AGPI n-3 na homeostase e, conseqüentemente, na trombose, como previsto em estudos *in vitro*, da época, confirmou os resultados obtidos na população esquimó (DYERBERG; BANG, 1979). Portanto, os achados nos trabalhos de Bang e colaboradores demonstraram que a dieta rica em AGPI n-3 foi, possivelmente, capaz de diminuir a incidência de infarto nos esquimós, devido à baixa incidência de DCV, explicado pela ação estudada *in vitro* desses ácidos graxos, como diminuir a agregação plaquetária, os níveis de colesterol, as lipoproteínas de baixa densidade, os triglicerídeos, e aumentar os níveis das lipoproteínas de alta densidade (DYERBERG; BANG, 1979).

Outras observações importantes no grupo da população dos esquimós e que podem ter relação com a baixa incidência de DCV, indicaram que os esquimós são raramente obesos; que a hipertensão é incomum; e a diabetes mellitus é desconhecida. A dieta é o elemento imprescindível para garantir os fatores mencionados, e a sua composição pode ser uma possível maneira de evitar as DCV (DYERBERG; BANG, 1979; BANG; DYERBERG; SINCLAIR, 1980).

Após essa primeira correlação entre a dieta, rica em AGPIs, principalmente da série n-3, e a baixa incidência de DCVs, aliada à possibilidade de a composição da dieta prevenir essas doenças, muitas evidências já foram acumuladas, ao longo dos anos, relacionando maior ingestão de EPA e DHA, com um risco reduzido de DCV. Diversos estudos clínicos foram realizados para investigar a prevenção primária; entre eles, pode-se destacar o *Afford, Lipgene*,

Anchor, Margarín e, na prevenção secundária, os estudos *Gissi, Alpha ômega, Jelis, Maxepa, Nutrirstroke, Omacor, Ômega PCI, Origin*. (COCHRANE, 2020).

Muitos estudos demonstraram benefícios dos AGPI n-3 na prevenção das DVCs, entretanto, em outro, esse benefício não foi identificado. Recentemente, três publicações destacam-se nesse assunto: o estudo conhecido como REDUCE-IT (BHATT *et al.*, 2020); pesquisas de Innes e Calder (2020); e a revisão da Cochrane (2020); Abdelhamid *et al.* (2020). Esse efeito cardioprotector do EPA e DHA é plausível, pois esses AGs modulam os fatores de risco para a DCV, tais como lipídios sanguíneos, tensão arterial, variabilidade da frequência cardíaca e do ritmo cardíaco, agregação plaquetária, função endotelial e inflamação (INNES; CALDER, 2020; CALDER, 2018; KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017)

No estudo Reduce-IT (BHATT *et al.*, 2020), utilizou-se a dosagem de 4g de EPA, em forma de ésteres etílicos, realizado com 3.146 pacientes, utilizando como suplemento o EPA, os autores observaram que houve uma redução de 31% do risco relativo e 6,5% do risco absoluto para o primeiro evento cardiovascular; também foi observada a diminuição no risco de infarto do miocárdio (IM) e acidente vascular cerebral não fatal, revelando, assim, que a suplementação traz benefícios relacionados às DCVs (BHATT *et al.*, 2020)

Em estudo de revisão, Innes e Calder (2020) observaram que há evidências em estudos de coorte prospectivos em longo prazo que demonstram consistentemente uma associação entre maior ingestão de peixe, peixes gordurosos e AGPI n-3 (EPA e DHA), ou maiores níveis de EPA e DHA no organismo e menor risco de desenvolvimento de DCV, especialmente de DCV, com um IM e mortalidade cardiovascular na população em geral. Apesar disso, as evidências para a prevenção primária da DCV são relativamente fracas. Em doentes de alto risco, especialmente no cenário de prevenção secundária (por exemplo, pós-IM), uma série de abrangentes estudos apoiam a suplementação de EPA + DHA (ou apenas EPA) (INNES; CALDER, 2020).

Na revisão Cochrane (ABDELHAMID *et al.*, 2020) foram incluídos 86 estudos (162.796 participantes), portanto, a maior revisão sistemática sobre os efeitos dos AGPIs na saúde cardiovascular até essa data. As evidências observadas demonstram que o aumento da ingestão de AGPI n-3 reduz ligeiramente o risco de mortalidade coronariana e eventos coronarianos, e reduz

os níveis séricos de triglicerídeos (evidência proveniente, principalmente, de ensaios clínicos com suplementos) (ABDELHAMID *et al.*, 2020).

A controvérsia observada em diversos estudos relacionando a maior ingestão de AGPIs e a incidência de DCV, bem como a sua prevenção, pode ser explicada por diversos fatores, entre eles, a dose de EPA + DHA, ou apenas EPA e/ou DHA; a duração da suplementação; o início da suplementação após um evento cardiovascular; a ingestão base de AGs nos indivíduos; a biodisponibilidade do EPA e DHA; diferenças fisiológicas dos indivíduos, ou seja, todos esses fatores comprovam o desafio de realizar estudos clínicos com AGPIs em seres humanos (INNES; CALDER, 2020; ABDELHAMID *et al.*, 2020).

Há também outros fatores a considerar ao avaliar e interpretar a literatura neste campo. O primeiro é que o *status* (quantidade) de AGPI n-3 no organismo é variável em cada indivíduo, de tal forma que qualquer ensaio controlado por placebo de EPA e DHA é conduzido com uma certa quantidade base desses AGs em todos os participantes, embora essa ingestão possa ser muito baixa. No entanto, a ingestão de EPA e DHA pode ser altamente variável tanto dentro dos indivíduos quanto entre eles, com mudanças significativas ocorrendo simplesmente pela ingestão de uma única refeição de peixe gordo. A biodisponibilidade de EPA e de DHA pode variar (a) entre indivíduos devido a diferenças fisiológicas, (b) de acordo com a ingestão de refeições em relação aos suplementos e (c) talvez de acordo com a hora do dia, influenciando assim a quantidade desses bioativos disponíveis para exercer seus efeitos. Em conjunto, estes fatores destacam os desafios de realizar testes robustos em humanos com suplementos de AGPI n-3 e é provável que eles contribuam para os resultados variáveis de tais testes, especialmente quando são utilizadas baixas doses de EPA e DHA (INNES; CALDER, 2020).

1.5.1.1 *Ômega-3 Index*

Em 2004, Harris e Von Schacky propuseram um biomarcador que refletisse a quantidade de EPA e DHA nos glóbulos vermelhos do sangue (hemácias). Esse valor é expresso em porcentagem de AG total e pode ser considerado um novo fator de risco de morte por DCV e, especialmente, morte cardíaca súbita, e o denominaram de “*ômega-3 index*” (O3I). Verificaram que um

valor >8% é razoável para diminuir o risco de DCV (HARRIS; VON SCHACKY, 2004).

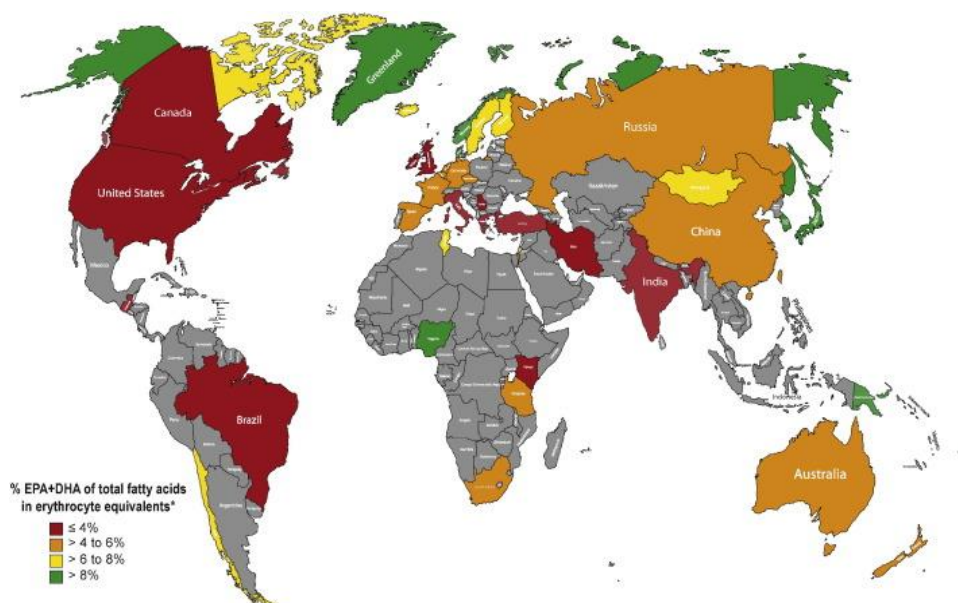
Harris; Dek Gobbo e Tintle (2017), para confirmar as faixas de risco propostos para o O3I, ou seja, <4% (risco mais elevado) e 8%-12% (risco mais baixo), aplicaram o O3I em uma meta-análise com 19 estudos e confirmaram os valores propostos (HARRIS; DEL GOBBO; TINTLE, 2017).

Após ser utilizado por diversos pesquisadores, o ômega-3 index (O3I), demonstrou ser um biomarcador estável da ingestão alimentar e um substituto válido da concentração de AGPI n-3 nos tecidos. O O3I foi proposto pela primeira vez como potencial fator de risco de morte por doença coronária, em 2004, e os subsequentes estudos transversais e prospectivos apoiaram a sua utilidade clínica para esse fim.

A análise desses estudos mostra que um O3I igual ou superior a 8% é protetor contra as DCVs fatais. O O3I está também inversamente correlacionado com as principais perturbações depressivas e biomarcadores inflamatórios (WALKER *et al.*, 2019). Em estudo de Walker *et al.* (2019), relacionando à quantidade de AGPI n-3 suplementar e o valor do O3I, foi observado que, para que 95% dos indivíduos atinjam um O3I desejável, a partir de 4%, cerca de 2.000g/d EPA + DHA seriam provavelmente necessários.

Na Figura 4, pode-se verificar o ômega-3 index previsto para a população de diversos países, adaptado de Stark *et al.* (2016).

Figura 4 - Quantidade de EPA e DHA (ômega 3 index) na população de diversos países



Fonte: Stark *et al.* (2016).

1.5.2 Saúde cognitiva

1.5.2.1 Desenvolvimento infantil

Os AGPI n-3 são essenciais para o sistema nervoso central (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017). Mais de 50% do peso seco do cérebro é lipídio, em particular, fosfolípidios. O cérebro humano e a retina contêm uma quantidade elevada de DHA, comparada a outros tecidos, e pouco EPA. A fosfatidilanolamina e a fosfatidilserina, ambas encontradas na matéria cinzenta, contêm 24% e 37%, respectivamente, dos seus AGs como DHA (CALDER, 2018; DJURICIC; CALDER, 2021).

O DHA está presente, com concentração de 50%-70% dos AGs nos segmentos externos da retina, que contêm os fotorreceptores do olho; desse modo, o DHA é essencial para um bom desenvolvimento visual. O DHA é importante para a neurotransmissão, estabilidade da membrana neuronal, neuroplasticidade e transdução de sinal.

Um aporte adequado AGPI n-3, especialmente DHA, é essencial para o funcionamento e a manutenção dos sistemas visual e nervoso, mas também para o desenvolvimento pré-natal e pós-natal precoce do cérebro e da visão

(CALDER, 2018; DJURICIC; CALDER, 2021). Evidências demonstram que a suplementação com AGPI n-3 durante a gravidez está associada ao desenvolvimento cognitivo e visual e à função cerebral no bebê (DJURICIC; CALDER, 2021).

O desenvolvimento neurológico começa na concepção, e pode-se comparar com a montagem de um andaime, ou seja, cada etapa precisa sustentar a estrutura para os próximos componentes, esse processo é caracterizado pela rápida evolução dos circuitos neurológicos cada vez mais complexos.

Assim, o crescimento e desenvolvimento, nos primeiros mil dias, exige que todos os componentes obrigatórios, incluindo os fornecidos pela dieta, estejam disponíveis em quantidades suficientes durante os períodos críticos. Entre os nutrientes mais importantes, durante esse período precoce de desenvolvimento rápido, estão os AGPI n-3, que são essenciais para a mielinização e o desenvolvimento da visão, durante o período perinatal (NEVINS *et al.*, 2021).

Sugere-se que uma insuficiência desses AGs nas membranas pode levar a uma incapacidade específica de crescimento do cérebro e provocar danos irreparáveis. O acúmulo desses ácidos graxos no sistema nervoso central ocorre durante o desenvolvimento fetal (3º trimestre da gestação), principalmente através da transferência placentária de origem materna e, tanto na infância como na primeira infância, principalmente através de fontes alimentares. Evidências indicam que funções da retina e capacidade de aprendizagem podem ser prejudicadas se houver uma redução no acúmulo de DHA durante a vida intrauterina (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017).

Firouzabadi; Shab-Bidar e Jayed (2022) verificaram que o consumo de AGPI n-3, durante a gravidez, é vital, uma vez que esses AGs são importantes constituintes para a formação do cérebro fetal e da retina, e aumentam a imunidade dos recém-nascidos. Além disso, os AGPIs n-3 desempenham importante papel na duração da gravidez; nas medições antropométricas neonatais; e na prevenção da depressão pós-parto (FIROUZABADI; SHAB-BIDAR; JAYEDI, 2022).

Após o nascimento, o aporte de DHA para o bebê é realizado pela amamentação; o leite humano contém quantidades semelhantes de gordura ao

leite bovino e seus fosfolipídios possuem quantidades totais semelhantes de AGPIs, mas quase 7 vezes maiores de DHA (CALDER, 2018).

1.5.2.2 Doenças comportamentais e degenerativas

Muito além da infância, os AGPIs parecem ter papéis fundamentais no cérebro em todo o curso de vida. Há mais de 35 anos, Rudin sugeriu que os distúrbios mentais podem resultar de uma deficiência em AGPI n-3 e responder à provisão desses AGs. Os dados de nove países demonstraram uma correlação significativa entre o alto consumo anual de peixes e menor prevalência de depressão, uma observação compatível com um efeito protetor proposto desses AGs.

Existem algumas evidências epidemiológicas para um menor risco de transtornos psiquiátricos, psicológicos e distúrbios neurodegenerativos, com aumento da ingestão dietética de AGPI n-3 (CALDER, 2018; KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; KUS-YAMASHITA *et al.*, 2016)

Vários estudos relatam níveis mais baixos de EPA e DHA na corrente sanguínea de crianças com Transtorno do Déficit de Atenção com Hiperatividade (TDHA), ou distúrbios do espectro autista, do que em crianças do grupo controle, e foi observado que a normalização dos níveis desses AGs resultaria em benefício clínico, nessas condições. (NEVINS *et al.*, 2021; DJURICIC; CALDER, 2021).

Agostoni *et al.* (2017) relataram um pequeno benefício da suplementação AGPI n-3 em crianças com distúrbios do espectro autista, e esses dados corroboram com outros estudos, concluindo que a suplementação de AGPI n-3 pode ser recomendada como uma alternativa complementar para apoiar terapias comportamentais.

O efeito da suplementação com AGPI n-3 em indivíduos com TDAH, tem sido amplamente estudado, entretanto, a grande heterogeneidade metodológica entre estudos, incluindo variações no tamanho da amostra, duração do estudo, tipo e dosagem da suplementação, torna difícil comparar os resultados e tirar conclusões robustas sobre a eficácia dos AGPIs n-3.

Agostini *et al.* (2017) relataram que, em 13 dos 25 estudos avaliados, foi observado algum efeito benéfico de AGPI n-3 nos sintomas de TDHA, enquanto

nos outros 12 os resultados foram negativos. Estudos futuros da suplementação de AGPI n-3 envolvendo tanto pessoas com TDHA, como doenças do espectro autista, são necessários para clarear a eficácia da suplementação de AGPI n-3 em crianças e adolescentes com esses distúrbios (AGOSTONI *et al.*, 2017; DJURICIC; CALDER, 2021).

Vários estudos sugerem que a depressão pode partilhar características patofisiológicas comuns com as doenças cardiovasculares e os seus fatores de risco, como o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, disfunção endotelial, e elevações nos níveis de homocisteína plasmática (GROSSO *et al.*, 2014).

Dados de nove países demonstraram uma correlação inversa significativa entre o consumo anual de peixe e a prevalência de depressão grave. Muitos estudos observacionais investigaram a relação entre a ingestão de peixe e AGPI n-3 e a depressão (DJURICIC; CALDER, 2021). Liao *et al.* (2019) observaram, em um estudo de revisão sistemática de 26 estudos, que incluiu 2.160 participantes, um benefício global de EPA + DHA nos sintomas da depressão, e que a formulação contendo apenas EPA, ou com mais de 60% desse composto, foi mais eficaz (LIAO *et al.*, 2019).

Bae e Kim (2018) não identificaram qualquer efeito significativo de EPA + DHA nos sintomas depressivos em pessoas idosas (>65 anos de idade) que "estavam bem", enquanto que havia "um grande efeito" de EPA + DHA em pessoas idosas com depressão e concluíram que "os AGPI n-3 são eficazes no tratamento de doentes idosos deprimidos" (BAE e KIM, 2018).

A Sociedade Internacional de Investigação em Psiquiatria Nutricional (*International Society for Nutritional Psychiatry Research*) recomenda a suplementação de AGPI n-3 para a prevenção da depressão em populações de alto risco e para o tratamento da depressão em mulheres grávidas, crianças, e idosos, sugere-se a ingestão de EPA puro ou uma combinação de EPA + DHA com uma razão de pelo menos 2:1 (EPA:DHA), e a dose de EPA de 1g a 2g/dia (DJURICIC; CALDER, 2021).

Os doentes com esquizofrenia têm níveis mais baixos de EPA e DHA nos seus eritrócitos, do que os do grupo controle. O primeiro ensaio de AGPI n-3 na esquizofrenia identificou uma melhoria clínica com EPA (2g/dia), mas não com DHA; os demais ensaios também mostraram benefícios com EPA, mas nem

todos os estudos comprovaram esse benefício (DJURICIC; CALDER, 2021). Apesar dessas descobertas, a revisão da Cochrane (2006) concluiu que as AGPIs n-3 devem ser consideradas apenas como um tratamento experimental para a esquizofrenia (IRVING; MUMBY-CROFT; JOY, 2006)

Estudos *post-mortem* mostraram que os cérebros das pessoas com a doença de Alzheimer contêm menos DHA do que aqueles sem a doença e alguns estudos têm associado baixos níveis sanguíneos de AGPI n-3 com a demência. Foi identificada uma associação inversa entre a ingestão de DHA e o risco de demência e doença de Alzheimer através de uma meta-análise de estudos observacionais. Schaefer *et al.* (2006) observaram que valores maiores para a fosfatidilcolina DHA plasmática foram associados a um risco 47% mais baixo de desenvolver demência e um risco 39% mais baixo de doença de Alzheimer (SCHAEFER *et al.*, 2006; CALDER, 2018; DJURICIC e CALDER, 2021).

Wood; Chappell e Zulyniaok (2021) observaram, em 33 estudos, que os AGPIs n-3 dietéticos e suplementados têm efeito protetor. O efeito protetor dos AGPI n-3 sobre a função cognitiva e a redução do risco de doença de Alzheimer foram verificados nos estudos observacionais, sugerindo um efeito mais pronunciado em indivíduos com déficit cognitivo precoce e pequeno. (WOOD; CHAPPELL; ZULYNIK, 2021). Enquanto na Revisão Cochrane (2012) sobre a suplementação de AGPI n-3 na prevenção do declínio cognitivo em pessoas idosas saudáveis, não foram observados quaisquer benefícios (SYDENHAM; DANGOUR, 2012).

Portanto, estudos observacionais sobre a suplementação com AGPI n-3 e sua influência na demência e doença de Alzheimer são contraditórios, entretanto, na sua maioria, sugerem que o indivíduo com ligeiro declínio cognitivo tem melhora mais significativa e poderia ser suplementado com AGPI n-3.

Contudo, poderia ser ainda mais benéfico iniciar a suplementação com AGPI n-3 antes de ocorrer qualquer declínio cognitivo. Nesse contexto, foi demonstrado que a suplementação com AGPI n-3 em idosos saudáveis têm um efeito benéfico na integridade microestrutural da matéria branca, no volume de matéria cinzenta em áreas cerebrais específicas; e parâmetros vasculares acompanhados por uma melhoria da função executiva. Isso indica um potencial

na suplementação de AGPI n-3 como prevenção para manter a saúde cognitiva das pessoas idosas (CALDER, 2018; DJURICIC; CALDER, 2021).

1.5.3 Outros benefícios

1.5.3.1 Câncer

EPA e a DHA têm uma série de atividades biológicas que podem influenciar a viabilidade e proliferação de células tumorais. Por exemplo, o DHA pode promover a apoptose da célula cancerígena. A substituição do ARA, nas membranas celulares por EPA e DHA também é um mecanismo importante de ação anti-cancerígena dos AGPI n-3, uma vez que os eicosanóides derivados de ARA, como o PG E2 e o leucotrieno B4, promovem a proliferação celular, sobrevivência, migração e invasão do tumor. Com esses efeitos, a EPA e o DHA podem influenciar diretamente as células cancerígenas e o ambiente tumoral, e a resposta dos indivíduos com tumores (CALDER, 2018).

Revisões sistemáticas demonstram que os AGPIs n-3 são protetores contra os cânceres *colorectal* e de mama; um estudo de coorte prospectivo, entre mulheres na pós-menopausa, evidenciou que a maior ingestão de EPA ou DHA estava associada a um menor risco de desenvolvimento de câncer de mama (DJURICIC; CALDER, 2021; SCZANIECKA *et al.*, 2012). No caso de câncer de próstata, ainda há poucos estudos (DJURICIC; CALDER, 2021).

Além das características para reduzir o risco de desenvolver alguns tipos de cânceres, os AGPI n-3 também têm influência nos pacientes que já possuem a doença. Por exemplo, a qualidade de vida e o funcionamento físico podem ser melhorados nos doentes com câncer com a suplementação de AGPI n-3.

Em revisão sistemática, concluiu-se que os doentes com câncer de pulmão que receberam suplementos contendo EPA e DHA melhoraram o apetite, o nível de energia, o peso corporal e a qualidade de vida. Em pacientes com câncer de mama, com uma quantidade maior de AGPI n-3 sanguíneo, foi verificada menor inflamação e menos fadiga física do que a observada em doentes com concentração inferior de AGPI n-3 (ALFANO *et al.*, 2012; CALDER, 2018).

EPA e DHA sensibilizam as células tumorais que recebem os agentes quimioterápicos, aumentando a eficácia desses agentes. Murphy *et al.* (2011) conduziram um estudo em doentes com câncer de pulmão, e mostraram que a suplementação diária com EPA + DHA causou duplicação na taxa de resposta à quimioterapia utilizada e prolongou o período em que os pacientes poderiam receber a quimioterapia (MURPHY *et al.*, 2011). A caquexia do câncer (perda de tecido magro e adiposo) é uma complicação que ocorre em doentes com tumores e aumenta grandemente o risco de mortalidade.

Weed *et al.* (2011) relataram que pacientes com câncer de cabeça e pescoço, suplementados com AGPI n-3, tiveram aumentada a massa magra do corpo (WEED *et al.*, 2011). Murphy *et al.* (2011) mostraram que EPA + DHA suplementados diariamente foram capazes de manter o peso corporal e a massa muscular, durante a quimioterapia, em doentes com câncer de pulmão (MURPHY *et al.*, 2012; CALDER, 2018). Desse modo, há cada vez mais estudos em seres humanos demonstrando benefícios dos AGPI n-3, seja para a prevenção de alguns tipos de cânceres, ou na melhoria das condições de pacientes com a doença (CALDER, 2018).

1.5.3.2 Caquexia do câncer

A deterioração progressiva e irreversível do estado nutricional, ou seja, a cachexia, é uma complicação frequente do crescimento do tumor. Ao contrário da desnutrição induzida pela fome, a caquexia cancerígena não é revertida pelo suporte nutricional padrão, pois a caquexia resulta da combinação de anorexia, ingestão reduzida de alimentos e mudanças metabólicas profundas, que são responsáveis pelo início da resistência anabólica. A principal característica da caquexia cancerígena é a perda progressiva da massa muscular que leva à sarcopenia, o que por sua vez se traduz em consequências negativas clinicamente relevantes (LAVIANO *et al.*, 2013; ORSSO *et al.*, 2022)

As citocinas inflamatórias desempenham um papel significativo na patogênese da cachexia. Consequentemente, os efeitos anti-inflamatórios dos AGPI n-3 podem ser benéficos na prevenção e no tratamento da caquexia cancerígena. Ries *et al.* (2012) revisaram sistematicamente 38 artigos testando esta hipótese. Em geral, os trabalhos relataram um bom efeito dos AGPI n-3 em

pacientes com câncer avançado e caquexia. No entanto, ensaios controlados aleatórios, com mais pacientes, não apoiaram os resultados positivos, pois na maioria das vezes não se verificou um efeito significativo. Conclusões semelhantes foram relatadas por Van der Meij *et al.* (2011) que revisaram sistematicamente ensaios com AGPI n-3 em pacientes com câncer. Alguns benefícios foram encontrados para a suplementação oral de AGPI n-3 no peso corporal (mas não na massa corporal magra) e na qualidade de vida em pacientes com câncer durante a quimio-radioterapia e nos cuidados paliativos (LAVIANO *et al.*, 2013).

Os dados disponíveis são insuficientes para extrair qualquer recomendação robusta para o uso de AGPI n-3 na prevenção/tratamento da cachexia no câncer, uma vez que os estudos clínicos disponíveis são altamente heterogêneos. Além disso, o número de pacientes com câncer envolvidos nestes ensaios é geralmente limitado, tornando difícil generalizar os resultados obtidos para toda a população oncológica. Portanto, os muitos elementos confusos que ainda permeiam este campo de pesquisa podem contribuir para a falta de provas robustas. De fato, quando bem concebidos, pequenos ensaios clínicos parecem promissores. Van der Meij *et al.* (2011) estudaram recentemente 40 pacientes com câncer de pulmão, onde 20 pacientes receberam um suplemento nutricional oral enriquecido com EPA. Os resultados mostram que pacientes suplementados com EPA melhoraram a qualidade de vida quando comparados ao grupo de controle. Resultados similares foram obtidos por Murphy *et al.* (2011) que estudaram 40 pacientes com câncer de pulmão recebendo tratamento ativo. Os pacientes foram suplementados com óleo de peixe (2,5 g EPA + DHA/dia) durante a quimioterapia. Após aproximadamente 10 semanas, os pacientes do grupo de controle sofreram uma perda de peso média de 2,3 kg, enquanto os pacientes que receberam óleo de peixe mantiveram seu peso (LAVIANO *et al.*, 2013; ORSSO *et al.*, 2022).

1.5.3.3 Sarcopenia e fragilidade em idosos

Com o aumento da idade, alcançar uma ingestão adequada de energia e nutrientes essenciais torna-se um desafio devido a alterações no apetite (anorexia do envelhecimento) e na fisiologia gastrointestinal. Além disso, o envelhecimento pode afetar a dentição, a saúde da gengiva e da boca, e a

deglutição, reduzindo assim a ingestão de alimentos. O declínio cognitivo, a doença sistêmica e o uso de alguns medicamentos também podem afetar a ingestão de alimentos. A redução da mobilidade, o aumento do isolamento e as finanças limitadas podem restringir o acesso aos alimentos nas pessoas mais velhas. Como consequência destes fatores, desnutrição (isto é, subnutrição), fragilidade e sarcopenia são condições comuns e frequentemente sobrepostas em pessoas idosas. A desnutrição é definida pelo ESPEN como um estado resultante da falta de ingestão ou absorção de nutrição que leva a uma composição corporal alterada (diminuição da massa de gordura) e massa celular corporal que leva a uma diminuição da função física e mental e a um resultado clínico prejudicado pelas doenças. A inflamação é um importante contribuinte para o resultado da desnutrição. A fragilidade é um estado de vulnerabilidade com capacidade de reserva limitada nos principais sistemas orgânicos; envolve perda de peso, fadiga, baixa atividade física, lentidão e fraqueza. A fragilidade está associada a um maior risco de resultados adversos, como quedas, fraturas, hospitalização e incapacidade. Em pacientes internados mais velhos, a fragilidade foi considerada um fator de risco para o aumento do tempo de internação e mortalidade, bem como complicações pós-operatórias. A sarcopenia é caracterizada pela perda progressiva e generalizada da massa muscular esquelética, força e função com um consequente aumento do risco de resultados adversos. A sarcopenia parece aumentar a probabilidade de resultados adversos tais como incapacidade, má qualidade de vida e morte. Tanto a massa muscular quanto a força foram preditivas para as dificuldades em realizar atividades da vida diária após a alta do hospital. A sarcopenia e particularmente a obesidade sarcopênica (ou seja, baixa massa muscular em associação com maior massa gorda), foram ligadas a um pior prognóstico, incluindo a sobrevivência, para uma gama de cânceres (TROESCH *et al.*, 2020; EGGERSDORFER *et al.*, 2022).

As citocinas pró-inflamatórias têm sido ligadas a perda muscular e, conseqüentemente, os efeitos anti-inflamatórios dos AGPI n-3 podem ser benéficos para evitar a perda de massa muscular, sarcopenia e fragilidade. Além disso, os AGPI n-3 podem modular a síntese proteica muscular, promovendo a força muscular e a melhora da função muscular, provavelmente como resultado de sua incorporação aos fosfolípidos de membrana do sarcolema e organelas

intracelulares. A manutenção ou um aumento da massa muscular e da função parecem ser a chave para um envelhecimento saudável. A suplementação de AGPI n-3 a longo prazo, em pessoas idosas é, portanto, de interesse crescente à medida que a comunidade médica procura formas seguras e acessíveis de diminuir a incapacidade física e melhorar a qualidade de vida em indivíduos idosos. Resultados de estudos observacionais transversais e longitudinais demonstram que baixos níveis de DHA plasmático e EPA estão associados a um desempenho físico inferior em adultos mais velhos (TROESCH *et al.*, 2020; EGGERSDORFER *et al.*, 2022).

A escassez de dados de estudos intervencionistas tem impedido o desenvolvimento de recomendações sobre o uso de AGPI n-3 na prevenção da sarcopenia até o momento. São necessários ensaios controlados mais robustos, com duração e doses diferentes, para estabelecer seu efeito na manutenção da massa muscular em idosos e para diminuir o risco de sarcopenia e os efeitos adversos relacionados à saúde e ao bem-estar, incluindo o início da fragilidade (TROESCH *et al.*, 2020; EGGERSDORFER *et al.*, 2022).

1.5.3.4 Covid-19

Desde o final de 2019, uma nova infecção com síndrome respiratória aguda grave do coronavírus 2 (Covid-19) resultou numa pandemia global. Os sintomas da Covid-19 são altamente variáveis, e vão desde nenhum até uma doença com risco de vida, que está relacionada com a força da resposta imuno-inflamatória dos indivíduos infectados (DJURICIC; CALDER, 2021).

A gravidade da doença está associada ao avanço da idade, especialmente pessoas com mais de 65 anos, do sexo masculino, com doença pulmonar crônica; pessoas fumantes; indivíduos em estado de imunocomprometimento, obesidade, doença cardiovascular, incluindo hipertensão, diabetes e outras condições crônicas de saúde (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2022).

A libertação incontrolada de citocinas pró-inflamatórias (tempestade de citocinas) e a coagulação excessiva acompanham geralmente essa doença respiratória aguda. Desse modo, tratamento, ou suplementação indicada como prevenção dessa doença deve tentar minimizar justamente essa libertação de

citocinas e está centrado no tratamento da inflamação e trombose (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2022).

Como já mencionado, os AGPI n-3 são anti-inflamatórios, promovem a síntese de mediadores pré-resolução, e regulam a agregação e trombose plaquetária. Esses efeitos sugerem que a EPA e o DHA podem ser úteis como parte da terapia para Covid-19 (DJURICIC; CALDER, 2021).

Doaei *et al.* (2021), em um ensaio clínico randomizado, com 128 pacientes infectados com Covid-19, demonstraram que a suplementação com AGPI n-3 melhorou os níveis de vários parâmetros das funções respiratória e renal. Torrinhas *et al.* (2021) realizaram uma intervenção de 14 dias com EPA e DHA (400mg e 200mg diários adicionados à dieta enteral) e verificaram que resultou numa sobrevivência significativamente melhor, num mês, em comparação com o grupo de controle (21% vs. 3%). EPA + DHA também melhoraram os marcadores da função renal e alguns marcadores da função respiratória, e aumentaram o número de linfócitos sanguíneos; contudo, é importante notar que muitos outros resultados não foram diferentes entre os grupos (TORRINHAS *et al.*, 2021).

Em estudo de Louca *et al.* (2021) foi observado, em 445.850 indivíduos que consomem AGPI n-3, modesta diminuição de testes positivos para Covid 19 (DJURICIC; CALDER, 2021; LOUCA *et al.*, 2021).

Dois ensaios clínicos aleatórios relativamente expressivos estão atualmente em curso para verificar a hipótese de que o tratamento de formas graves de Covid-19 com AGPI n-3 é benéfico (YANG *et al.*, 2022)

1.6 RECOMENDAÇÕES NUTRICIONAIS

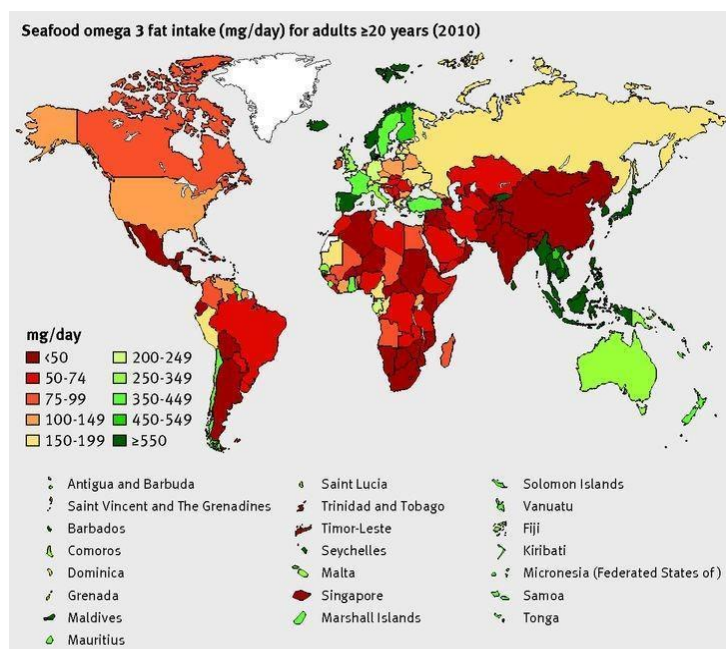
Os especialistas concordaram que, além das necessidades dietéticas dos lipídios e dos ácidos graxos, as orientações alimentares são essenciais para a promoção da saúde e prevenção de doenças (FAO, 2010). A recomendação permeia no consumo de alimentos inteiros (ou seja, frutas e vegetais, cereais integrais, frutos secos, sementes, leguminosas, outras fontes de fibras alimentares, frutos do mar ricos em AGPI), e ingestão relativamente baixa de energia de alimentos processados e fritos, e bebidas açucaradas; aliado ao consumo moderado de produtos lácteos e carnes magras (FAO, 2010).

Desse modo, uma dieta rica em compostos bioativos é essencial para a manutenção de uma boa saúde. Nas últimas décadas, uma fração crescente da população, que consome produtos manufaturados, deseja ser mais saudável; seguindo essa tendência, surge uma demanda recente e crescente por alimentos suplementados com AGPI. No entanto, um aumento no consumo de AGPIs n-6, paralelamente, reduziu o de AGPI n-3, nas dietas ocidentais, o que não é saudável (FAO, 2010).

As agências reguladoras e a Organização para a Alimentação e a Agricultura /Organização Mundial da Saúde (FAO/OMS) concordam que essas substâncias devem coexistir em uma proporção equilibrada, no corpo humano. Essa relação pode ser diferente, quando a ingestão tem objetivos terapêuticos. Nas últimas décadas, com o consumo excessivo de alimentos ricos em gorduras *trans*, a proporção média n-6/n-3 foi extremamente alta, aproximadamente 15/1. O aumento na proporção de n-6 para n-3 coincidiu com o aumento de muitas doenças, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, bem como inflamação e câncer (FINCO *et al.*, 2017; CALDER, 2017).

A FAO/OMS estabeleceu que o consumo adequado de AGPI deve ser entre 6% e 11% do valor calórico total da dieta humana, em adultos. Em relação ao AGPI n-3 (DHA e EPA), o consumo recomendado é cerca de 0,5-2% do valor calórico total da dieta humana. Ao analisar as recomendações das organizações reguladoras, sobre a ingestão diária de EPA e DHA, é importante ressaltar que, na maioria das partes do mundo, o consumo de AGPI n-3 ainda é consideravelmente menor do que o recomendado, de 500mg/dia, ou mesmo inexistente (Fig. 5). As exceções são os países costeiros, como o Japão, e alguns países da Escandinávia, cuja dieta é rica em organismos marinhos, com um consumo médio igual ou superior ao nível recomendado (FINCO *et al.*, 2017).

Figura 5 - Consumo de ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 de origem marinha em diversos países



Fonte: Micha *et al.* (2014).

A demonstração de ações fisiológicas do EPA e DHA, que resultam em prevenção e promoção à saúde e redução do risco de doenças, com o aumento da compreensão dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos no metabolismo desses AGs, indica a necessidade de estabelecer recomendações para a ingestão.

No entanto, a quantidade exata de AGPI n-3 para manter a saúde não é conhecida, dessa maneira é necessário estabelecer a ingestão diária recomendada (DRI) para EPA e DHA, uma vez que as DRIs são reconhecidas como o padrão “oficial” pelo qual as agências federais emitem orientações dietéticas ou políticas para a saúde e o bem-estar da população, uma vez que esses ácidos graxos trazem diversos benefícios para a saúde (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; WEYLANDT *et al.*, 2015).

Desse modo, o reconhecimento dos benefícios para a saúde, do consumo de EPA e DHA, resultou em várias recomendações, dentre elas: o consumo de peixe de águas frias, que contém esses AGs, e, em casos específicos, a suplementação com o óleo de peixe preconizada por várias agências governamentais, não governamentais e profissionais.

Atualmente, mais de 30 países recomendam a ingestão e possuem alegações de saúde aprovadas pelas autoridades de alimentação e/ou saúde para os AGPI n-3 (CALDER, 2018; KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; WEYLANDT *et al.*, 2015; GOED, 2017). As recomendações dietéticas para EPA + DHA variam de 250mg/dia a 1.000mg/dia, para adultos, e de 40mg/dia a 250mg/dia para lactentes com idade superior a 6 meses e para crianças e adolescentes (WEYLANDT *et al.*, 2015). As recomendações dos principais organismos encontram-se na Tabela 6.

A Associação Americana do Coração (AHA) publicou recomendações, que consentem com a suplementação de AGPI n-3 no tratamento da hipertrigliceridemia, em doentes com DCV e como prevenção primária da DCV (SISCOVICK *et al.*, 2017; RIMM *et al.*, 2018; SKULAS-RAY *et al.*, 2019).

Tabela 6 - Recomendação para ingestão de ácidos graxos poli-insaturados (EPA + DHA) de diversos órgãos internacionais

Organização	Ano	Recomendação
Organização Mundial de Saúde	2003	AGPI n-3: 1%-2% da energia/dia; uma a duas porções de peixe por dia (250mg a 500 mg EPA+DHA)
Sociedade Internacional para estudo de lipídios e ácidos graxos (ISSFAL)	2004 2007	500mg/dia Gestante/Lactante - DHA: 200mg/dia
Sociedade Brasileira de Cardiologia:	2021	Pacientes com hipertrigliceremia grave - EPA+DHA: 2g a 4g/dia
Sociedade Brasileira de Cardiologia	2019	Pacientes CDV - duas porções de peixe por semana; Pacientes IC - EPA+DHA: 1g/dia
Departamento de Saúde – Austrália e Nova Zelândia	2017	Homens - EPA,DHA e DPA: 600mg/dia; Mulheres - EPA,DHA e DPA: 400mg/dia
Associação Brasileira de Nutrologia - Brasil	2014	Gestantes/Lactantes – DHA: 200mg/dia; < 6 meses – DHA: 0,2% a 0,5% do total de lipídios
Ministério da saúde, trabalho e bem-estar - Japão	2014	Recomendação diferenciada para cada faixa etária (GOED, 2017)

(continua)

Tabela 6 (continuação)

Organização	Ano	Recomendação
FAO	2010	AGPI n-3: 0,5%-2% da energia/dia; EPA+DHA (adulto): 0,250g/dia; EPA+DHA (gestante/lactante): 0,300g/dia; EPA+DHA (gestante/lactante): 0,300g/dia; DHA (gestante/lactante): mínimo de 0,200g/dia; DHA (0 a 6 meses): 0,2% a 0,36% de ácidos graxos; DHA (6 a 12 meses): 10-12mg/kg/dia; DHA (12 a 24 meses): 10-12mg/kg/dia; EPA+DHA (2 a 4 anos): 100-150mg/dia; (continua) EPA+DHA (4 a 6 anos): 150-200mg/dia; EPA+DHA (6 a 10 anos): 200-300mg/dia
Instituto de Medicina – EUA	2005	1-3 anos – EPA+DHA: 70mg/dia; 4-8 anos – EPA+DHA: 90mg/dia; 9-13 anos (meninos) – EPA+DHA: 120mg/dia; 9-13 anos (meninas) – EPA+DHA: 100mg/dia; 14-18 anos (meninos) – EPA+DHA: 160mg/dia; 14-18 anos (meninas) – EPA+DHA: 110mg/dia; Adultos homens (> 19 anos) – EPA+DHA: 160mg/dia; Adultas mulheres (> 19 anos) – EPA+DHA: 110mg/dia
Sociedade Chinesa de Nutrição	2014	Gestantes/Lactantes – EPA+DHA: 250mg/dia e DHA: 200mg/dia; 0 a 4 anos – DHA: 100mg/dia. (continua)

Tabela 6 (conclusão)

Organização	Ano	Recomendação
European Food Safety Authority (EFSA)	2010	População geral – 250mg/dia; Pacientes DCV – 250mg/dia a 500 mg/dia; Gestantes/Lactantes – DHA: 100mg/dia a 200 mg/dia a mais; 7 a 24 meses – DHA: 100 mg/dia; 2 a 18 anos – EPA+DHA: 250mg/dia

Fonte: Adaptado de Kus-Yamashita; Mancini-Filho (2017), Sioen *et al.* (2017) e Goed (2017).

Segundo Sioen *et al.* (2017) as recomendações de ingestão de AGPI n-3 preconizadas pelo Instituto de Medicina dos EUA e OMS precisam ser atualizadas, pois baseiam-se em evidências publicadas antes de 2000.

A Organização Global de EPA e DHA (GOED) publicou, em 2016, suas recomendações de ingestão diária de AGPI n-3, EPA e DHA. Essas recomendações resultam de vários anos de discussão e vêm após uma análise cuidadosa e consideração de outros padrões internacionais para assegurar a validação científica. As recomendações da GOED encontram-se na Tabela 7(GOED, 2017).

Tabela 7 - Recomendação de consumo de EPA e DHA pela GOED

Grupo populacional	Recomendação (mg/dia)
Adultos saudáveis (para diminuir o risco de DCV)	EPA+DHA: 500
Mulheres gestantes/lactantes	EPA+DHA: 700 mínimo DHA: 300
Prevenção secundária de DCV	EPA+DHA: 1.000
Condições adicionais de saúde (hipertensão arterila, hipertrigliciremia)	EPA+DHA: acima de 1.000

Fonte: Goed (2017).

Em 2012, o Painel de Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias (NDA) da Autoridade Europeia para Alimentação Segura/*European Food Safety Authority* (EFSA) emitiu um parecer sobre o nível máximo tolerável de ingestão (UL) de EPA e DHA. Os dados disponíveis são insuficientes para se estabelecer um UL para AGPI n-3 (individualmente ou combinado) para qualquer grupo populacional. Nos níveis de ingestão observados, o consumo de AGPI n-3 não foi associado a nenhum efeito adverso em crianças ou adultos saudáveis.

As suplementações de EPA e DHA combinados, de até 5g/dia, no longo prazo, parecem não aumentar o risco de episódios de hemorragia espontânea e complicações hemorrágicas, ou afetar a função imunológica da homeostasia da glicose ou a peroxidação lipídica, desde que a estabilidade oxidativa dos AGPI n-3 seja garantida (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; EFSA, 2012).

As doses de suplementação de EPA e DHA combinados em doses de 2g/dia a 6g/dia e de DHA em doses de 2g/dia a 4 g/dia, induzem um aumento das concentrações de LDL-colesterol em cerca de 3%, que não pode ser considerado efeito adverso no risco de DCV, enquanto, no caso do EPA, doses de até 4 g/dia não têm efeito significativo sobre o LDL-colesterol.

Há evidências de que a ingestão de AGPI n-3 está associada a um tempo prolongado de sangramento, em homens e mulheres saudáveis (SCHLÖGELHOFER et al., 2014). Uma revisão da literatura de Knapp (1997) sugeriu que o prolongamento do tempo de sangramento geralmente é modesto e não houve relatos de sangramento clinicamente significativo (KNAPP, 1997). Uma declaração da FDA confirmou que os óleos de peixe podem prolongar significativamente o tempo de hemorragia, mas uma dose de até 3g por dia de EPA/DHA é considerada segura (HARRIS, 2007).

As ingestões suplementares de DHA, de até cerca de 1g/dia, sozinhas, não levantam preocupações de segurança para a população em geral (KUS-YAMASHITA; MANCINI-FILHO, 2017; EFSA, 2012).

O potencial risco à saúde dos óleos de peixe, por conterem vitaminas em excesso; toxinas ambientes; e/ou produtos oxidados, depende do processo de purificação desse suplemento, ou seja, as indústrias do setor devem cumprir os padrões de qualidade e de boa prática de fabricação. Para a garantia da eficácia desse suplemento, além de testes laboratoriais robustos e precisos, a população

deve avaliar o rótulo da embalagem, verificando as quantidades dos AGPI n-3 explicitados na informação nutricional (BAYS, 2007; DAVE; ROUSTRAY, 2018).

1.7 ANÁLISE DE ÁCIDOS GRAXOS

A real quantidade de AG em alimentos, em especial nos suplementos de óleos de peixe, devido ao seu benefício para a saúde humana, determina sua qualidade e eficácia (ARMENTA *et al.*, 2009). A análise de AGPI n-3 de fontes marinhas apresenta desafios adicionais em comparação com outros óleos comestíveis e vegetais (ARMENTA *et al.*, 2009; HERNANDEZ, 2014).

Os óleos marinhos são compostos de uma ampla variedade de AGs, com relação ao comprimento da cadeia de carbono, às múltiplas posições de dupla ligação; e a presença de isômeros; além disso, os níveis de AGPI n-3 nos alimentos são baixos, em relação a outros AGs mais abundantes. Embora, na maioria dos suplementos e os alimentos que contenham AGPI n-3, esses estão na forma de triacilglicerol (TAG), outras formas, como monogliceróis, diacilgliceróis, ésteres etílicos, fosfolípidos, ou ácidos graxos livres, podem também estar presentes, acrescentando um desafio adicional no desenvolvimento de métodos analíticos apropriados, além da questão da instabilidade química dos AGPIs (ARMENTA *et al.*, 2009; HERNANDEZ, 2014).

A análise de AG em alimentos envolve geralmente três etapas: extração dos lípidos; conversão dos lípidos extraídos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG); e análise do EMAG utilizando cromatografia gasosa (GC) (FAO, 2010). Para ser mais eficiente, a determinação de AG também pode ser realizada integrando a extração de lipídios e a conversão em EMAG em um único passo. Os métodos utilizados para a esterificação do grupo metila incluem catálise com ácido ou com base; catálise combinada ácido-base; e catálise com cloreto de acetileno em metanol (ARMENTA *et al.*, 2009; HERNANDEZ, 2014).

Os métodos ácidos permitem a conversão de todos os AGs (esterificados e livres), e o tempo de reação é determinado pela concentração e temperatura do ácido. Os métodos catalisados pela base podem ser conduzidos sob condições de temperatura moderada, mas são inaplicáveis para derivar AG livre, além disso, a umidade no sistema tem fortes influências na reação (ARMENTA *et al.*, 2009; HERNANDEZ, 2014).

O cloreto de acetileno em metanol tem sido amplamente utilizado para a determinação de AG, podendo produzir um meio ácido (HCl) durante a metilação (ARMENTA *et al.*, 2009). Ao utilizar o método catalisado por ácido, geralmente são necessárias concentrações mais elevadas do ácido, bem como tempo de reação e aquecimento mais longos.

Normalmente, as reações de esterificação são realizadas em meio metanólico, evitando a influência da água nas reações (a água afeta a taxa de esterificação). Ao utilizar o ácido clorídrico, o composto de HCl metanólico anidro é instável e o HCl pode reagir com o metanol e produzir clorometano e água (ARMENTA *et al.*, 2009; HERNANDEZ, 2014).

O uso de H₂SO₄ pode promover a desidratação do metanol e produzir éter metílico; todas essas reações provocam uma conversão de AG em EMAG incompleta. O cloreto de acetileno é um agente irritante e corrosivo; seu vapor estimula fortemente os olhos e as mucosas. O método da hidrólise ácida com H₂SO₄ em metanol produziu resultados mais aceitáveis e satisfatórios, e também em condições de segurança química e menos risco à saúde (JIA *et al.*, 2017). Especificamente para óleos marinhos, comumente, se utiliza trifluoreto de boro (BF₃); e bases como hidróxido de sódio (NaOH) e hidróxido de potássio (KOH) (ARMENTA *et al.*, 2009).

Durante o estudo de Armenta *et al.* (2009), no qual foram comparados seis métodos de transesterificação, os autores observaram que o BF₃ pode formar produtos secundários, especialmente na reação com AGPI; há perda de solvente durante o procedimento (consequentemente, a perda de amostra); e a quantidade de óleo e da mistura de solventes pode afetar a derivatização dos AG, e subestimar seu valor (ARMENTA *et al.*, 2009).

1.7.1 Informações na rotulagem nutricional

O conteúdo AGPI n-3 pode ser expresso de diversas maneiras, como ácidos graxos livres; ésteres de metílicos; equivalentes de triacilglicerol; e a interpretação errônea dessas análises pode resultar em erros de cálculo na formulação de produtos e na informação de quantidades, em rótulos de produtos alimentares. Existem dois métodos tradicionais utilizados para quantificar o teor de EPA e DHA em óleos: porcentagem de área e concentração em massa.

O método de percentagem de área calcula EPA e DHA como uma fração dos AGs no óleo (perfil de AGs), não considerando os componentes não gordurosos do óleo, como glicerol, colesterol, álcoois, hidrocarbonetos, esqualeno (contidos nos óleos de peixe entre 5% a 15%). As desvantagens da normalização são: propagações de erros devido à interdependência dos resultados; se algum componente da amostra não for detectado, afeta o valor dos outros compostos (IAL, 2005)

Além disso, os resultados apresentados por esse método provocam dificuldades de interpretação e muitas vezes são publicados de forma errônea. Portanto, para melhorar a confiabilidade nos dados, os resultados das concentrações devem ser expressos em massa de EMAG/massa de amostra, e, para isso, utilizam-se o padrão interno e os fatores de correção do detector de ionização em chama, e, nesse caso, ressalta-se a dificuldade de utilizar fatores de correção e padrões internos (HERNANDEZ, 2014; VISENTAINER, 2012).

O método da padronização interna (PI) é indicado, considerando-se que é menos sensível a erros de injeções e variações instrumentais, além disso, o padrão interno deve apresentar os requisitos: não constar na amostra; ser acessível e barato; apresentar alto grau de pureza; ser adicionado em concentrações próximas aos analitos; eluir separadamente dos componentes da amostra; apresentar boa estabilidade. É evidente que todos estes requisitos são dificilmente contemplados nas análises de uma mistura de EMAGs (VISENTAINER, 2012).

A análise de isômeros *cis versus trans* pode também apresentar um desafio, uma vez que o tratamento térmico prolongado durante o processamento pode resultar em uma pequena porção dos AGPIs isomerizados em isômeros geométricos contendo uma ou mais ligação dupla *trans*, uma vez que essa configuração é mais estável (HERNANDEZ, 2014).

Tradicionalmente, os EMAGs são analisados por cromatografia gasosa (CG), acoplado ao detector de ionização de chama (DIC). As insaturações e o tamanho da cadeia hidrocarbônica refletem diretamente no número de carbonos ativos e, conseqüentemente, são fatores decisivos nas reações que ocorrem no detector de ionização em chama. O DIC apresenta uma quantidade mínima detectável, de aproximadamente 10^{-12} g (para alcanos); uma resposta quase

universal; faixa de linearidade ampla; é simples de operar; e a resposta é rápida (HERNANDEZ, 2014; VISENTAINER, 2012).

A magnitude do sinal gerado pelo DIC é proporcional ao número de átomos de carbono e hidrogênio na molécula que está sendo analisada, ou seja, é proporcional aos átomos de carbonos ligados a átomos de hidrogênios. No entanto, existem fatores intrínsecos na molécula de EMAG que afetam a resposta do DIC; dentre esses, o oxigênio, que diminui a resposta do DIC; e diferentes efeitos na combustão, entre cadeia saturada e insaturada (HERNANDEZ, 2014; VISENTAINER, 2012).

Para evitar que esses comportamentos entre os diferentes AGs interfiram na sua quantidade final, deve-se considerar que cada EMAG responde diferentemente no DIC, utilizando, assim, o fator de correção do DIC experimental ou teórico. O fator de correção teórico é determinado por cálculos feitos a partir do número de carbonos ativos de cada AG e, o experimental, através da análise de padrões de AGs no CG/DIC. Ambos os fatores são obtidos com base na comparação entre os EMAGs e o PI (ARMENTA *et al.*, 2009; VISENTAINER, 2012).

Na análise de EMAGs em óleos marinhos, devem ser utilizados fatores de resposta experimentais, uma vez que os fatores de correção teóricos podem subestimar o valor dos AGs, devido ao ponto de ebulição alta desses componentes; ou superestimar os valores do EMAGs que apresentam baixo ponto de ebulição, resultando na incorporação de grandes erros na soma final das suas concentrações (ARMENTA *et al.*, 2009). Uma desvantagem em utilizar o detector DIC permeia a falta de informações sobre a estrutura real do AG, fato que pode ser solucionado ao utilizar a CG acoplada à espectrometria de massa (MS) (HERNANDEZ, 2014).

Vários aspectos críticos precisam ser considerados para a obtenção de medições quantitativas corretas de AGPI e evitar sua oxidação durante a análise, e incluem: não armazenar os óleos isolados das cápsulas (ou qualquer formulação), mas processar cada amostra de óleo individualmente, antes da análise; verificar se os materiais de laboratório utilizados para o armazenamento da amostra de óleo e a transferência durante a preparação da amostra não promovem a oxidação; trabalhar com nitrogênio ou argônio, sempre que possível; usar recipientes que possam acomodar o volume da amostra injetada

na análise de CG; usar padrões internos e externos; obter resolução de linha de base, identificação correta de cada EMAG (pico cromatográfico); e prestar muita atenção aos critérios de aceitação de adequação do sistema (BANNENBERG *et al.*, 2007).

As características dos métodos oficiais, comumente utilizados para a quantificação de AGs em óleo de peixe, encontram-se na Tabela 8. Todos os métodos foram analisados por CG/DIC.

Tabela 8 - Características dos métodos oficiais utilizados para a determinação de ácidos graxos em óleos de peixe

Método	Esterificação	Coluna	Forno	Padrão interno	Fator de correção do detector
AOAC 991.39	Trifluoreto de boro (BF ₃)	sílica com poliglicol de 30m	1°C/min - 170°C a 225°C	EMAG 23:0 (1mg/mL)	teórico
AOCS Ce 1b-89	Trifluoreto de boro (BF ₃)	sílica com poliglicol de 30m	1°C/min - 170°C a 225 °C	EMAG 23:0 (1mg/mL)	teórico
AOAC 2012.13	Metóxido de sódio	Sílica com polixisolana de 100m	- 60°C (5min); - 15°C/min até 165°C (1min); - 2°C/min até 225°C (20min);	EMAG 11:0 TAG 13:0 (1mg/mL)	Teórico
AOCS Ce 1i-07 (não separa <i>trans</i>)	Trifluoreto de boro (BF ₃)	sílica com polietilenoglicol de 30m	1°C/min - 170°C a 225°C	TAG 23:0 (2mg/mL)	> 20 carbonos - experimental < 20 carbonos - teórico
AOCS Ce 1j-07 (separa <i>cis</i> e <i>trans</i>)	Trifluoreto de boro (BF ₃)	sílica com cianopropil siloxana de 100m	- 45°C (4min); - 12°C/min até 175°C (27min); - 4°C/min até 215°C (20min);	TAG 13:0 (2 mg/mL)	> 20 carbonos - experimental < 20 carbonos - teórico
Farmacopeia europeia - 2.4.29 (EPA e DHA)	Trifluoreto de boro (BF ₃)	sílica com polietilenoglicol de 30 m	- 170°C (2min); - 3°C/min até 240°C (3min);	EMAG 23:0 70,0 mg	experimentais

Fontes: AOAC (2019); AOCS (2017) e Autora.

Os métodos comumente usados para análise de óleo de peixe são da American Oil Chemist's Society (AOCS) Ce 1b-89 e da Association of Official Analytical Chemists AOAC 991.39, os quais utilizam como PI o EMAG C23:0; fatores de correção teóricos; e as quantidades absolutas de cada AG é expressa como mg/g (AOAC, 2019; AOCS, 2017). Esses métodos foram desenvolvidos para óleos de peixe com valores de EPA e/ou DHA até 20%.

Atualmente, há disponível, no mercado, óleos de peixe com concentrações de EPA e/ou DHA acima de 30%, e, portanto, esses métodos não refletiram uma análise confiável. Os principais questionamentos desses métodos estão relacionados ao uso dos fatores teóricos de correção, uma vez que EPA e DHA são vulneráveis à degradação durante a análise do GC; devido ao seu alto peso molecular, eles são os últimos a serem eluídos na coluna cromatográfica e, portanto, ficam expostos à temperatura máxima do forno (a longa exposição a altas temperaturas e suas insaturações os torna sujeitos a reação com quaisquer vestígios de oxigênio, ou água, do gás de arraste no injetor, ou na coluna).

O método alternativo da European Pharmacopeia, EP 2.4.29, foi desenvolvido particularmente para óleos de peixe mais concentrados; utiliza fatores de resposta experimentais para EPA e DHA e EMAG de C23:0 como PI, e, nesse caso, esses fatores experimentais são da ordem de 10% inferiores aos teóricos e existe uma variação significativa desses; portanto, essa determinação deve ser realizada a cada conjunto de análises (SCRIMGEOUR; TRAYNOR, 2017).

Scrimgeour e Traynor (2017) realizaram análise para amostras de óleos de peixe pelos métodos AOCS Ce 1b-89 e EP 2.4.29, e as quantidades absolutas (mg/g) são cerca de 10% maiores para o método EP 2.4.29. Embora as diferenças entre os dois métodos não sejam significativas em concentrações mais baixas, para uma cápsula de 1.000mg contendo óleo de peixe, a diferença pode ser de até 75mg de AGPI n-3 por dose (SCRIMGEOUR; TRAYNOR, 2017).

Também podem ser utilizados, para análise de óleo de peixe, os métodos AOCS Ce 1i-07 e o Ce 1j-07; a principal diferença entre eles relaciona-se à separação dos isômeros *trans* dos AGs, enquanto, no método Ce 1i-07, não há essa separação, no Ce 1j-07 é possível, devido ao uso de uma coluna cromatográfica com maior polaridade e comprimento, e também o PI difere entre

eles, por isso a utilização do PI C23:0 é mais apropriada para óleo de peixe. O método AOAC 2012.13, oficial para análise de fórmula infantil e/ou fórmula para adultos com adição de AGPI n-3, preconiza o uso PI de C11 e C13, além de fatores experimentais, diferente dos métodos exclusivos para óleos de peixe, onde a recomendação de uso de fatores experimentais e o PI de C23.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Otimizar e validar a metodologia para análise de ácidos EPA e DHA e seus isômeros e verificar a estabilidade oxidativa dos óleos de peixe encapsulados comercializados no estado de São Paulo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ otimizar a metodologia de preparação de ésteres metílicos de ácidos graxos para óleo de peixe, com ênfase em diminuição de tempo de análise e uso de solventes;
- ✓ padronizar um método de análise para ácidos graxos poli-insaturados, característicos no óleo de peixe, com ênfase nos padrões internos e fatores de correção do detector de ionização em chama;
- ✓ caracterizar os óleos de peixe comercializados no estado de São Paulo através do perfil de ácidos graxos e verificar se estão de acordo com a informação nutricional fornecida pelo fabricante dos óleos;
- ✓ verificar e comparar os óleos de peixe com os valores preconizados pelo *Codex Alimentarius Stan 329-2017*;
- ✓ verificar a estabilidade oxidativa dos óleos de peixe por meio dos índices de peróxido, p-anisidina e ToTox, e quais fatores têm influência na oxidação;
- ✓ realizar ensaio de estabilidade nos óleos de peixe comerciais durante o período de validade do produto;
- ✓ identificar se há ácidos graxos na configuração *trans* dos ácidos DHA e EPA.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL

3.1.1 Amostras

Os óleos de peixe encapsulados foram adquiridos no comércio do Estado de São Paulo e recebidos pelo Instituto Adolfo Lutz, por meio de coletas realizadas pelas Vigilâncias Sanitárias Municipais do Estado de São Paulo. Foram analisadas 51 amostras, de 40 marcas diferentes (Tabelas 9 e 10), que foram estocadas a 4°C e protegidas de luz até o momento da análise, evitando a deterioração (ANNAMALAI; DUSHYANT; GUDIPATI, 2015). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para as análises do estudo de estabilidade e das variáveis no processo de oxidação, foram adquiridas quatro amostras de óleo de peixe de um mesmo fabricante, com diferentes composições de EPA e DHA: OP 47 - 18% de EPA e 12% de DHA OP 48 - 33% de EPA e 22% de DHA; OP 49 e OP 50 - 70% de DHA e 10% de EPA; e OP 51 - 18% de EPA e 12% de DHA (adicionada de vitamina E).

Na Tabela 11, constam as amostras de referência que foram utilizadas para verificar a exatidão e precisão dos métodos analíticos.

Tabela 9 - Informações relativas às amostras de óleo de peixe encapsulados comercializadas no Estado de São Paulo

Código	Marca	Denominação comercial	Adição de antioxidantes	Meses a vencer	Local de coleta
OP 1	A	-	-	19	Hortolândia
OP 2	B	Óleo de Peixe em Cápsula - Ômega 3	-	10	Hortolândia
OP 3	C	Óleo de Peixe de Águas Frias - Ômega 3 Plus	-	23	Santa Bárbara
OP 4	D	Óleo de Peixe em Cápsulas - Ômega 3	-	17	São Bernardo do Campo
OP 5	E	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	-	20	Santo André
OP 6	F	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3 - 500	-	17	Limeira
OP 7	G	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	BHT	2	Limeira
OP 8	H	Óleo de Peixe em cápsulas - 1000mg	-	18	Diadema
OP 9	I	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	-	22	São Paulo
OP 10	J	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	BHT	14	São Paulo
OP 11	K	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	-	12	São Paulo
OP 12	L	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	-	10	São Paulo
OP 13	M	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	-	19	São Paulo
OP 14	N	Óleo de Peixe em Cápsulas - Ômega 3 - EPA DHA	Vitamina E	18	Assis
OP 15	O	Ômega 3 - Óleo de Peixe	-	34	Salto
OP 16	P	Ômega 3 - Óleo de Peixe	-	20	Salto
OP 17	Q	Óleo de Peixe - Suplemento de Óleo de Peixe de águas profundas e frias.	-	11	Sorocaba
OP 18	R	Óleo de Peixe Concentrado em cápsulas - Ultra Epa	Tocoferóis	11	Sorocaba
OP 19	G	Ômega 3 - Óleo de Peixe em Cápsula	-	15	Atibaia
OP 20	S	Ômega 3 - Óleo de Peixe em Cápsula 1.000 mg	-	26	Atibaia
OP 21	T	Óleo de Peixe em cápsula	-	16	São Paulo
OP 22	U	Ômega 3	-	22	Araçoiaba da Serra
OP 23	V	Óleo de peixe em cápsulas - Ômega 3 Fish Oil	-	19	Ferraz de Vasconcelos
OP 24	X	Óleo de peixe em cápsulas - Ômega 3	-	7	Valinhos

(continua)

Tabela 9 (continuação)

Código	Marca	Denominação comercial	Adição de antioxidantes	Meses a vencer	Local de coleta
OP 25	Y	Ômega 3	-	24	Guarujá
OP 26	W	Fish Oil Ômega 3	-	14	São Paulo
OP 27	Z	Ômega 3	-	19	São Paulo
OP 28	AA	Suplemento Alimentar de Oléo de Peixe - Fish Oil Ômega 3 em cápsulas.	-	20	Ribeirão Pires
OP 29	AB	Ômega 3	-	13	Limeira
OP 30	AC	Ômega 3 Fish Oil - Óleo extraído de peixes de águas profundas	-	21	Paulínia
OP 31	Y	Ômega 3	-	32	Indaiatuba
OP 32	AD	FishOil Ômega 3	-	19	Cubatão
OP 33	Y	Ômega 3	-	27	Valinhos
OP 34	AE	Ômega 3	-	7	São Paulo
OP 35	AF	Fish Oil	mistura de tocoferóis	19	São Paulo
OP 36	AG	Vita Ômega 3	-	19	Itanhaém
OP 37	AG	Vita Ômega 3	-	19	Mauá
OP 38	AH	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	-	29	Guarujá
OP 39	AI	Oleo de peixe	-	35	Indaiatuba
OP 40	U	Ômega 3	-	19	Rio Claro
OP 41	AJ	Óleo de Peixe em cápsulas	-	11	Santa Isabel
OP 42	AK	Óleo de Peixe em cápsulas - Ômega 3	-	24	São Caetano do Sul
OP 43	AD	FishOil - Óleo de Peixe Ômega 3 em cápsulas EPA 18% / 12%	-	21	Paulínia
OP 44	AL	Óleo de Peixe Ômega 3 - 18 EPA / 12 DHA - em cápsulas	-	18	São Paulo
OP 45	S	Óleo de Peixe - Ômega 3 em cápsulas	-	23	São Paulo
OP 46	J	Óleo de Peixe em cápsulas - Alto teor de Ômega 3	BHT	21	Suzano

(continua)

Tabela 9 (conclusão)

Código	Marca	Denominação comercial	Adição de antioxidantes	Meses a vencer	Local de coleta
OP 47	H	Ômega 3	-	43	Mogi das Cruzes
OP 48	H	Supra ômega 33-22	-	40	São Paulo
OP 49	H	Supra ômega 70 DHA	-	43	Mogi das Cruzes
OP 50	H	Supra ômega 70 DHA	-	37	São Paulo
OP 51	H	Ômega 3 com vitamina E	Vitamina E (dextroalfatocoferol)	43	Mogi das Cruzes

Fonte: Autora.

Tabela 10 - Informação nutricional das amostras de óleo de peixe encapsulados comercializadas no Estado de São Paulo

Código	Marca	Porção (g)	Informação Nutricional					
			Gordura saturada (g)	Gordura <i>trans</i> (g)	Gordura monoinsaturada (g)	Gordura poli-insaturada (g)	EPA (mg)	DHA (mg)
OP 1	A				Não consta			
OP 2	B	2	0,6	0	0,4	1	360	240
OP 3	C	2	-	-	-	1,8	700	400
OP 4	D	2	2	0	-	0,6	366	242
OP 5	E	3				1	540	360
OP 6	F	2	0,6	0	0,7	0,6	400	200
OP 7	G	3				1	240	360
OP 8	H	2	0,2		0,4	1,5	200	1400
OP 9	I	2,8	0,5		0,4	0,6	390	244
OP 10	J	1,5	0,4		270	0,5	279	188
OP 11	K	3	0,9		0,6	1,5	540	360

(continua)

Tabela 10 (continuação)

Código	Marca	Porção (g)	Informação Nutricional					
			Gordura saturada (g)	Gordura <i>trans</i> (g)	Gordura monoinsaturada (g)	Gordura poli-insaturada (g)	EPA (mg)	DHA (mg)
OP 12	L	3	0,9	0	0,6	1,5	540	360
OP 13	M	3				1	540	360
OP 14	N	3	0,5	0	0,5	1,3	500	400
OP 15	O	2	0,6	0	0,4	0,6	400	200
OP 16	P	3	0,7	0	236	0,9	558	375
OP 17	Q	2				0,6	366	242
OP 18	R	2	0,1		0,3	1,5	660	440
OP 19	G	3				1	540	360
OP 20	S	3	0,6	0	0,9	1,2	540	360
OP 21	T	1,4	0	0	0	0,9	500	400
OP 22	U	4,2	0,5		0,5	0,9	540	360
OP 23	V	3	0,9	0	0,6	1,5	540	360
OP 24	X	1	0,4	0	0,2	0,4	188	126
OP 25	Y	2	0,4	0	0,8	0,8	-	200
OP 26	W	1	0,2	-	0,3	0,4	180	120
OP 27	Z	3	0,9	0	0,6	1,5	540	360
OP 28	AA	2	0,6	-	0,4	0,9	540	360
OP 29	AB	3				1	540	360
OP 30	AC	3				1	540	360
OP 31	Y	2,3	0,8	0	0,6	0,9	540	360
OP 32	AD	2	0,6	0	0,4	0,9	360	240
OP 33	Y	2,3	0,8	0	0,6	1,5	540	360
OP 34	AE	3	0,9	0	0,6	1,5	540	360
OP 35	AF	3	0,8	0	0,8	1,4	-	900
OP 36	AG	2,3	0,8	0	0,6	0,9	500	400

(continua)

Tabela 10 (conclusão)

Código	Marca	Porção (g)	Informação Nutricional					EPA (mg)	DHA (mg)
			Gordura saturada (g)	Gordura <i>trans</i> (g)	Gordura monoinsaturada (g)	Gordura poli-insaturada (g)			
OP 37	AG	2,3	0,8	0	0,6	0,9	500	400	
OP 38	AH	2,1	0,4		0,6	0,6	400	200	
OP 39	AI	3	0,9	0	0,6	1,5	540	360	
OP 40	U	3	0,8	0	0,8	1,4	-	900	
OP 41	AJ	1,5				0,5	270	180	
OP 42	AK	2	0,4		0,8	0,8	400	200	
OP 43	AD	2	0,6	0	0,4	0,9	360	240	
OP 44	AL	2	0,6	0	0,4	0,9	360	240	
OP 45	S	2,3	0,8	0	0,6	0,9	540	360	
OP 46	J	1,1	0,4		270	0,5	279	188	
OP 47	H	2	0	0	0	2	240	360	
OP 48	H	2,7	0	0	0,5	1,3	660	440	
OP 49	H	2	0,2	0	0,4	1,5	200	1400	
OP 50	H	2	0,2	0	0,4	1,5	200	1400	
OP 51	H	6	1,8	0	1,2	2	1080	720	

Fonte: Autora.

Tabela 11 - Amostras de referências utilizadas para avaliação da exatidão dos métodos analíticos

Amostra	Denominação	Método analítico	Valores
COI 2019 M1	100% azeite de oliva extravirgem	acidez	0,27 ± 0,0133 % em ácido oléico
COI 2019 M3	80% azeite de oliva lampante 10% oleína de palma 1% gordura animal	acidez	0,67 ± 0,0355 % em ácido oléico
COI 2021 M1	100% azeite de oliva extravirgem	acidez e peróxido	Acidez – 0,16 ± 0,039 % em ácido oléico Peróxido: 6,51 ± 0,5 mEq/kg
COI 2021 M2	80% azeite de oliva com alto conteúdo de alquil éster 20% óleo de girassol alto oléico	acidez e peróxido	Acidez – 0,71 ± 0,0353 % em ácido oléico Peróxido: 6,83 ± 0,5 mEq/kg
FAPAS® - T14222QC	óleo de peixe	ácidos graxos	diversos valores em g/100g

Fonte: Autora. COI: Conselho Oleícola Internacional

3.1.2 Padrões, reagentes e solventes

Os padrões cromatográficos utilizados para a quantificação e identificação dos ácidos graxos foram: solução contendo mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) de 4 a 24 átomos de carbono, com 37 componentes (CRM 47885, Supelco); solução contendo mistura de 4 isômeros *cis/trans* de ésteres metílicos do ácido linoleico (C_{18:2}) (CRM 47791, Supelco); solução contendo mistura de 8 isômeros *cis/trans* de ésteres metílicos do ácido linolênico (C_{18:3}) (CRM 47792, Supelco); solução do éster metílico do ácido eicosapentaenóico (EPA, C_{20:5}) (CRM 47571, Supelco); solução do éster metílico do ácido docosahexaenóico (DHA, C_{22:6}) (CRM 47570, Supelco); e solução do éster metílico do ácido docosapentaenóico (DPA, C_{22:5}) (CRM 47563, Supelco); padrão do éster metílico do ácido graxo undecanóico (C₁₁) (U0250, Sigma Aldrich); padrão do éster metílico do ácido graxo tridecanóico (C₁₃) (T0627,

Sigma Aldrich); e padrão do éster metílico do ácido graxo tricosanóico (C₂₃) (91478, Supelco); padrão de p-anisidina (A 88255, Sigma Aldrich).

Os solventes e reagentes empregados foram: a) grau cromatográfico: n-hexano; isooctano; metanol; b) grau analítico: ácido acético; ácido sulfúrico; cloreto de amônio; cloreto de sódio; clorofórmio; éter etílico; hidróxido de potássio; hidróxido de sódio; iodeto de potássio; sulfato de sódio; e tiosulfato de sódio.

3.1.3 Vidrarias

- ✓ Balões volumétricos de 5mL, 10mL, 25mL e 50mL;
- ✓ Béquer de 50mL e 100mL;
- ✓ Tubos de 15mL e 50mL;
- ✓ Provetas de 100mL e 500mL;
- ✓ Cubetas de vidro de 2mL.

3.1.4 Equipamentos e acessórios

- ✓ Agitador de tubo tipo “vórtex”, modelo QL 901, marca Biomoxer;
- ✓ Balança analítica - capacidade de pesagem $\pm 0,0001\text{g}$, modelo ME 204, marca Mettler Toledo;
- ✓ Banho-maria com controle de temperatura, marca Nova Técnica;
- ✓ Estufa a vácuo com controle de temperatura, modelo 524B, marca Precision Scientific;
- ✓ Estufa a vácuo com controle de temperatura, modelo 5831, marca Prapco;
- ✓ Coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária bis-cianopropil siloxana. HP-88 (100m, 0,25mm; 0,25 μm), marca J&W Scientific, Agilent;
- ✓ Cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (CG/DIC) e injetor split/splitless, modelo Focus GC, marca Thermo, acoplado de injetor automático TriPlus, marca Thermo;
- ✓ Espectrofotômetro, Specord S 600, marca Analytikjena ;
- ✓ Eletrodo não aquoso iSolvotrode, marca Metrohm;
- ✓ Eletrodo de platina duplo iPt, marca Metrohm;
- ✓ Espectrômetro de ressonância magnética nuclear, marca Varian, modelo INOVA 500;

- ✓ Termo-higrômetro;
- ✓ Termômetro;
- ✓ Pipeta pasteur de polipropileno de 3mL;
- ✓ Cápsula de porcelana;
- ✓ Pipetador automático (50µL a 200µl e 200µL a 1.000µL);
- ✓ Titulador automático Titrand 905, marca Metrohm;
- ✓ Tubos de polipropileno, com tampas de rosca, com capacidade para 50mL;
- ✓ Vials, com capacidade para 2,0mL, com tampa e septo de teflon/silicone;
- ✓ Frascos de vidro com capacidade de 10mL;
- ✓ Areia.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Determinação da acidez

O ensaio de acidez em óleo de peixe foi fundamentado no método 325/IV do livro *Métodos Físico-Químicos para Análise de Alimentos*, do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2005) e no método ISO 660:2020 (ISO, 2020). Foram pesadas cerca de 2g de amostra, que foram homogeneizadas com 45mL de solução álcool etílico: éter etílico (2:1, v/v) e utilizados na titulação com solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,01M, em meio a isopropanol.

Esse procedimento foi realizado por titulação potenciométrica, com eletrodo não aquoso (iSolvotrode, Metrohm) e equipamento Titrand 905 (Metrohm), composto por duas buretas, e todo esse procedimento realizado de maneira automatizada. A titulação foi realizada em modo dinâmico e o ponto de equivalência foi determinado pelo método da 1ª derivada. Foi utilizado como branco uma solução de álcool etílico: éter, que foi titulada com KOH 0,01M. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A padronização da solução de KOH foi realizada previamente, usando biftalato de potássio, segundo metodologia oficial 936.16 da AOAC (AOAC, 2019).

O cálculo do índice de acidez foi realizado de acordo com a equação 1, e o resultado expresso em mg KOH / g.

$$acidez = \frac{(v_g - v_{branco}) \cdot c}{m} \quad (1)$$

v_g – volume (mL) de KOH 0,01 M utilizado na titulação;

v_{branco} – volume (mL) de KOH 0,01 M utilizado na titulação da amostra branco;

c – concentração real (M) de KOH;

m – massa (g) da amostra.

3.2.2 Determinação do índice de peróxido

O índice de peróxido foi analisado de acordo com a norma ISO 27107:2008 (ISO, 2008), que emprega a titulação potenciométrica com o ponto de equivalência determinado por eletroquímica. Foram pesados cerca de 2g de óleo de peixe, dissolvidos em 25mL de solução de ácido acético: isooctano (2:3, v/v); em seguida, adicionado 250 μ L de solução saturada de iodeto de potássio. Após 60 segundos de agitação, foram adicionados 12mL de água deionizada, e a mistura foi titulada com solução padronizada de tiosulfato de sódio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) 0,01M.

Esse procedimento foi realizado no equipamento Titrand 905, Metrohm, acoplado com três buretas e eletrodo de platina duplo, em procedimento automatizado. A análise do branco da amostra foi realizada do mesmo modo, mas sem a adição da amostra. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

A padronização da solução de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ foi realizada previamente usando dicromato de potássio como padrão primário, segundo metodologia oficial 942.27 da AOAC (AOAC, 2019).

O cálculo foi realizado de acordo com a equação 2 expresso em mEq O_2 / kg de óleo:

$$peróxido = \frac{(v_g - v_{branco}) \cdot c}{m} \cdot 1000 \quad (2)$$

v_g – volume (mL) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 M utilizado na titulação;

v_{branco} – volume (mL) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0,01 M utilizado na titulação da amostra branco;

c – concentração real (M) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$;

m – massa (g) da amostra.

3.2.3 Determinação de p-anisidina

As análises foram realizadas de acordo com o método AOCS Cd 18-90 (AOCS, 2017). Cerca de 200mg da amostra foram pesados e diluídos com isooctano, em balão volumétrico de 10mL. A solução foi transferida para cubeta de vidro de 2mL e medida a absorvância. Em outra cubeta, foram adicionados 2mL da mesma solução e 500µL de uma solução de p-anisidina (0,25g/100mL em ácido acético) e aguardou-se 10 minutos para ocorrer a reação; ambas as leituras espectrofotométricas foram realizadas a 350nm. O branco foi realizado pela diferença da leitura do isooctano e da reação desse solvente com a p-anisidina. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

O cálculo foi realizado segundo a equação 3 (valor adimensional) (AOCS, 2017).

1.

$$p - anisidina = \frac{10 \cdot (1,2 \cdot A_s - A_b)}{m} \quad (3)$$

A_s – diferença entre a absorvância da solução de óleo após reação e a absorvância da solução de óleo;

A_b – diferença entre a absorvância do isooctano após reação e a absorvância do isooctano;

m – massa (g) da amostra;

10 – volume (mL) do balão volumétrico.

3.2.4 Cálculo do valor total de oxidação

O valor total de oxidação (ToTox) foi calculado a partir dos valores do índice de peróxido e do valor de p-anisidina, de acordo com a equação 4 (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

$$ToTox = 2 \cdot \text{índice de peróxido} + p - anisidina \quad (4)$$

3.2.5 Determinação de ácidos graxos

3.2.5.1 Esterificação dos ácidos graxos

Para a transformação dos ácidos graxos em ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG), foi utilizado o procedimento segundo Hartman e Lago (1973) modificado por Maia e Rodrigues-Amaya (1993).

3.2.5.2 Otimização da esterificação dos ácidos graxos

O procedimento de esterificação dos ácidos graxos teve seus parâmetros otimizados: massa da amostra; tempo de agitação em vortex; volume das soluções; e aquecimento. Para isso, foi utilizado um planejamento fatorial fracionado de ordem 2^{4-1} , com quatro variáveis e dois níveis (Tabelas 12 e 13). A geratriz utilizada foi $G=1*2*3$.

Tabela 12 - Variáveis e níveis utilizados no planejamento fatorial fracionado de ordem 2^{4-1} para otimizar as condições da esterificação dos ácidos graxos em óleo de peixe

Variáveis	Níveis	
	-1	+1
Massa	30mg	100mg
Agitação em vórtex	30 s	60 s
Volume das soluções	0,2/0,25mL	4/5mL
Aquecimento	sem	com (70°C)

Fonte: Autora.

Tabela 13 - Planejamento fatorial no estudo de esterificação para obtenção dos EMAG em óleo de peixe

Ensaio	Massa	Volume das soluções	Aquecimento	Agitação em vórtex
1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	+1
3	-1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1
5	-1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1
7	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	+1

Fonte: Autora.

3.2.5.3 Análise dos ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia gasosa

As amostras metiladas foram analisadas em CG/DIC, modelo Focus GC com injetor automático Triplus, ambos da marca Thermo. Os componentes foram separados em coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária bis-cianopropil siloxana (100m, 0,25mm; 0,25µm), modelo HP-88, marca Agilent.

As condições cromatográficas foram fundamentadas em estudo de Fournier *et al.* (2007), sendo elas: temperatura do injetor: 250°C; temperatura do detector: 300°C; pressão: 200kPa, programação da temperatura no forno: 60°C por 5min; 15°C/min até 165°C (1min); 2°C/min até 225°C (17min) (FOURNIER *et al.*, 2007; AOAC, 2019). Para verificar essas condições, foi utilizada a solução padrão de EMAG com 37 componentes, para obter a separação de todos os compostos.

A quantificação dos ácidos graxos foi realizada por padronização interna, em duas condições: (1) para determinação dos valores contidos na informação nutricional (gorduras saturadas, *trans* e monoinsaturados), foram utilizados o padrão interno (PI) do EMAG C13:0 e fatores de correção teórico do detector de ionização em chama (DIC), em relação ao C16:0 (AOAC, 2019; AOCS, 2017;

IAL, 2005); (2) para a quantificação dos ácidos poli-insaturados, EPA e DHA, foram utilizados o PI do EMAG C23:0 e fatores de correção do DIC experimental, em relação ao próprio PI (AOAC, 2019; AOCS, 2017; EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2008; IAL, 2005). Nas amostras, também foi adicionado o EMAG C11:0, a fim de realizar os cálculos de recuperação dos PIs adicionados. As equações e os cálculos foram realizados de acordo com Kus; Aued-Pimentel e Mancini-Filho (2007)

3.2.5.4 Validação dos ácidos graxos

Para verificar as características de desempenho do método, foi realizada a validação de acordo com o *Guia de Validação* do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO, 2020). Foi realizada a validação para a metodologia de quantificação dos AG por padrão interno, conforme o Quadro 1. Para essa avaliação, foi utilizada uma amostra de óleo de peixe, extraída de um peixe de água doce (OP branco), e confirmado, por análise, que não continha EPA e DHA. No Quadro 1, constam os procedimentos de análise para cada parâmetro.

Quadro 1 - Procedimentos para obter os parâmetros de validação da metodologia para análise de ácidos graxos com padrão interno

Parâmetro	Padronização interna
Efeito de matriz, seletividade	- análise da amostra OP branco com adição de PI C ₂₃ nos níveis 2mg/mL, 6mg/mL e 10 mg/mL - análise com adição de PI C ₂₃ nos níveis 2mg/mL, 6mg/mL e 10mg/mL - as análises foram realizadas em triplicata
Linearidade	- preparo de curva analítica para o PI C ₂₃ nas seguintes concentrações: 1mg/mL, 3mg/mL, 5mg/mL, 7mg/mL, 9mg/mL e 11mg/mL - as análises foram realizadas em triplicata
Limite de detecção, limite de quantificação e sensibilidade	- avaliados de acordo com a curva analítica
Exatidão (recuperação)	- análise da amostra OP branco com adição de PI C ₂₃ nos níveis 2mg/mL, 6mg/mL e 10mg/mL - as análises foram realizadas em triplicata
Precisão (repetitividade e precisão intermediária)	- a análise da amostra OP 47 com adição do PI C ₂₃ - a análise da amostra OP 47 com adição do PI C ₂₃ , após dois dias da primeira análise (precisão intermediária) - análises realizadas com 7 réplicas

Fonte: Autora.

3.2.6 Identificação dos isômeros *trans* dos ácidos graxos EPA e DHA

Para a formação dos AGs *trans* do EPA e DHA, pela ação térmica, foram preparados frascos com óleo de peixe, em ambiente de nitrogênio, e lacrados, para evitar o contato com o oxigênio do ar atmosférico. Na Figura 6, pode-se

observar os frascos utilizados, e, na Tabela 14, as condições de tempo e temperaturas a que foram submetidas as amostras de óleo de peixe para gerar AGs *trans* de EPA e DHA; esses frascos foram aquecidos em forno Mufla; essas condições foram baseadas em estudos de Mjob e Solvang (2006) e Fournier *et al.* (2007). Todas as amostras foram acondicionadas em recipiente de porcelana com areia, para que ocorresse a distribuição da temperatura.

Figura 6 - Frascos com óleo de peixe, em ambiente inerte com nitrogênio, lacrados, acondicionados em cápsulas de porcelana em areia



Fonte: Autora.

Tabela 14 - Condições de tempo e temperatura a que foram submetidas as amostras de óleo de peixe para a formação de ácidos graxos *trans* de EPA e DHA

Temperatura		Tempo		
140°C	2h	4h	6h	8h
160°C	2h	4h	6h	8h
180°C	2h	4h	6h	8h
200°C	2h	4h	6h	8h
220°C	2h	4h	6h	8h
240°C	2h	4h	6h	8h

Fonte: Autora.

Após submeter um óleo de peixe às condições citadas na Tabela 14, observou-se que, em 200°C, por 6h, diminuiram os níveis de EPA e DHA e a

formação de picos cromatográficos adjacentes; possível indicativo da formação de isômeros. Desse modo, as amostras OP 48, OP 49, OP 50 e OP 51 foram submetidas a 200°C, por 6h, e, posteriormente, realizadas as análises por CG/FID e Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Na Figura 7, pode-se observar a aparência das amostras após serem submetidas ao ensaio de tempo e temperatura.

Figura 7 - Amostras OP 48, OP 49, OP 50 e OP 51 submetidas a 200°C por 6h, em forno Mufla



Fonte: Autora.

As amostras OP 48, OP 49, OP 50 e OP 51 foram esterificadas, de acordo com procedimento validado e realizadas as análises por RMN. As análises por RMN, em parceria com o Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago, da Universidade Federal do ABC (UFABC). Para tanto, os espectros de RMN foram registrados em espectrômetro Varian INOVA 500, operando na frequência de 500MHz para o núcleo de hidrogênio (^1H) e 125MHz para a frequência para núcleo de carbono (^{13}C). Os espectros foram obtidos após processamento de seus respectivos FIDS, através do *software* MNova da Mestrelab Research.

3.2.7 Estudo de estabilidade dos óleos de peixes comerciais

Para o estudo de estabilidade, foram avaliados os parâmetros de índices de acidez e peróxido; valor de p-anisidina; e quantidade de EPA e DHA. Foram estudadas quatro amostras de óleos de peixe comerciais, com características

diferentes, que refletem a amostragem do projeto, sendo elas: OP 47 - 18% de EPA e 12% de DHA; OP 48 - 33% de EPA e 22% de DHA; OP 49 - 10% de EPA e 70% de DHA; e OP 51 - 18% de EPA e 12% de DHA, com adição de vitamina E.

O estudo de estabilidade normal seria conduzido a cada 4 meses, com as análises antes citadas, nas quais se utilizam solventes e reagentes tóxicos, totalizando pelo menos quatro etapas de análise; desse modo, o volume de reagentes e insumos, tempo e quantidade de amostras, utilizado nesse modelo, seria alto; portanto, visando à diminuição desses quantitativos e do impacto ambiental, foi proposto um estudo de estabilidade acelerado, com variações de tempo e temperatura, fundamentado na Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 318/2019 (BRASIL, 2019), e utilizando quatro amostras, com concentrações diferentes de EPA e DHA, pois refletem a amostragem do estudo. Desse modo, na Tabela 15 constam as condições da estabilidade acelerada e sua correspondência em termos de tempo *real*.

Tabela 15 - Condições de tempo e temperatura para estudo de estabilidade acelerada

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (dias)	Vida de prateleira
1	30	1	1 dia
2	70	4	30 dias
4	80	8	60 dias
5	75	6	128 dias
6	100	4	512 dias

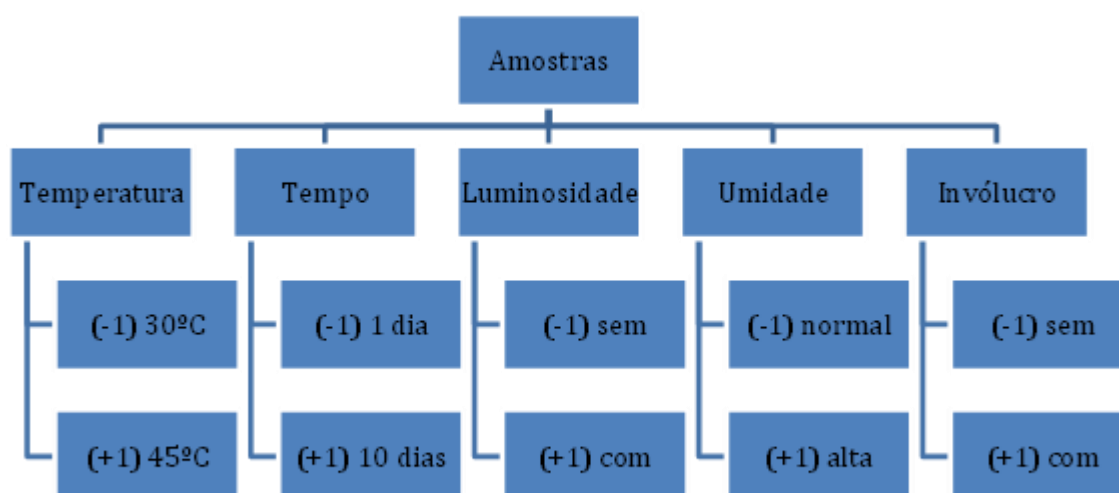
Fonte: Autora.

3.2.8 Estudo das variáveis no processo de oxidação nos óleos de peixe encapsulados

Para avaliar as variáveis envolvidas na oxidação, foram utilizadas quatro amostras com características diferentes, que refletem a amostragem do projeto. Sendo elas: OP47 - 18% de EPA e 12% de DHA; OP 48 - 33% de EPA e 22% de DHA; OP 49 - 10% de EPA e 70% de DHA; e OP 51 - 18% de EPA e 12% de DHA, com adição de vitamina E. Para esse estudo, foi realizado um

planejamento fatorial fracionado de ordem 2^{5-2} . As condições utilizadas encontram-se na Figura 8 e o planejamento fatorial fracionado na Tabela 16. Para essa avaliação, foram realizadas as análises de índice de peróxido, p-anisidina e concentração de EPA e DHA. A umidade foi monitorada com uso de sensor de umidade e temperatura dentro da estufa, acoplado termo-higrômetro.

Figura 8 - Planejamento do estudo das variáveis de oxidação



Fonte: Autora.

Tabela 16 - Planejamento fatorial fracionado de ordem 2^{5-2} para estudo das condições que afetam a oxidação dos óleos de peixe encapsulados

Ensaio	Temperatura	Tempo	Luminosidade	Umidade	Invólucro
1	-1	-1	-1	+1	+1
2	+1	-1	-1	-1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1
4	+1	+1	-1	+1	-1
5	-1	-1	+1	+1	-1
6	+1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1
8	+1	+1	+1	+1	+1

Fonte: Autora.

3.2.9 Análise Estatística

As análises estatísticas realizadas no projeto foram feitas no *Software* Microsoft Excel e no Statistica versão 13.0, Tibco.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 OTIMIZAÇÃO DA METODOLOGIA DE ESTERIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

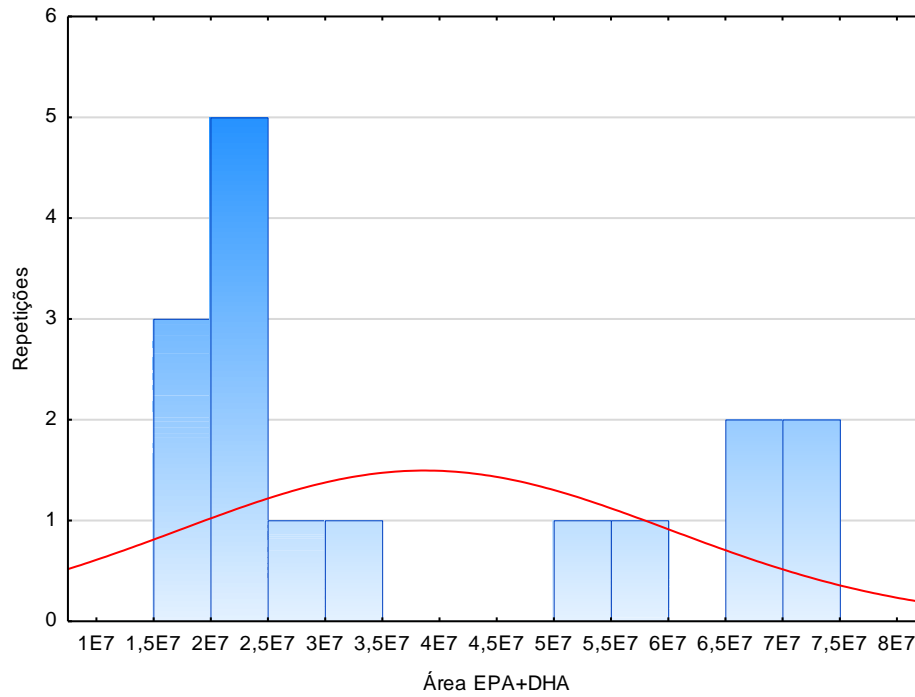
Maia e Amaya-Rodrigues (1993) demonstraram a aplicabilidade do método de Hartman e Lago (1973) para lipídios de peixes, e obtiveram bons resultados, tanto para os lipídios totais, como para os lipídios neutros e os fosfolipídios; desse modo, foi o método escolhido para a otimização da esterificação dos AGs.

A otimização dos parâmetros envolvidos na etapa de transesterificação foi realizada por planejamento fatorial, de acordo com a Tabela 13. Para análise dos parâmetros envolvidos no planejamento fatorial, foi utilizado o *software* estatístico Statistica. As variáveis aleatórias utilizadas foram: massa (massa de amostra); agitação (tempo de agitação no Vórtex); soluções (volume das soluções utilizadas na esterificação); e tempo no banho de aquecimento; e a variável dependente da soma das áreas de EPA e DHA.

A escolha das variáveis e seus níveis foi de acordo com a sua influência na reação de esterificação. Para essa otimização, foi utilizada uma amostra de óleo de peixe encapsulado encontrado no comércio da cidade de São Paulo. Os dados obtidos das análises apresentaram uma distribuição normal, como se observa no histograma (Fig. 9); o modelo gerado teve ajuste satisfatório, com $R^2=0,99263$; $R_{ajustado}=0,98618$; os resíduos demonstraram comportamento aleatório e a qualidade do modelo foi avaliada por ANOVA, revelando regressão significativa.

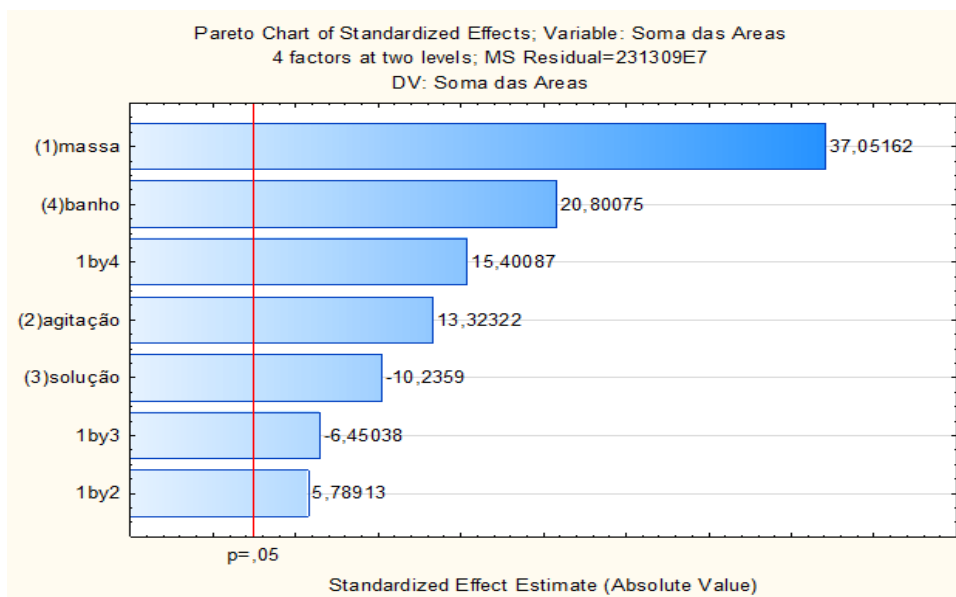
Portanto, de acordo com o modelo, todas as variáveis avaliadas foram significativas, ou seja, apresentaram interferência no resultado da análise, bem como a interação entre massa e agitação; massa e solução; e massa e aquecimento. Na Figura 10, indica-se o gráfico de Pareto com as variáveis e seus efeitos. Dessa maneira, as melhores condições para a reação de esterificação em óleo de peixe encapsulado foram: massa: cerca de 100mg; soluções: 200 μ L de NaOH metanólico 0,5N e 250 μ L de solução esterificante; agitação: 1 minuto em vórtex; banho: com aquecimento a 70°C.

Figura 9 - Histograma das áreas do EPA e DHA geradas no planejamento fatorial



Fonte: *Software* Statistica.

Figura 10 - Gráfico de Pareto representando as variáveis que foram otimizadas na metodologia de esterificação dos ácidos graxos



Fonte: *Software* Statistica. $p > 0,05$ indica que as variáveis foram significativas.

A reação de esterificação ocorre entre um ácido carboxílico (no nosso caso, os AGs provenientes do óleo de peixe) e um álcool (metanol); essa reação é lenta, por isso é necessário usar excesso do álcool, ou retirar a água formada no sistema; o aumento de temperatura e um catalisador podem acelerar a sua velocidade (NaOH) (BRUICE, 2006; SOLOMONS; FRYHLE; SNYDER, 2018).

De acordo com o método proposto por Maia e Amaya-Rodrigues (1993), das variáveis otimizadas em nosso trabalho, apenas duas revelaram valores diferentes do método preconizado; foram elas: o tempo de agitação - em nosso estudo, um tempo maior de agitação (1min) demonstrou maiores valores de EPA e DHA; o aumento na agitação, faz com que as moléculas se movimentem mais rapidamente, aumentando a probabilidade de colidirem de forma efetiva e com maior frequência, refletindo no aumento da velocidade de reação e formação, nesse caso, dos EMAG (BRUICE, 2006); e volume dos reagentes: uma quantidade menor de reagentes demonstrou valores maiores na formação de EMAG, de EPA, e DHA.

No método, Maia e Amaya-Rodrigues (1993) utilizam 4mL de solução de hidróxido de sódio e 5mL de solução esterificante (cloreto de amônio, ácido sulfúrico e metanol), e, em nosso trabalho, o volume ideal foi de 200 μ L para a solução de hidróxido de sódio e 250 μ L para a solução esterificante. No método de preparação de EMAG da IUPAC 2.301 (IUPAC 1987), são utilizados 200 μ L de hidróxido de potássio para a esterificação dos óleos, com bons valores de recuperação, entretanto a recomendação são para óleos com altos conteúdos de triacilglicerídeos.

Como citado por Bruice (2006), a esterificação deve ocorrer com excesso de álcool e, como a massa inicial foi de 100mg, possivelmente, a adição de 200 μ L e 250 μ L das soluções, aliadas a um maior tempo de agitação e à temperatura do banho de aquecimento, foram suficientes para a completa reação dos AGs em EMAGs. Para verificar se a esterificação estava completa, foi analisada uma amostra de referência do FAPAS de óleo de peixe e realizada a análise por RMN das amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51.

Os valores previstos para os AGs da amostra do FAPAS, e os analisados pelo método de Maia e Amaya-Rodrigues (1993), otimizado em nosso estudo, encontram-se na Tabela 17. Na Figura 11, observa-se o cromatograma da amostra de referência de óleo de peixe do FAPAS.

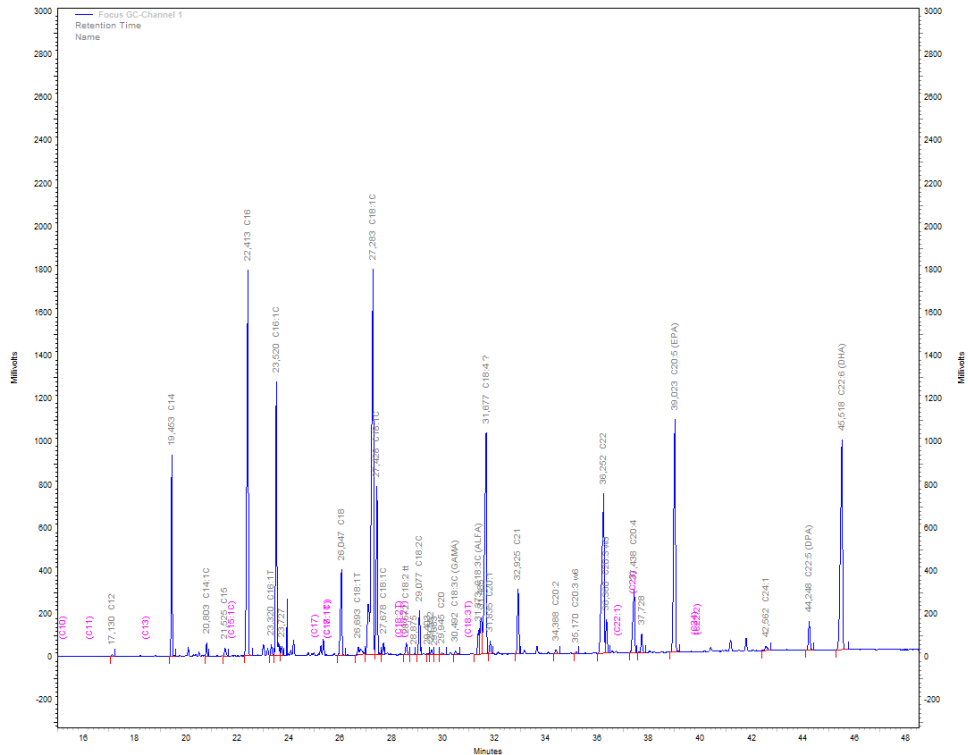
Tabela 17 - Valores de ácidos graxos (em g/100g) analisados pelo método de Maia e Amaya-Rodrigues (1993) otimizado para a amostra de referência da FAPAS® de óleo de peixe

Ácido graxo	FAPAS (Valor designado)	FAPAS (faixa)	Análise (média ± desvio-padrão)
C 16:1 n7	7,26	6,53 - 7,98	7,24 ± 0,09
C 18:1 n9	15,5	13,95 - 17,05	14,44 ± 0,45
C 18:1 n7	4,62	3,88 - 5,36	3,94 ± 0,03
C 18:2 n6	1,42	1,19 - 1,64	1,19 ± 0,01
C 18:3 n3	0,71	0,639 - 0,781	0,73 ± 0,02
C 20:3 n3	0,172	0,059 - 0,286	0,16 ± 0,01
C 20:4 n6	0,378	0,294 - 0,461	0,30 ± 0,01
C 20:5 n3	8,54	7,68 - 9,39	8,63 ± 0,10
C 22:5 n3	1,12	1,01 - 1,23	1,14 ± 0,01
C 22:6 n3	9,95	8,96 - 10,95	9,89 ± 0,11
SOMA n3	23,03	17,87 - 28,19	20,85
SOMA n9	26,7	21,36 - 32,04	21,95

Fonte: Autora; média de sete repetições.

De acordo com a Tabela 17, verificamos que todos os AGs analisados na amostra de referência do FAPAS estão dentro da faixa dos valores designados, com destaque para os AGs EPA, DHA e DPA, que tiveram os valores médios de 8,63 g/100g; 9,89 g/100g; 1,14 g/100g, respectivamente, bem próximos ao valor designado, comprovando, desse modo, que o método otimizado pode ser aplicado para a matriz de óleo de peixe.

Figura 11 - Cromatograma da amostra de referência de óleo de peixe do FAPAS, analisado pelo método de Maia e Amaya-Rodrigues (1993) otimizado, com condições cromatográficas, segundo Fournier *et al.* (2007)



Fonte: *Software ChromQuest.*

Nas Figuras 12 a 15, observam-se os espectros de RMN de ^1H , respectivamente, para as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51. Essas amostras contêm concentrações diferentes de EPA e DHA, e, assim, tornam possível avaliar a esterificação para diferentes amostras.

Figura 12 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H para as amostras OP 47

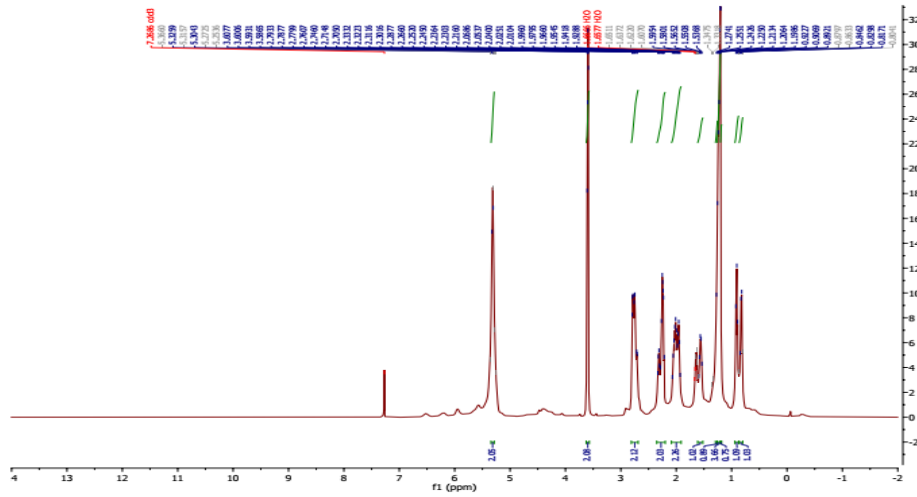
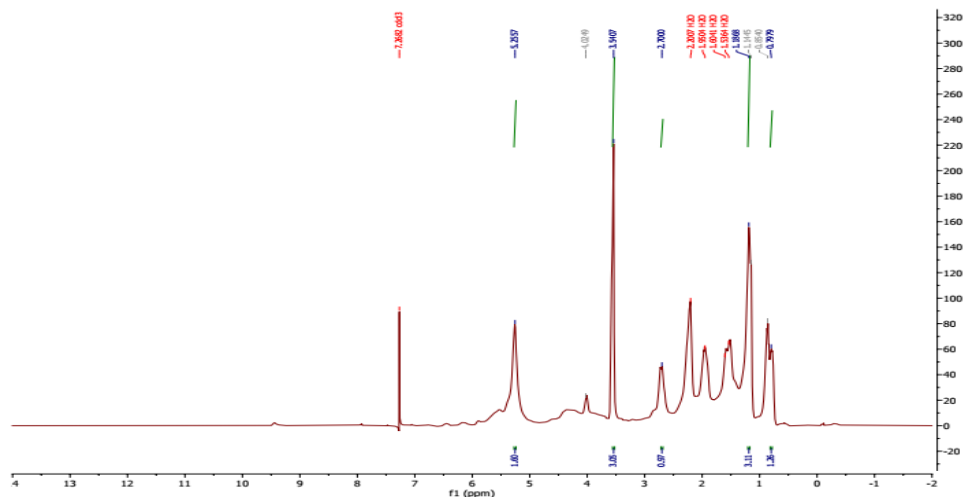
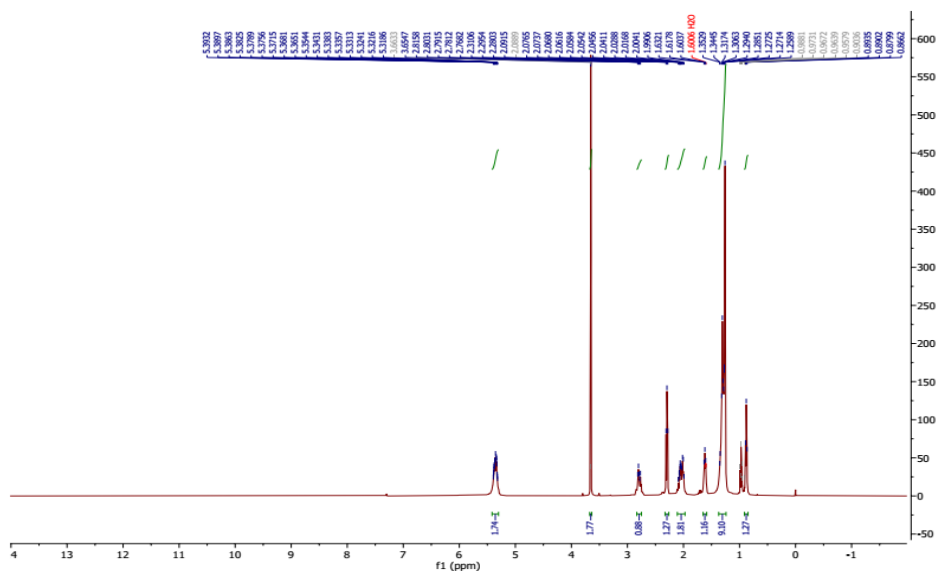


Figura 14 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H para as amostras OP 49



Fonte: Software MNova.

Figura 15 - Espectro de ressonância magnética nuclear de 1H para as amostras OP 51

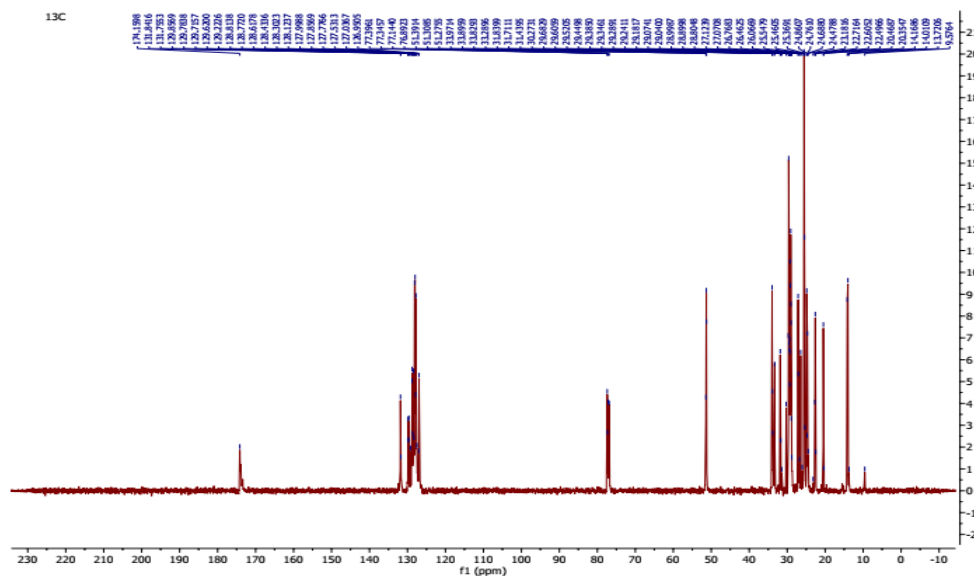


Fonte: Software MNova.

De acordo com Silverstein *et al.* (2019), em um espectro de RMN de ^1H , o deslocamento químico, $\delta = 3,6$ é característico de uma ligação de éster metílico, e pode ser observado um sinal representativo nas Figuras 12 a 15. Outra observação importante é a ausência de comportamento de deslocamento característico do grupo

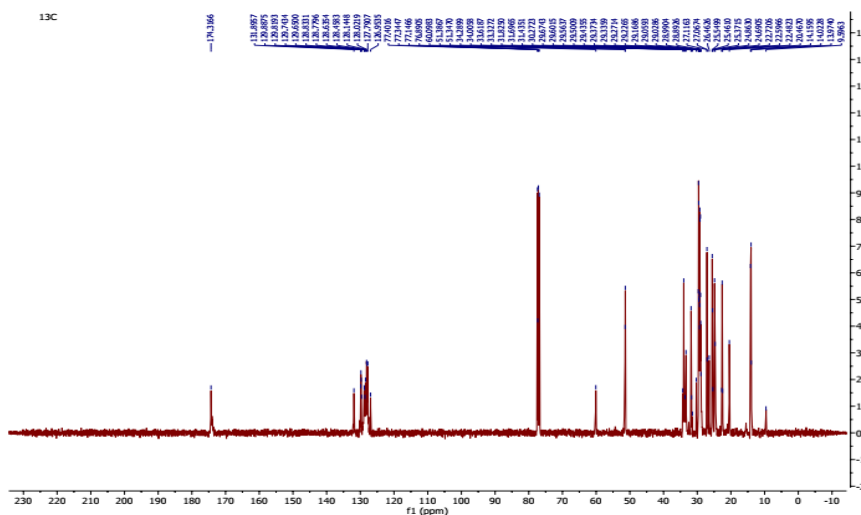
triacilglicerídeo, segundo Guillén *et al.* (2008). Para confirmar a esterificação completa nos óleos de peixe, pode-se observar os espectros de ^{13}C nas Figuras 16 a 19, respectivamente, para as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51.

Figura 16 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para as amostras OP 47



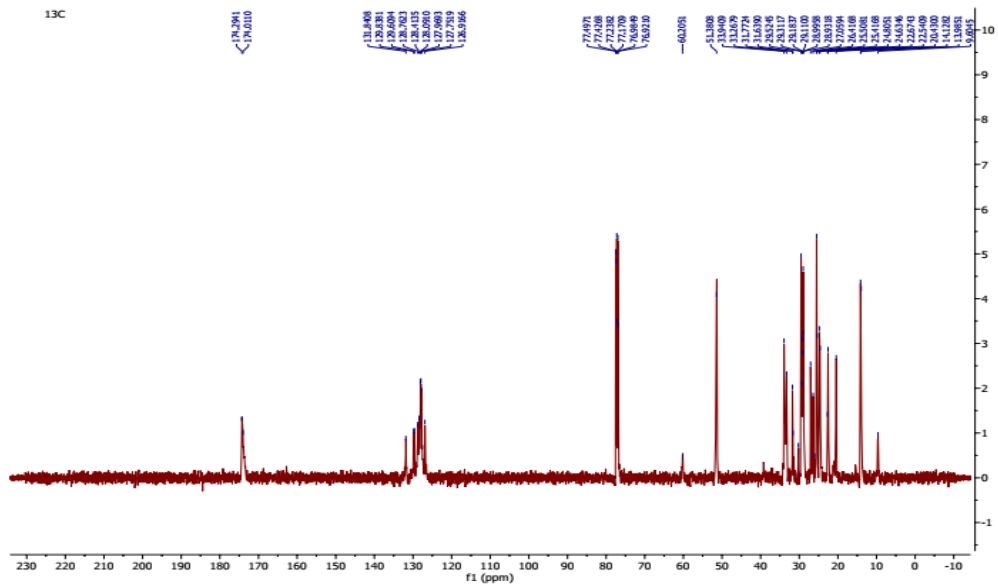
Fonte: Software MNova.

Figura 17 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para as amostras OP 48



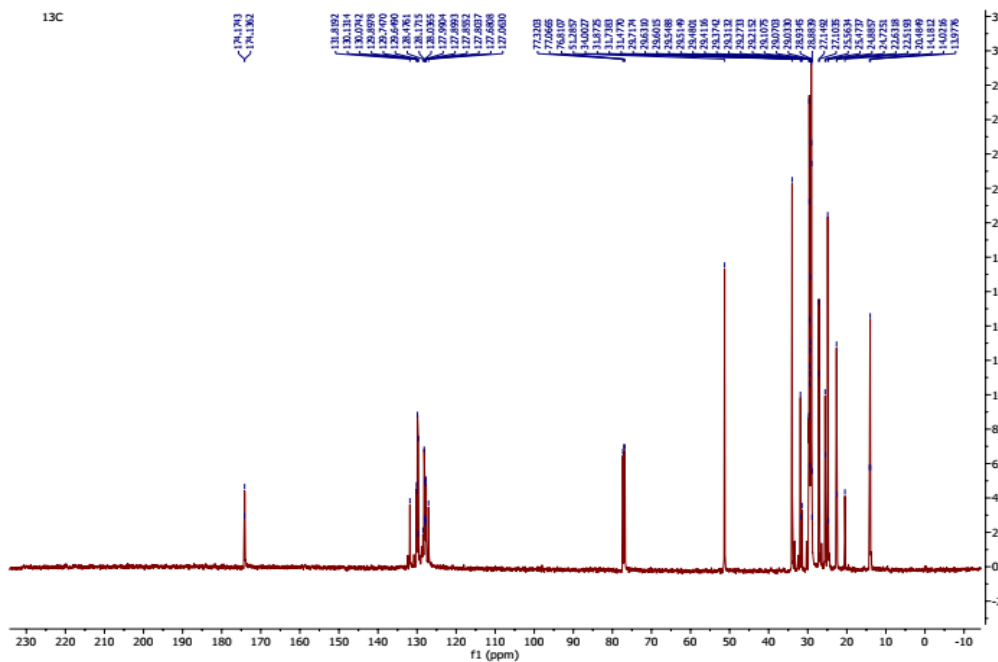
Fonte: Software MNova.

Figura 18 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para as amostras OP 49



Fonte: Software MNova.

Figura 19 - Espectro de ressonância magnética nuclear de ^{13}C para as amostras OP 51



Fonte: Software MNova

Nos espectros de RMN do ^{13}C , o deslocamento químico $\delta = 51$ é característico de uma ligação de éster metílico, e pode ser verificado nas Figuras 16 a 19; e, na

região $\delta = 172 - 174$, característica de triacilglicerídeo, não são observados sinais (AURSAND; STANDAL; AXELSON, 2007).

Portanto, de acordo com os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , para as diferentes concentrações de óleos de peixe (OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51), houve a reação completa de esterificação dos componentes lipídios dessas amostras para EMAG. Essas observações, aliadas aos valores de AGs determinados na amostra de óleo de peixe do FAPAS, demonstram que o método de esterificação otimizado neste estudo é apropriado para a análise de AGs em óleo de peixe, nas concentrações de 18% EPA e 12% DHA; 33% EPA e 22% DHA; e 10% EPA e 70% DHA.

4.2 VALIDAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS GRAXOS

Os parâmetros de validação foram realizados de acordo com o Quadro 1, e os resultados dos parâmetros analisados encontram-se nas Tabelas 18, 19 e 20.

A seletividade e o efeito de matriz foram verificados para as concentrações de 2,18mg/mL; 6,50mg/mL e 10,82mg/mL para o EPA e 1,99mg/mL; 5,97mg/mL e 9,96mg/mL para o DHA. Os valores calculados para o teste F e para o teste t revelam que não há interferência de matriz (Tabela 18), dessa maneira, indica que a linearidade pode ser estudada com a curva preparada no solvente.

Tabela 18 - Valores calculados para o teste F e teste t, em relação às análises realizadas com adição de padrão no solvente e na amostra

	Concentração (mg/mL)	teste F	teste t ($\alpha=0,05$)
EPA	2,18	0,78259	0,35147
	6,50	0,71890	0,21391
	10,82	0,55004	0,71462
DHA	1,99	0,24199	0,99257
	5,97	0,28939	0,24745
	9,96	0,26107	0,53784

Fonte: Autora.

Na avaliação da linearidade, foi observado que não houve dados aberrantes pelo teste de Grubbs, e os dados foram homocedásticos (INMETRO, 2020). Os

resíduos das curvas analíticas foram verificados e demonstraram comportamento aleatório. Também foi avaliada a linearidade das curvas analíticas pela análise da variância da regressão e teste F, sendo estas consideradas lineares, dados de acordo com a literatura (INMETRO, 2020; RIBEIRO et al., 2008).

Os dados da curva analítica, limite de detecção (LD), de quantificação (LQ) e resultado de recuperação, constam na Tabela 19. O valor de r^2 revelou um bom ajuste dos dados ao modelo linear. Os resultados de recuperação estão na faixa preconizada pelo *Guia de Validação* do Inmetro (INMETRO, 2020), ou seja, entre 98% e 102%, considerando que os valores de EPA e DHA estão numa proporção de 10% na curva analítica.

Na Tabela 17, podem ser observados os valores de EPA e DHA para a amostra de referência de óleo de peixe do FAPAS, e esses estão dentro da faixa aceitável pelo fabricante do material de referência, enquanto o erro relativo calculado para o EPA e o DHA foram de 1,09% e -0,65%, respectivamente, demonstrando ótimos resultados.

Tabela 19 - Parâmetros de validação dos métodos de cálculo utilizados

	Padrão interno
Curva analítica	$1,06 \cdot 10^7 x + 4,05 \cdot 10^6$
r^2	0,9999
LD (95%)	0,24mg/mL
LQ (95%)	0,35mg/mL
Recuperação (média)	100,52%

Fonte: Autora. LD: limite de detecção, LQ: limite de quantificação, EPA: ácido eicosapentaenóico; DHA: ácido docosahexaenóico.

Os cálculos referentes à precisão (repetitividade e precisão intermediária) foram calculados pela adição do padrão interno C23. Na Tabela 20, podem ser observados os dados dos desvios-padrão relativos (DPR) para EPA e DHA. Os valores de DPR para o cálculo com padrão interno revelam que são apropriados e estão de acordo com o limite de repetitividade de 1,9% para uma faixa de 10% do analito, segundo o Inmetro (INMETRO, 2020). A amostra de referência de óleo de peixe do FAPAS revelou um DPR, para EPA e DHA, de 1,14% e 1,13%, respectivamente, corroborando com o estudo da precisão. Desse modo, o método

otimizado está de acordo com os preceitos preconizados pelo *Guia de Validação* do Inmetro e pode ser utilizado para análise de EPA e DHA em óleo de peixe.

Tabela 20 – Desvio-padrão relativo de EPA e DHA nos ensaios de precisão e precisão intermediária.

Repetitividade		Precisão intermediária	
EPA (%)	DHA (%)	EPA (%)	DHA (%)
1,58	1,44	0,65	0,94

Fonte: Autora.

4.3 AVALIAÇÃO DO MÉTODO POTENCIOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ACIDEZ E PERÓXIDO

Para avaliar o método potenciométrico para determinação de acidez e peróxido nos óleos de peixe, foram realizadas análises, em quintuplicata, em quatro amostras de referência do Conselho Oleícola Internacional (COI), de azeite de oliva (Tabela 11), para a determinação de acidez e, em duas amostras, para a determinação de peróxido, uma vez que não tínhamos disponível uma amostra de referência para óleo de peixe. A análise de peróxido foi realizada na amostra COI 2019, entretanto, os valores determinados estavam em desacordo com a faixa aceitável, devido a perdas durante o armazenamento.

Para avaliar o método utilizado para a determinação de acidez e peróxido, foi calculado o z-score, segundo o relatório do COI (COI, 2021):

$$z - score = \frac{V_L - V_a}{s} \quad (5)$$

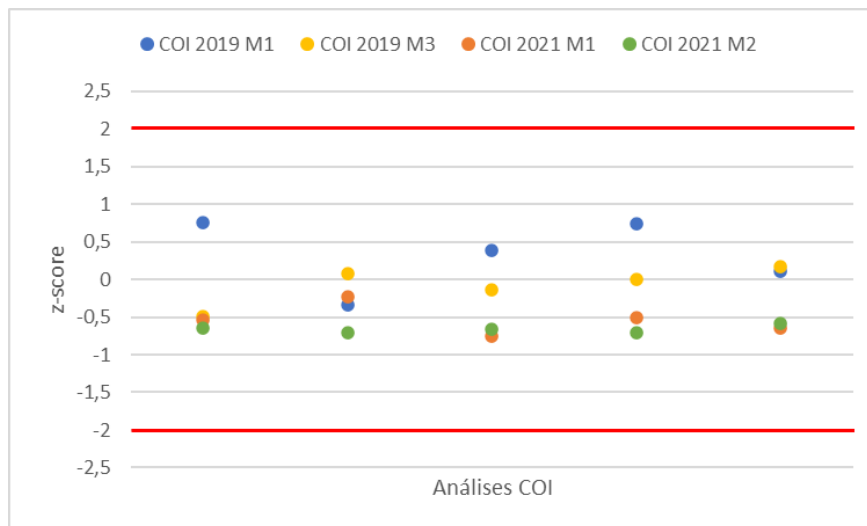
V_L – valor analisado pelo laboratório;

V_a – valor de consenso;

s – desvio-padrão do interlaboratorial.

Na Figura 20, podemos observar os valores calculados de z-score para a determinação potenciométrica de acidez nas amostras COI 2019 M1 e M3 e COI 2021 M1 e M2.

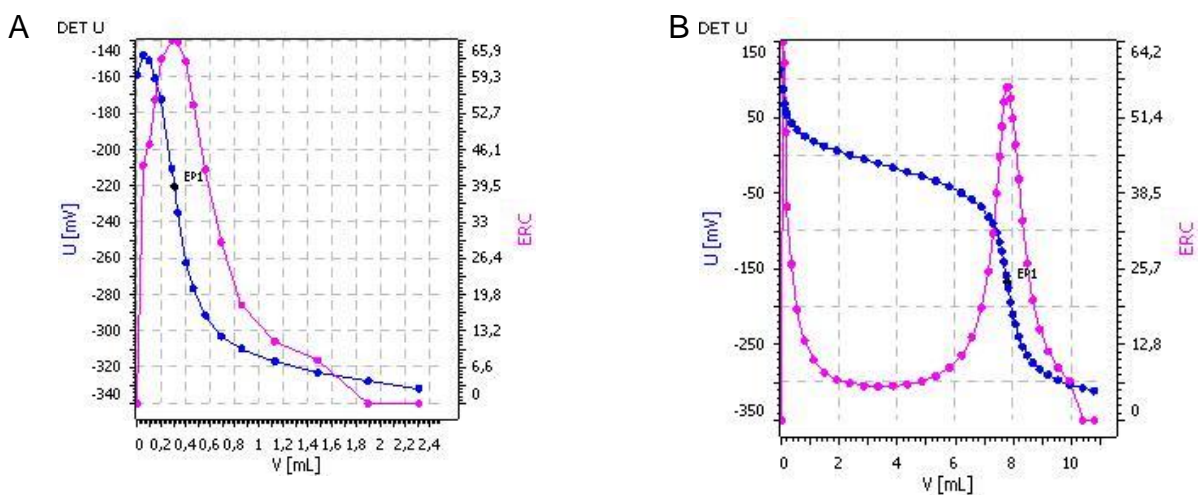
Figura 20 - Valores de z-score de acidez determinados para as amostras de referência do COI



Fonte: Autora.

Os valores de z-score calculados para a acidez permearam entre -2 a 2, demonstrando um desempenho satisfatório do método utilizado (COI, 2021). Na Figura 21, observa-se a curva de titulação para a determinação da acidez potenciométrica para a amostra do COI.

Figura 21 - Curva de titulação potenciométrica da análise de acidez, determinada pelo Titrande 905

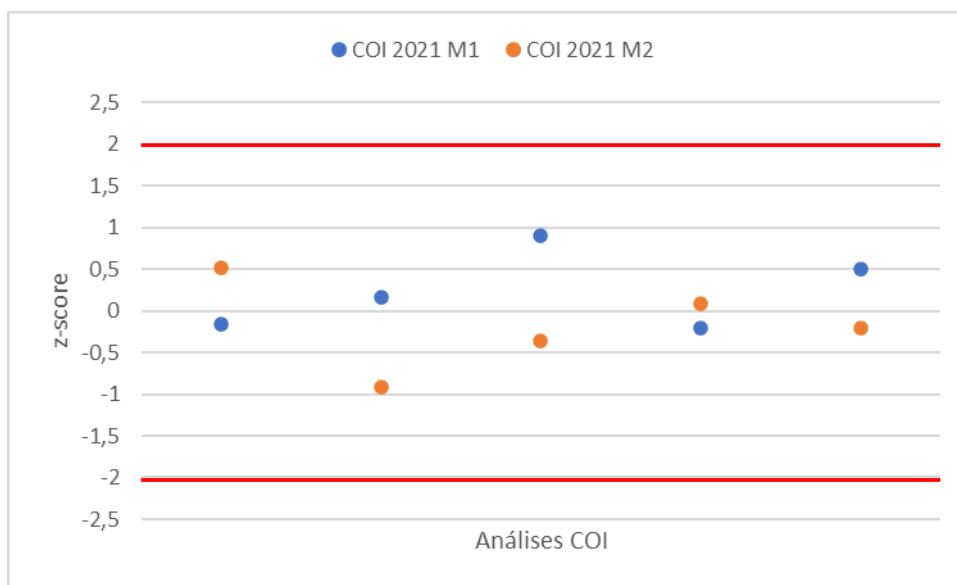


Fonte: Software Ti amo. A: Curva do branco e B: Amostra do COI 2021. Curva azul: Curva da titulação; curva lilás: 1ª derivada da curva de titulação; EP: ponto de equivalência.

A curva de titulação (azul) demonstra um bom desempenho do método; pode-se verificar o seu formato típico, bem como o ponto de equivalência determinado pela segunda derivada (curva lilás/rosa), na região de equivalência (EP) da reação de ácido-base (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009). Na Figura 21A, verifica-se a titulação do branco, ou seja, do solvente (éter etílico e álcool etílico), utilizado para análise. A análise do branco foi realizada a cada dia de análise ou a cada novo preparo da solução dos solventes.

Na Figura 22, verificam-se os valores calculados para o z-score para a análise de peróxido nas amostras do COI 2021. Os valores estavam dentro da faixa de -2 a 2, portanto, o método foi considerado satisfatório (COI, 2021).

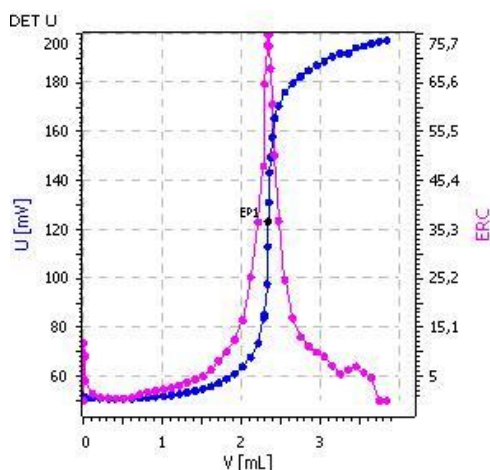
Figura 22 - Valores de z-score de peróxido determinado para as amostras de referência do COI



Fonte: Autora.

Na Figura 23, verificar-se a curva de titulação de oxi-redução (curva azul) para a amostra do COI, revelando um comportamento típico e o ponto de equivalência (EP) na região de equilíbrio determinado pela 2ª derivada da curva de titulação (curva lilás/rosa). A determinação do branco foi realizada, entretanto, não foi calculado o ponto de equivalência, uma vez que a solução teve seu ponto de viragem na primeira gota.

Figura 23 - Curva de titulação potenciométrica da análise de peróxido, determinada pelo Titrando 905



Fonte: *Software* Ti amo. Curva azul: Curva da titulação; curva lilás: 1ª derivada da curva de titulação; EP: ponto de equivalência.

Portanto, de acordo com os valores de z-score para a acidez e o peróxido e as curvas de titulações, avaliou-se que o método potenciométrico foi adequado para as análises em óleo, e, nesse caso, em óleo de peixe.

4.4 RESULTADOS DAS AMOSTRAS DE ÓLEO DE PEIXE COMERCIAL

4.4.1 Parâmetros analisados de acordo com o Codex Alimentarius

Vários compostos ácidos são amplamente distribuídos nos alimentos e desempenham importante papel, pois afetam as propriedades organolépticas (aroma, cor e sabor), estabilidade e controle microbiológico dos produtos alimentícios. Como tal, estão bem estabelecidos como marcadores químicos de qualidade, maturação, autenticidade e, às vezes, usados como características distinguíveis da origem geográfica dos alimentos. O teor de ácido total em alimentos é chamado de acidez titulável.

No caso de óleos e gorduras, o conteúdo total de ácidos graxos livres, chamados de valores de ácidos, são usados como um marcador de qualidade, pois gorduras e óleos tendem a se decompor lentamente, ao serem armazenados em contato com a atmosfera e a liberar seus constituintes dos ácidos graxos, resultando na diminuição de sua qualidade. Dessa forma, o valor do ácido é considerado um parâmetro-chave usado rotineiramente para classificar e avaliar a qualidade, o frescor e valor econômico do produto comercial final (Kotani *et al.*, 2020).

Na Tabela 21, podem ser verificados os valores para o índice de acidez, de peróxido, de p-anisidina e valor de ToTox determinados nas amostras de óleo de peixe encapsulado.

Tabela 21 - Valores de índice de acidez, índice de peróxido, p-anisidina e ToTox determinados nas amostras de óleo de peixe encapsulados comerciais

Amostras	Acidez (mg KOH/g)	Peróxido (mEq O ₂ /Kg)	p-anisidina	ToTox
OP 1	0,2704 ± 0,0156	18,47 ± 0,27	21,55 ± 0,30	58,48 ± 0,53
OP 2	0,2661 ± 0,0027	10,55 ± 0,48	25,54 ± 0,82	46,64 ± 1,51
OP 3	0,8589 ± 0,0052	6,11 ± 0,25	5,55 ± 0,44	17,76 ± 0,10
OP 4	0,2075 ± 0,0025	15,59 ± 0,13	19,20 ± 1,06	50,37 ± 1,06
OP 5	0,0936 ± 0,0019	12,02 ± 0,54	13,73 ± 0,28	37,78 ± 1,32
OP 6	0,2374 ± 0,0026	22,05 ± 0,69	31,89 ± 0,59	75,99 ± 1,13
OP 7	0,3467 ± 0,0026	41,54 ± 0,64	40,66 ± 0,84	123,73 ± 1,09
OP 8	0,3143 ± 0,0020	3,80 ± 0,11	25,08 ± 0,84	32,68 ± 1,06
OP 9	0,2975 ± 0,0052	9,89 ± 0,53	15,90 ± 0,82	35,68 ± 0,84
OP 10	0,2545 ± 0,0015	23,63 ± 0,28	27,51 ± 0,65	74,77 ± 0,17
OP 11	0,2277 ± 0,0038	12,13 ± 0,12	16,11 ± 0,47	40,38 ± 0,64
OP 12	0,2135 ± 0,0038	12,18 ± 0,12	17,27 ± 0,25	41,64 ± 0,30
OP 13	0,1203 ± 0,0019	6,72 ± 0,17	10,36 ± 0,23	23,81 ± 0,32
OP 14	0,5916 ± 0,0100	8,44 ± 0,40	2,33 ± 0,33	19,22 ± 0,72
OP 15	0,0760 ± 0,0017	13,20 ± 0,24	12,04 ± 0,16	38,44 ± 0,50
OP 16	0,0873 ± 0,0095	8,82 ± 0,44	8,69 ± 0,29	26,33 ± 0,90
OP 17	0,3023 ± 0,0031	3,90 ± 0,11	12,34 ± 0,47	20,13 ± 0,57
OP 18	0,1021 ± 0,0024	25,43 ± 1,08	25,20 ± 0,54	76,06 ± 2,50
OP 19	0,1120 ± 0,0085	3,50 ± 0,14	8,10 ± 0,54	15,10 ± 0,28
OP 20	0,3760 ± 0,0070	9,70 ± 0,32	16,28 ± 0,39	35,68 ± 0,97
OP 21	0,1557 ± 0,0039	7,64 ± 0,46	11,71 ± 0,25	26,99 ± 0,90
OP 22	0,6673 ± 0,0065	29,90 ± 0,25	4,48 ± 0,45	64,28 ± 0,90
OP 23	0,1331 ± 0,0015	24,50 ± 0,47	18,44 ± 0,32	67,43 ± 0,62
OP 24	0,3136 ± 0,0015	11,46 ± 0,26	17,73 ± 0,21	40,65 ± 0,70
OP 25	0,0699 ± 0,0008	12,01 ± 0,07	12,38 ± 0,37	36,39 ± 0,44
OP 26	0,0722 ± 0,0055	6,63 ± 0,13	13,51 ± 0,17	26,77 ± 0,19
OP 27	0,1918 ± 0,0037	7,19 ± 0,24	10,33 ± 0,12	24,72 ± 0,58
OP 28	0,1156 ± 0,0034	11,83 ± 0,35	13,67 ± 0,20	37,33 ± 0,87
OP 29	0,4598 ± 0,0020	3,94 ± 0,12	6,66 ± 0,29	14,54 ± 0,22
OP 30	0,0310 ± 0,0011	7,43 ± 0,34	9,23 ± 0,23	24,09 ± 0,74
OP 31	0,1043 ± 0,0024	6,79 ± 0,08	10,73 ± 0,72	24,32 ± 0,87
OP 32	0,2404 ± 0,0027	10,87 ± 0,04	14,69 ± 0,19	36,42 ± 0,23
OP 33	0,1311 ± 0,0024	19,99 ± 0,26	16,34 ± 1,10	56,32 ± 1,44
OP 34	0,0763 ± 0,0016	34,52 ± 2,08	22,28 ± 0,45	91,32 ± 4,15
OP 35	0,0720 ± 0,0014	19,60 ± 0,20	22,35 ± 0,57	61,56 ± 0,24
OP 36	0,4519 ± 0,0028	5,21 ± 0,17	11,45 ± 0,70	21,87 ± 1,04
OP 37	0,2559 ± 0,0015	17,26 ± 0,13	21,51 ± 0,11	56,03 ± 0,15
OP 38	0,1195 ± 0,0047	12,73 ± 0,61	11,38 ± 0,59	36,84 ± 1,47
OP 39	0,1202 ± 0,0021	23,61 ± 0,24	18,01 ± 0,73	65,23 ± 0,48

continua

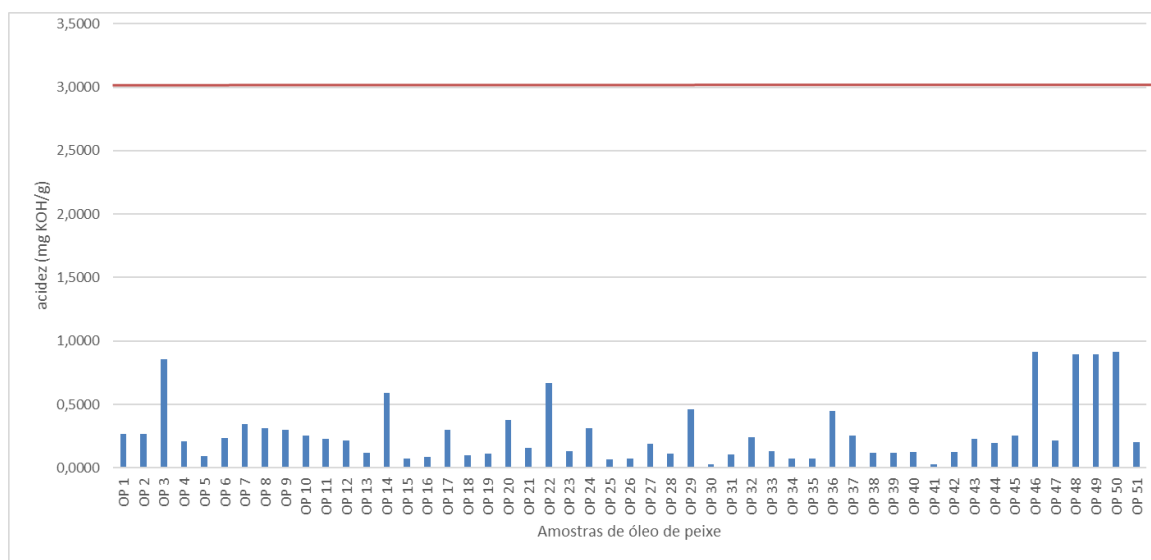
Tabela 21 (conclusão)

Amostras	Acidez (mg KOH/g)	Peróxido (mEq O ₂ /Kg)	p-anisidina	ToTox
OP 40	0,1254 ± 0,0020	11,95 ± 0,19	13,23 ± 0,13	37,13 ± 0,35
OP 41	0,0297 ± 0,0012	3,13 ± 0,08	9,70 ± 0,33	15,96 ± 0,38
OP 42	0,1270 ± 0,0032	18,83 ± 0,52	26,89 ± 0,34	64,55 ± 0,92
OP 43	0,2316 ± 0,0014	5,35 ± 0,22	12,36 ± 0,04	23,07 ± 0,40
OP 44	0,1974 ± 0,0015	15,64 ± 0,21	13,46 ± 0,11	44,74 ± 0,53
OP 45	0,2561 ± 0,0053	10,00 ± 0,04	5,81 ± 0,20	25,80 ± 0,16
OP 46	0,9154 ± 0,0039	13,85 ± 0,41	12,53 ± 0,63	40,23 ± 1,19
OP 47	0,2145 ± 0,0048	5,40 ± 0,02	13,71 ± 0,13	24,51 ± 0,14
OP 48	0,8925 ± 0,0050	14,48 ± 0,09	12,21 ± 0,15	41,17 ± 0,48
OP 49	0,8950 ± 0,0045	6,77 ± 0,05	14,17 ± 0,08	27,71 ± 0,12
OP 50	0,9125 ± 0,0032	11,45 ± 0,10	12,14 ± 0,10	35,04 ± 0,25
OP 51	0,2050 ± 0,0035	9,92 ± 0,08	20,90 ± 0,21	40,74 ± 0,38
Média	0,2772	13,09	15,48	41,66
Mínimo	0,0297	3,13	2,33	14,54
Máximo	0,9154	41,54	40,66	123,73
Desvio-padrão	0,2439	8,20	7,29	21,67
IC (95%)	0,2040 - 0,3032	6,86 - 10,19	6,10 - 9,06	18,13 - 26,93

Fonte: Autora. Resultados expressos como média ± desvio-padrão (triplicata), IC: Intervalo de confiança com 95%.

O valor de acidez nas amostras de óleo de peixe teve com média 0,2772mg KOH/g, variando de 0,0297 a 0,9154mg KOH/g, e todas as amostras tiveram valores dentro do limite de 3mg KOH/g estabelecido pelo Codex Alimentarius Stan 329-2017 (CODEX ALIMENTARIUS, 2021), como pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 - Valores do índice de acidez para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. — representa o limite de acidez



Fonte: Autora.

Há poucos trabalhos relatando valores de acidez em óleo de peixe, Lee *et al.* (2016) analisaram 24 amostras de óleo de peixe; na Coreia do Sul, a média foi de 0,63mg KOH/g, com uma variação de 0,11mg a 1,44mg KOH/g; valores esses similares ao do observado em nosso estudo, que teve variação de 0,0297mg a 0,9154 mg KOH/g. Já Ozyurt *et al.* (2022), em 20 amostras de óleo de peixe, observaram que em quatro amostras os valores foram acima do limite de 3mg KOH/g.

Em nosso estudo, as amostras OP 3 - 0,86mg KOH/g; OP 46 - 0,91mg KOH/g; OP 48 - 0,89mg KOH/g; OP 49 - 0,89mg KOH/g e OP 50 - 0,91mg KOH/g revelaram os maiores valores de acidez, e são as amostras com maior quantidade de EPA e DHA, uma vez que o valor de acidez indica o nível de ácidos graxos livres como resultado da atividade da lipase no óleo (LEE *et al.*, 2019).

Valores altos de acidez em óleo de peixe é uma indicação de que o óleo foi exposto à água, a ácidos ou enzimas, ou foi armazenado durante um longo período de tempo, o que pode afetar a sua qualidade, reduzindo seus valores energético e nutricional. Além disso, ácidos graxos livres no óleo aumentam a possibilidade de hidrólise na umidade, durante armazenamento e processamento (MATA *et al.*, 2020). Óleos de peixe brutos apresentam valores de acidez mais elevados, em torno de 10mg KOH/g, portanto, para a sua comercialização, é necessária a redução desse valor (MATA *et al.*, 2020).

Após as etapas de desodorização e neutralização, nas fases de refino do óleo de peixe cru, observa-se uma diminuição no valor de acidez, devido à remoção de impurezas, como gomas, pasta de sabão, agentes de cor, cera, aldeído e cetonas. Nesse processo, o valor da acidez diminui devido à remoção dos compostos citados. (ÖZCAN; DUMAN; DUMAN, 2021; DUMAN; ÖZCAN, 2020; OZYURT *et al.*, 2022).

Portanto, a acidez em óleos fornece um dado importante na avaliação do estado de sua conservação; um processo de decomposição, seja por hidrólise, oxidação ou fermentação, altera quase sempre a concentração dos íons hidrogênio. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, enquanto a rancidez quase sempre é acompanhada pela formação de ácidos graxos livres (IAL, 2005; SONG *et al.*, 2018).

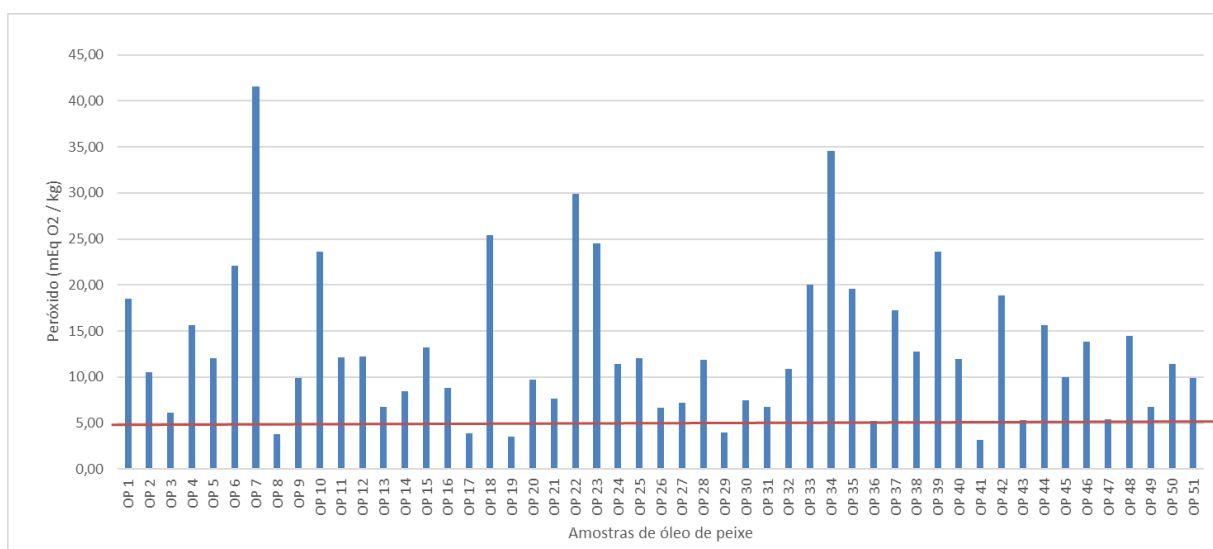
A suscetibilidade da peroxidação lipídica nos alimentos depende da composição lipídica, da existência de pró-oxidantes e antioxidantes, níveis de oxigênio, temperatura, luz e métodos de processamento, ou seja, alimentos ricos em

AGPI são mais suscetíveis à oxidação lipídica. Da mesma forma, a presença de pró-oxidantes, como metais ativos redox (Fe, Cu), e hemeproteínas, exposição a altos níveis de oxigênio e altas temperaturas, podem acelerar o processo de oxidação.

A oxidação lipídica gera problemas no processamento e armazenamento de alimentos, afetando negativamente o sabor devido à formação de aldeídos e cetonas. A oxidação de AGPIs produz uma mistura complexa de produtos de oxidação secundária voláteis, que conferem odores e sabores indesejáveis. Além disso, a oxidação lipídica pode reduzir o valor nutricional, causando a degradação de AG essenciais e lipídios, das vitaminas solúveis A, D, E e K, bem como a diminuição do teor energético (TAO, 2015). Neste estudo, foram realizadas três medidas para avaliar a oxidação lipídica nos óleos de peixes: índice de peróxido (PV), valor de p-anisidina (pAV) e valor total de oxidação (ToTox).

Para o PV, a média foi de 13,09 mEqO₂/Kg, variando de 3,13mEqO₂/Kg a 41,54mEqO₂/Kg, com intervalo de confiança ($\alpha=0,05$) de 6,86mEqO₂/Kg a 10,19mEqO₂/Kg. Quanto à recomendação do Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS, 2021), 46 (90,2%) dos óleos de peixe estavam com os valores acima de 5mEq O₂/Kg, como pode ser observado na Figura 25.

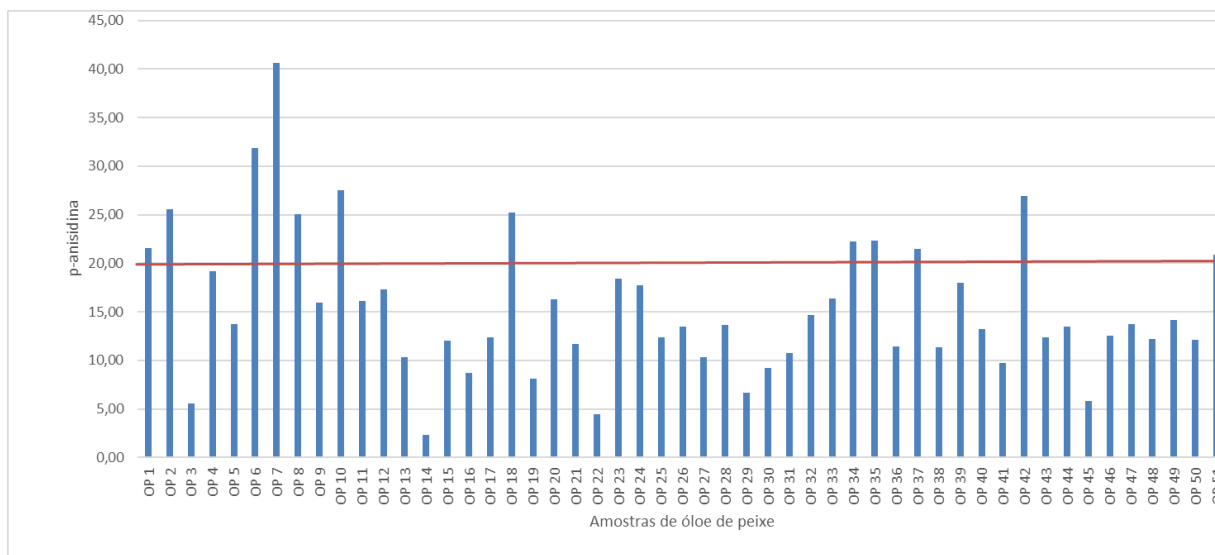
Figura 25 - Valores do índice de peróxido para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. — Representa o limite de peróxido, de acordo com o Codex Alimentarius



Fonte: Autora.

Para a p-anisidina, verificou-se a média de 15,48 valores variando de 2,33 a 40,66, com intervalo de confiança ($\alpha=0,05$) de 6,10 - 9,06 e 12 (23,5%) amostras estavam acima do valor de 20, preconizado pelo Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS, 2021), como observado na Figura 26.

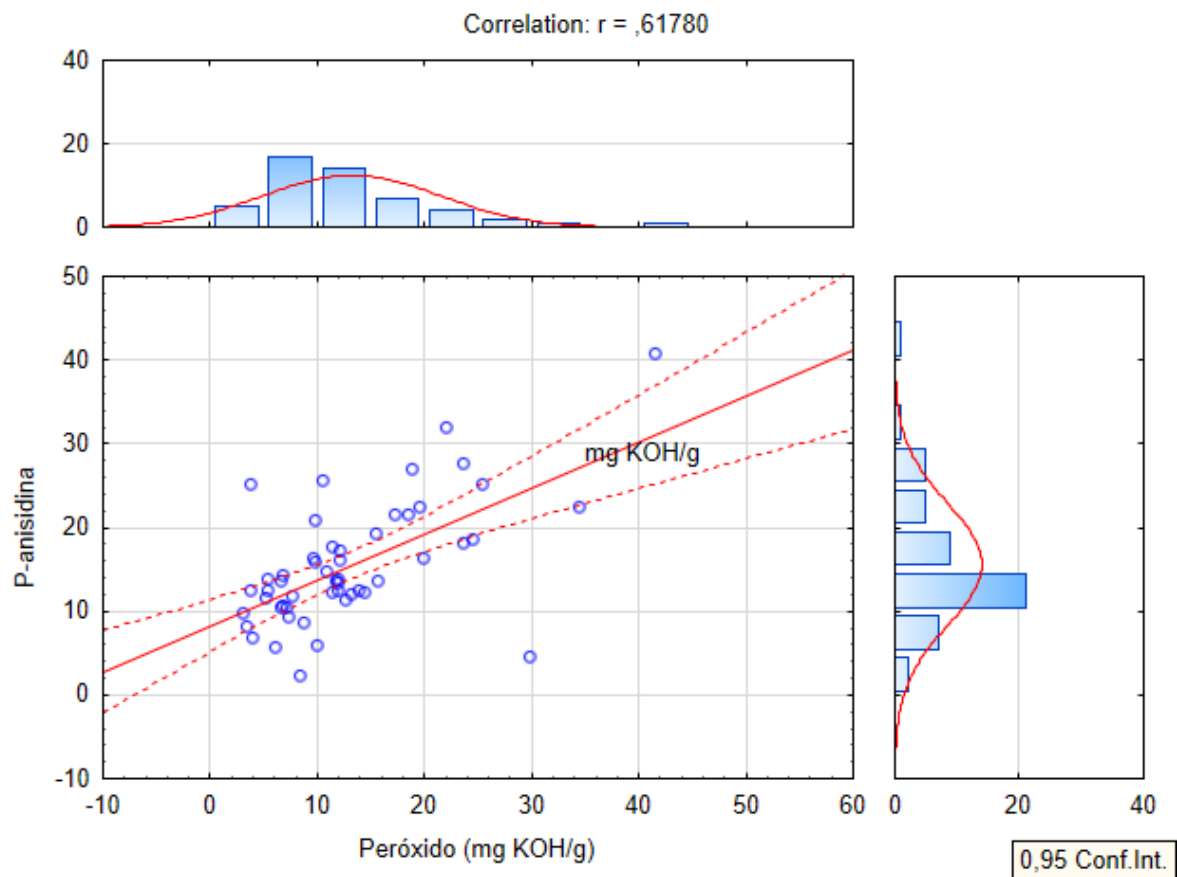
Figura 26 - Valores p-anisidina para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. — Representa o limite de p-anisidina, de acordo com o Codex Alimentarius



Fonte: Autora.

Foi calculado o coeficiente de Pearson entre os valores de peróxido e p-anisidina. Na Figura 27, pode-se notar que houve forte correlação entre os dados ($r = 0,62$), demonstrando que há uma correlação forte entre esses parâmetros (LALINDE *et al.*, 2018), uma vez que o peróxido mede a oxidação primária, ou seja, a quantidade de íons hidróxidos formados, e a p-anisidina, a formação de aldeídos, na etapa da oxidação secundária (DAMODARAN; PARKIN, 2018).

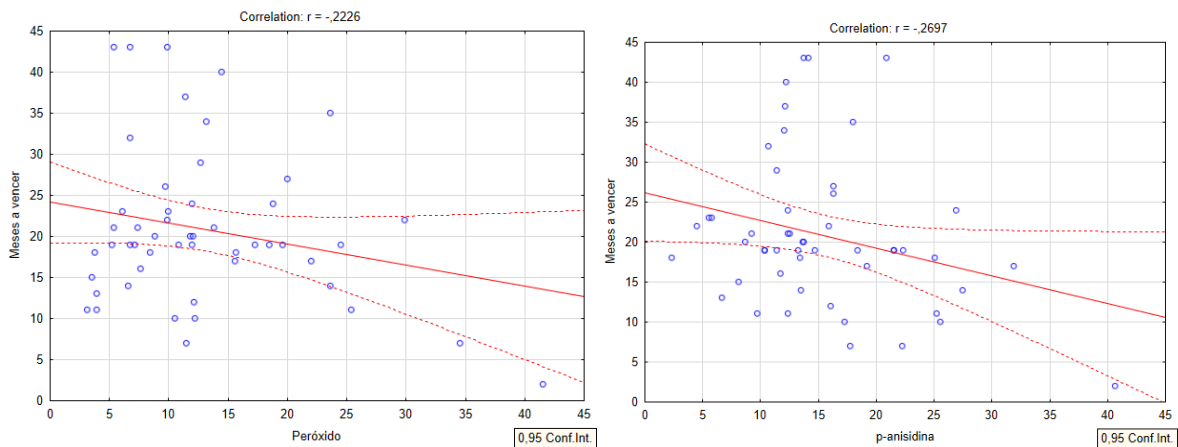
Figura 27 - Correlações dos dados do índice de peróxido e p-anisidina para os óleos de peixe comercializados no Estado de São Paulo



Fonte: *Software* Statistica.

A estabilidade lipídica no óleo é importante para a determinação da vida de prateleira (LEMBKE; SCHUBERT, 2014); desse modo, determinou-se o coeficiente de Pearson entre o índice de peróxido e o valor de p-anisidina em relação aos meses restantes para a validade do produto, o valor determinado foi de -0,2697 para a pAV e de -0,222 para o PV (Figura 28); esses valores são considerados de correlação fraca, e, portanto, o tempo para vencer a amostra não tem relação com a oxidação lipídica, quando analisados o PV e a pAV.

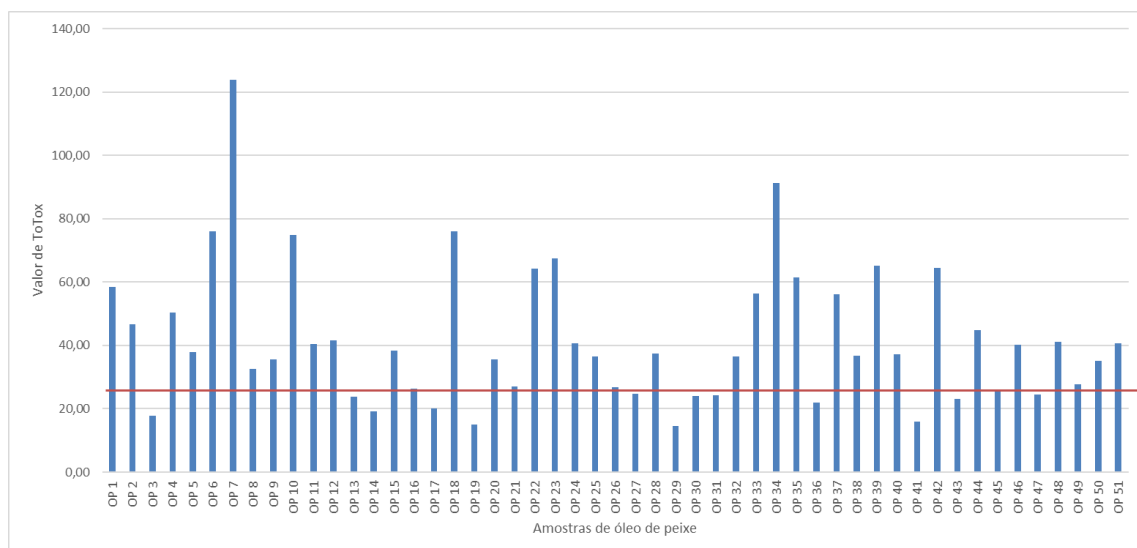
Figura 28 - Correlação entre índice de peróxido (A) e p-anisidina (B) e tempo a vencer das amostras de óleo de peixe comerciais



Fonte: *Software* Statistica

O cálculo do ToTox revelou como média 41,66, variando de 14,54 a 123,73, com intervalo de confiança ($\alpha=0,05$) de 18,13 - 26,93; onde 37 (72,6%) dos óleos de peixe estavam com valores acima de 26, recomendado pelo Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS, 2021), como observado na Figura 29. O valor de ToTox permite correlacionar o nível de peróxidos, que representam o potencial de degradação da qualidade organoléptica, e os aldeídos, representativos do estado de deterioração efetivo (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

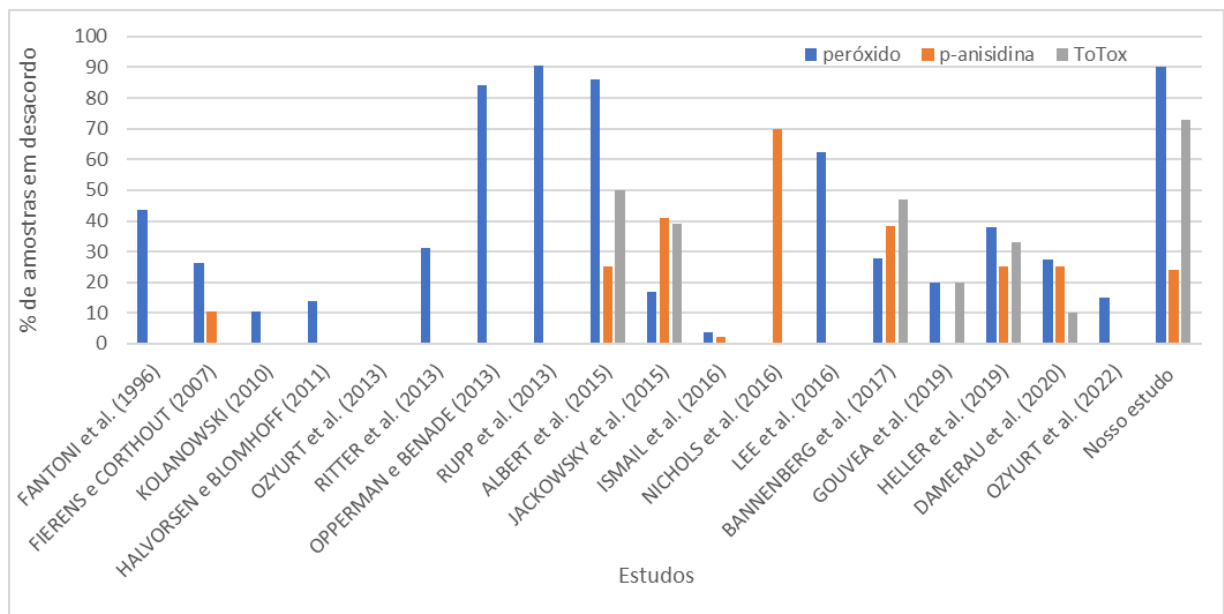
Figura 29 - Valores ToTox para os óleos de peixes comercializados no Estado de São Paulo. Representa o limite ToTox, de acordo com o Codex Alimentarius



Fonte: Autora.

Considerando os parâmetros de oxidação apenas 4 das 51 amostras analisadas tiveram valores de acordo com os preconizados. Na Figura 30, pode-se observar uma comparação das quantidades (percentuais) das amostras analisada por diversos autores, que não estava de acordo com o limite estabelecido pelo Codex Alimentarius para as análises de índice de peróxido, p-anisidina e ToTox e os valores determinados em nosso estudo.

Figura 30 - Percentual de amostras em desacordo com os níveis de oxidação observados em diversos estudos, comparados ao nosso estudo



Fonte: Autora.

Apenas no estudo de Ozyurt *et al.* (2013), com cinco amostras de óleo de peixe, e de Nichols *et al.* (2016), com dez amostras, não foram observadas amostras em desacordo com o Codex Alimentarius para PV; nos demais estudos, pelo menos uma amostra estava acima do limite estabelecido. Em nosso estudo, 90% das amostras revelam valores maiores para PV, fato também verificado por Opperman e Benade (2013), em estudo na África do Sul; Rupp *et al.* (2013), em estudo em diversos países da Europa e da Ásia; e Albert *et al.*, (2015), na Nova Zelândia (Tabela 4).

Em um estudo brasileiro realizado em 2019 (GOUVEA *et al.*, 2019), com dez amostras de óleo de peixe, comercializados em Brasília, 20% das amostras estavam acima do limite para PV. Nos demais estudos, verifica-se que há, em média, 30% das

amostras com valores maiores de PV do que o limite estabelecido. Durante o processo de oxidação, as concentrações dos indicadores mudam com o tempo; na primeira fase da oxidação, os hidroperóxidos são formados e o valor de PV aumenta rapidamente.

O passo seguinte é a decomposição dessas moléculas, agora oxidadas de AGPI n-3, para moléculas menores, que são os compostos de oxidação secundária (cetonas e aldeídos). Isso abranda e acaba mesmo por inverter a o crescimento da curva PV; portanto, ao analisar apenas o PV, podemos ter a sensação de uma falsa qualidade desse óleo (LEMBKE; SCHUBERT, 2014).

Quanto aos valores de indicação da oxidação numa etapa posterior, ou seja, o valor de p-anisidina, observou-se (Figura 30) que a quantidade de amostras em desacordo com o Codex Alimentarius, para a maioria dos estudos, está entre 20% e 40%, com destaque para o estudo de Nichols *et al.* (2016), que observaram 70% das amostras acima do valor de 20 estabelecido pelo Codex Alimentarius. Estudos de Gouvea *et al.* (2019) e Ozyurt *et al.* (2013) não verificaram amostras em desacordo com o limite.

O valor de p-anisidina também pode refletir uma avaliação enganosa do estado do óleo, pois, uma vez que a oxidação está em seu início, o valor de p-anisidina é menor (LEMBKE; SCHUBERT, 2014). Desse modo, sugere-se que o método mais adequado é a combinação de ambos os parâmetros de oxidação, expressos como o valor completo da oxidação; o ToTox, a sua vantagem está no comportamento de seus valores ao longo das reações de oxidação, os quais não retornam ao zero, demonstrando a evolução da oxidação (LEMBKE; SCHUBERT, 2014)

Nos estudos indicados na Figura 30, apenas sete trabalhos determinaram o ToTox; Ozyurt *et al.* (2013) não observaram amostras com valores acima do recomendado pelo Codex Alimentarius; em nosso estudo, observamos o maior percentual de amostras acima do limite de 26 estabelecido pelo Codex Alimentarius. Foram cerca de 75% das amostras, fato explicado pelo alto índice de desaprovação para o PV, uma vez que o ToTox é a combinação dos valores de PV e pAV.

Nos estudos que demonstraram PV alto, não foi realizado o cálculo de ToTox. Albert *et al.* (2013); Jackowski *et al.* (2015); Bannenberg *et al.* (2017); e Heller *et al.* (2019), verificaram mais de 40% das amostras com valores acima de ToTox. Esses resultados sugerem que o estado de oxidação desses suplementos, em diferentes países, é variável e depende da matéria-prima. Suplementos de óleos contendo ésteres etílicos possuem índice de peróxido maior do que aqueles à base de

triacilglicerídeo, sugerindo que a formulação pode afetar a susceptibilidade à oxidação. Os óleos de peixe devem ser produzidos em ambientes protegidos de oxigênio, luz e temperatura (GOUVEA *et al.*, 2019).

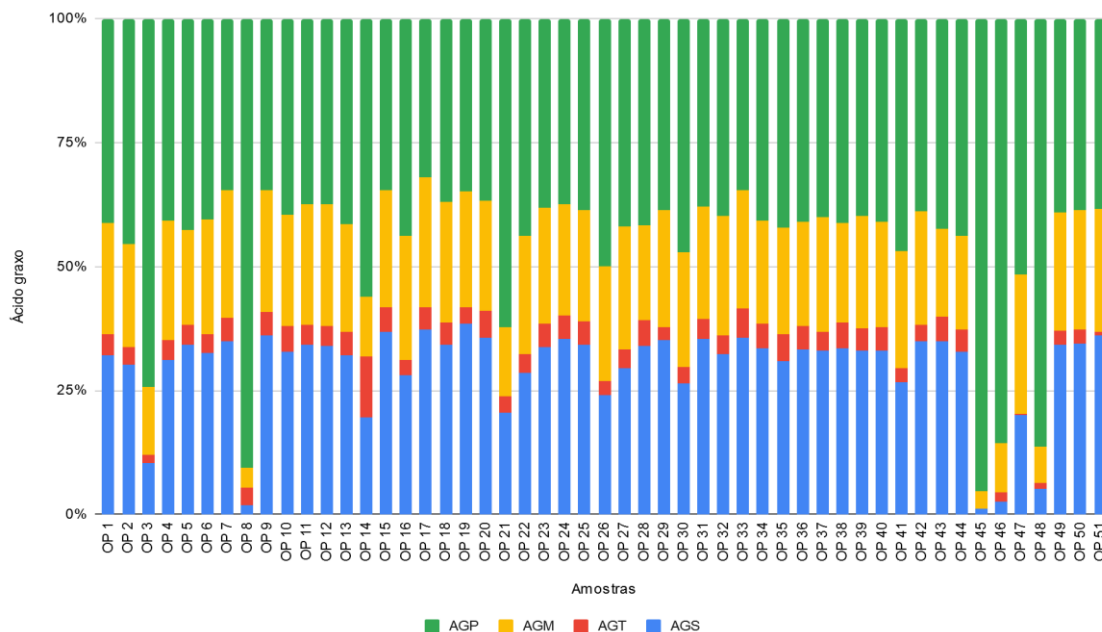
Cabe ressaltar que os métodos descritos para análise do estado de oxidação em óleos de peixes são pouco sensíveis para fazer qualquer observação sobre as propriedades organolépticas do óleo. Os compostos formados pela oxidação possuem valores baixos, para serem detectados pelos métodos citados, mas nosso nariz e nosso paladar são capazes de diferenciá-los. Isso pode explicar porque um óleo de peixe pode revelar um valor de PV e pAV dentro do esperado, mas ter gosto e/ou cheiro indesejados.

Não é surpreendente que muitos produtos de óleo de peixe sejam oxidados em graus variados, quando se considera o processo complexo da captura no oceano até o produto para o consumidor final. O óleo produzido é armazenado em grandes tanques, antes de ser enviado para refino, normalmente na China. Esse processo de refino geralmente envolve várias etapas, incluindo o aquecimento repetido a altas temperaturas (ALBERT *et al.*, 2015).

4.4.2 Valores comparados com a informação nutricional fornecida pelos fabricantes

Os resultados de gorduras saturadas, *trans*, monoinsaturadas e poli-insaturadas, para as amostras comerciais de óleo de peixe encapsulados, constam na Figura 31.

Figura 31 - Composição dos óleos de peixes comerciais quanto aos ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos *trans* (AGT), ácidos graxos monoinsaturados (AGM) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI)

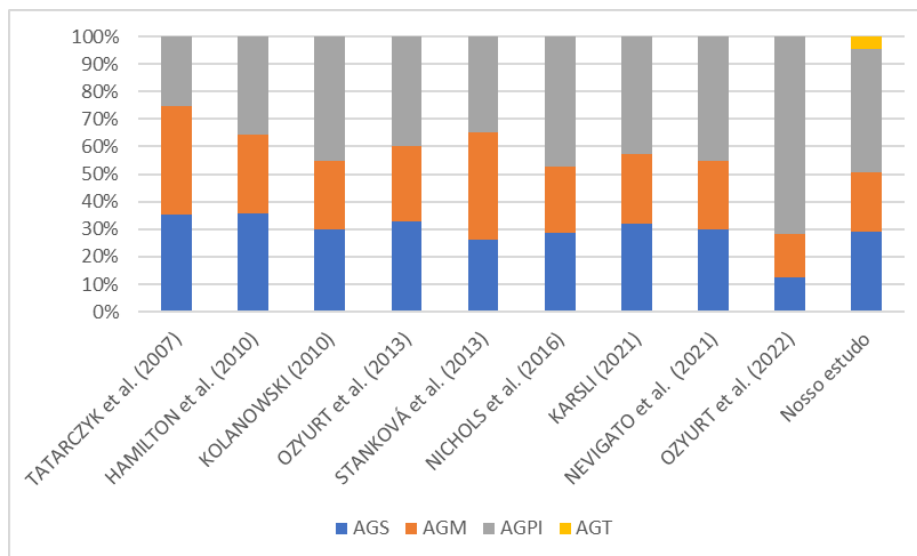


Fonte: Autora.

Na Figura 31, pode-se observar que a maioria dos OPs tiveram composição de ácidos graxos próximos, com predominância de AGPI, seguidos de AGS, AGM e AGT. As amostras OP 3, OP 8, OP 45, OP 46, OP 47 e OP 48 apresentaram quantidade maior de AGP, se comparadas com as demais amostras, visto que essas têm concentração de EPA e DHA maiores. A média de AGS para as 51 amostras estudadas foi de 20,36g/100g, com variação de 0,85g/100g a 31,92g/100g; para AGT, foi de 2,73g/100g, com amplitude de 0,03g/100g a 9,54g /100g, enquanto que, para a AGM, a média foi de 14,46g/100g, variando de 2,61g/100g a 19,79g/100g e AGP com média de 30,66g/100g e amplitude de 21,45g/100g a 69,25g/100g.

Na Figura 32, consta a composição de ácidos graxos para diversos trabalhos realizados com óleo de peixe.

Figura 32 - Composição de ácidos graxos: ácidos graxos saturados (AGS), ácidos graxos monoinsaturados (AGM), ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) e ácidos graxos *trans* (AGT) nos óleos de peixe, em diversos estudos



Fonte: Autora.

Na Figura 32, observa-se que apenas em nosso estudo foi reportada a quantidade de AGT nos óleos de peixe. Na maioria dos estudos, a quantidade de AGPI foi a característica, devido aos AGs EPA e DHA. Amostras analisadas por Navigato; Masci; Caproni (2021); Karsli (2021); Ozyurt *et al.* (2013) e Hamilton *et al.* (2010), demonstraram composição de AGs similares com a do nosso estudo - cerca de 30% de AGS; 25% de AGM; e 40% de AGP -, demonstrando que as amostras podem ser da mesma espécie de peixe.

Nesses estudos, os suplementos de óleo de peixe, em sua maioria, eram da proporção 18:12 (EPA:DHA). Estudos de Tatarczyk *et al.* (2007), realizados na Áustria, e de Stanková *et al.* (2013), na República Checa, revelaram uma concentração maior de AGM, de 37% e 39%, respectivamente; desse modo, esse comportamento pode ser característico dos óleos de peixe comercializados nessa região.

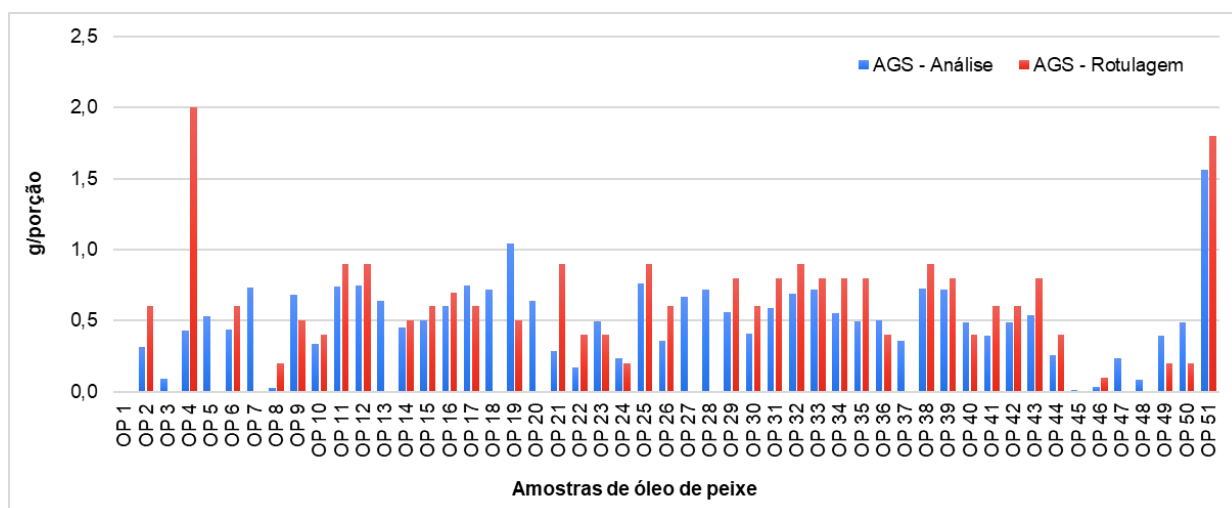
No estudo de Ozyurt *et al.* (2022), foram analisadas amostras de suplemento de ômega concentrado, e, portanto, os valores de EPA e DHA eram próximos de 60%, como observado na Figura 32. Nos estudos avaliados, os autores não indicam a espécie de peixe da qual foram extraídos os óleos, e, no Brasil, essa declaração não é obrigatória. Cada espécie apresenta um perfil de ácidos graxos característicos, o que influencia na respectiva composição de AGs, desse modo, a variação na

composição de AGs, nos diferentes estudos, pode estar relacionada com o tipo de peixe e a concentração de EPA e DHA, em cada suplemento.

Das 51 amostras, apenas uma não continha em seu rótulo a informação nutricional; nas demais, foram comparados os valores de AGS, AGT, AGM, AGPI, EPA e DHA, declarados pelos fabricantes, e os calculados neste estudo, em g/porção, considerando a porção declarada pelo fabricante. Para essa avaliação, foi utilizado o limite de 20% de variação preconizado pela RDC nº 360/2003 (BRASIL, 2003), legislação em vigor na época das análises.

Na Figura 33, podem ser observados os valores determinados para AGS e os declarados na informação nutricional.

Figura 33 - Valores de ácidos graxos saturados (AGS) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo



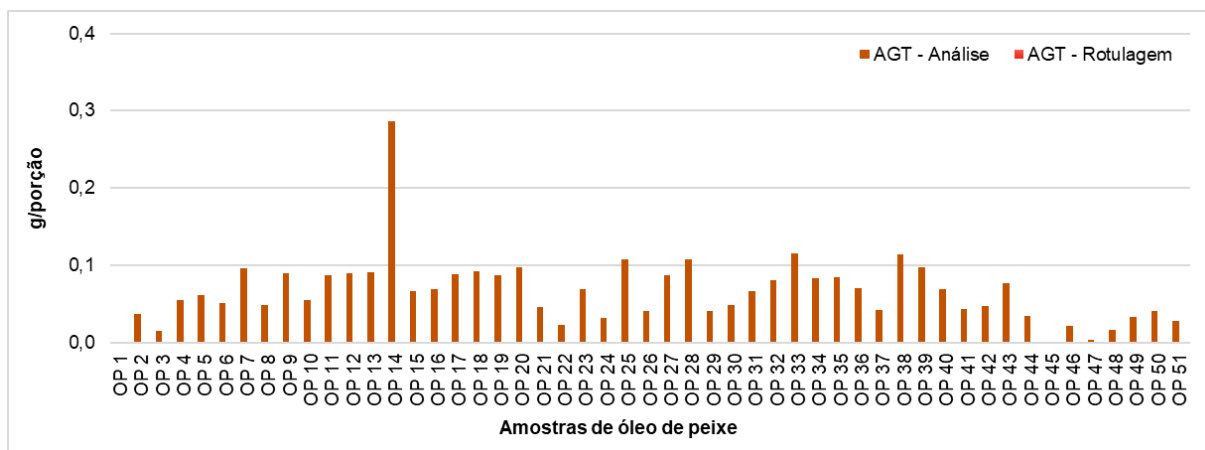
Fonte: Autora.

Para os AGS, foi observado que, em 74,5% das amostras, os valores declarados na informação nutricional estavam em desacordo com aqueles analisados, considerando o limite de 20% de variação preconizado pela RDC nº 360/2003. As amostras OP 2, OP 4, OP 11, OP 12, OP 21, OP 25, OP 29, OP 30, OP 31, OP 32, OP 33, OP 34, OP 35, OP 38, OP 39, OP 41, OP 42, OP 43, OP 44, OP 46 e OP 51, totalizando 21 amostras (42%), continham valores de AGS superiores aos observados na determinação analítica; enquanto as amostras OP 7, OP 9, OP 19, OP 20, OP 23, OP 27, OP 28, OP 47, OP 49, OP 50, no total de dez amostras (20%), demonstraram valores na análise maiores do que os declarados nos rótulos.

Devido à gordura saturada ser considerada maléfica, quanto menor seus valores, melhor para a nossa saúde. E, de acordo, com as novas legislações de rotulagem em vigor, atualmente, a RDC nº 429/2020 e a IN nº 75/2020 (BRASIL, 2020a; BRASIL, 2020b), a quantidade de gordura saturada não pode ser superior a 20% do valor declarado. Desse modo, apenas 32,5% das amostras de nosso estudo estariam em desacordo para AGS.

Na Figura 34, observam-se os valores analisados para os AGT, uma vez que em todas as amostras foi declarado, na informação nutricional, esse valor, como 0g/porção. De acordo com a RDC nº 360/2003, pode-se declarar AGT como zero, na informação nutricional, desde que não contenha a informação nutricional complementar “zero *trans*”, com valores de até 0,2g/porção (BRASIL, 2003). Segundo a legislação vigente, a IN nº 75/2020, para suplementos alimentares, esse valor é de até 0,1g/porção (BRASIL, 2020b).

Figura 34 - Valores de ácidos graxos *trans* (AGT) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo



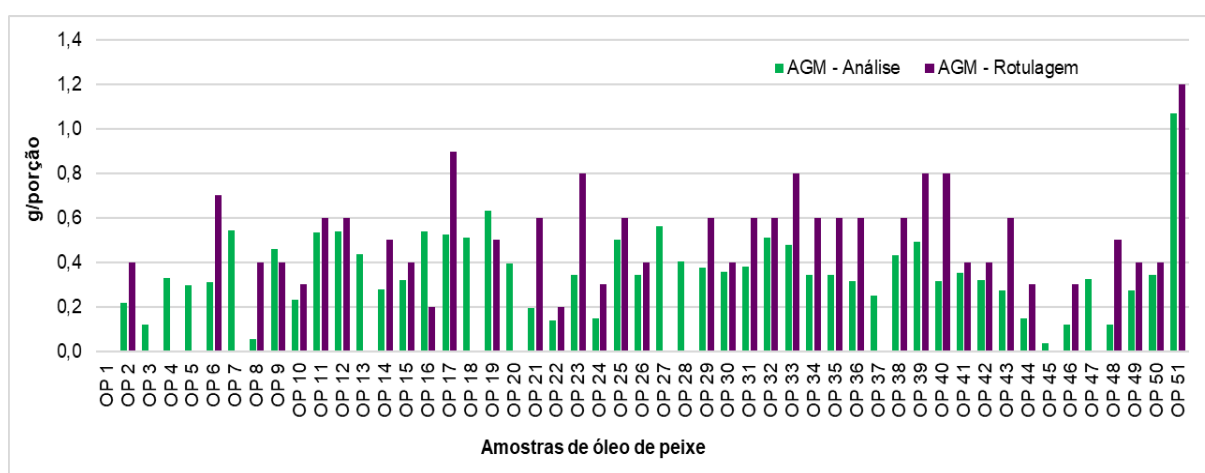
Fonte: Autora.

De todas as amostras analisadas, apenas uma (OP 14) teve seu valor acima do limite estabelecido pela legislação vigente na época das análises (RDC nº 360/2003); para ser considerado como zero na porção, o valor analisado foi de 0,3 g/porção. Avaliando esses dados pela IN nº 75/2020, excluindo a OP 14, todas estariam dentro do limite de 0,1g/porção, para declarar como zero, pois o valor para

AGT nas amostras OP 25, OP 28, OP 33 e OP 38, foi de 0,11g/porção, e, pela regra do arredondamento, seria 0,1g/porção (BRASIL, 2020b).

Na Figura 35, observam-se os valores dos AGMs analisados e os declarados na informação nutricional para os óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo.

Figura 35 - Valores de ácidos graxos monoinsaturados (AGM) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo

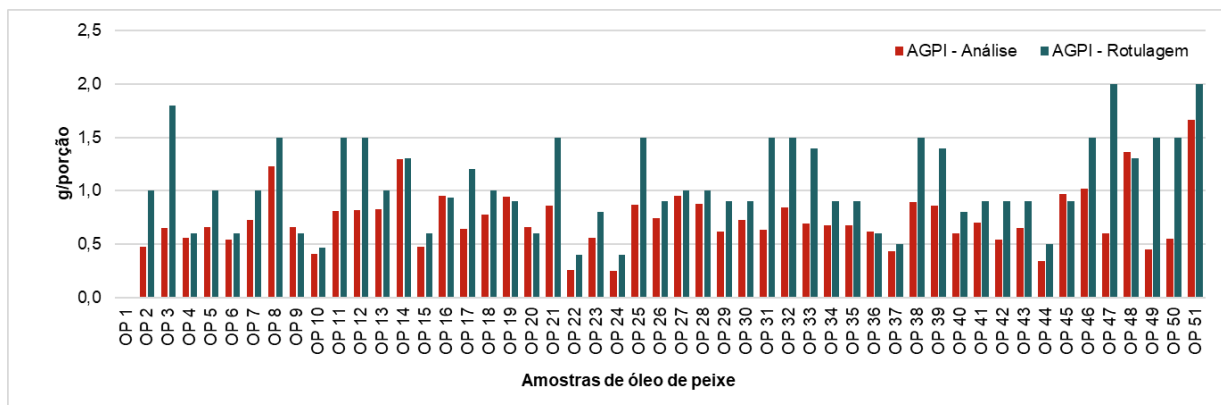


Fonte: Autora.

Das 51 amostras de óleo de peixe, em 11 (OP 1, OP 3, OP 4, OP 5, OP 7, OP 13, OP 18, OP 20, OP 27, OP 28, OP 37), não foi declarado o teor de AGM. Essa é uma declaração obrigatória, uma vez que foram observados valores declarados para AGPI, EPA e DHA. As amostras OP 45 e OP 47 apresentaram esse valor como zero g/porção. Na maioria das amostras, foi observado o valor declarado na informação nutricional maior do que o analisado, permeando assim 76,5% das amostras, em desacordo com o limite preconizado pela legislação RDC nº 360/2003, bem como pela RDC nº 429/2020 e IN nº 75/2020.

Na Figura 36, observam-se os valores dos AGPI analisados e os declarados na informação nutricional para os óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo.

Figura 36 - Valores de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) em g/porção determinada pela análise e declarados na informação nutricional nos óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo

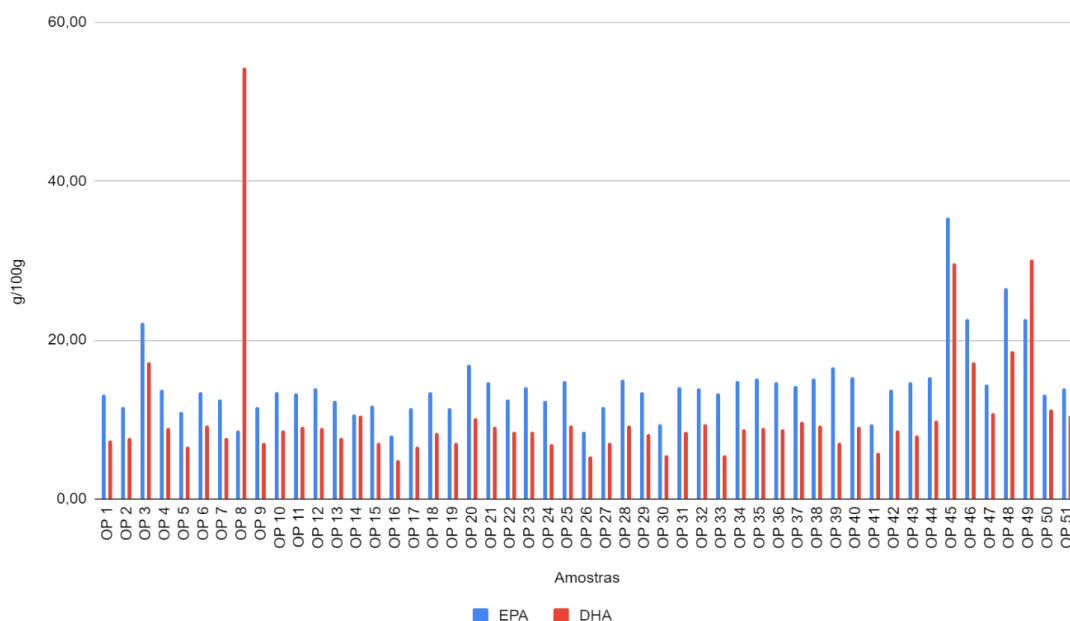


Fonte: Autora.

Observa-se, na Figura 36, que apenas na amostra OP 1 não se declarou o valor de AGPI. A maioria das amostras contém, na informação nutricional, valores maiores do que o determinado analiticamente, totalizando 37 amostras, ou 72,3%. As amostras OP 10, OP 14, OP 15, OP 16, OP 19, OP 20, OP 27, OP 36, OP 45, e OP 48 demonstraram valores declarados e analisados bem próximos.

Os valores obtidos de EPA e DHA podem ser visualizados na Figura 37. A maioria das amostras teve valores similares de EPA e DHA, enquanto a média foi de 14,3g/100g e 10,4g/100g, variando de 7,9g/100g a 35,43g/100g e 4,87g/100g a 54,33g/100, para cada ácido graxo, respectivamente. Quanto aos ácidos graxos EPA e DHA, todas as amostras os continham, portanto, não foi verificado um perfil de ácidos graxos que sugerisse o uso de outro óleo vegetal em vez do óleo de peixe.

Figura 37 - Valores analisados de EPA e DHA (g/100g) nas amostras de óleos de peixe encapsulados comercializados no Estado de São Paulo

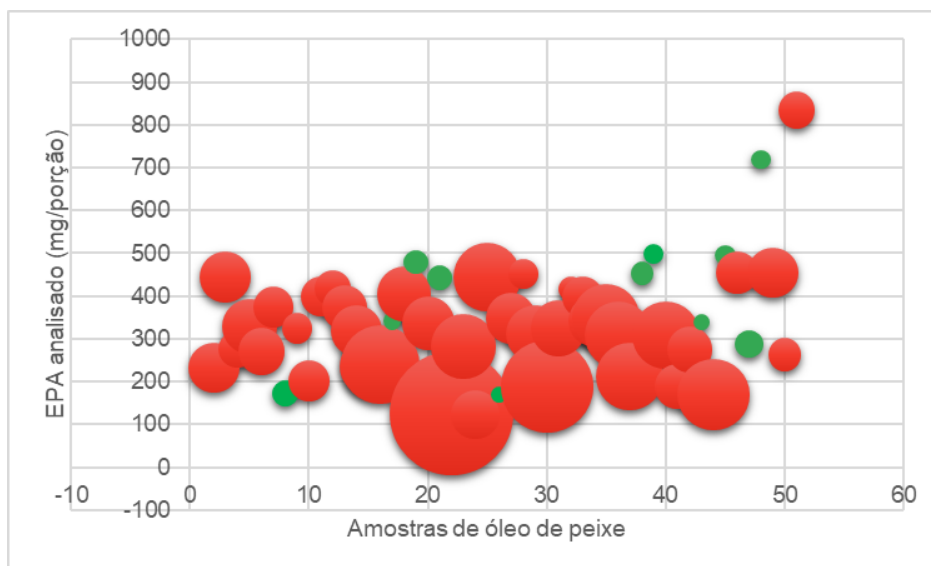


Fonte: Autora.

Para o EPA, foi verificado que 74,5% das amostras apresentaram valores em desacordo com a variação estabelecida pela RDC nº 360/2003, e, para DHA, esse valor foi de 84,3%, considerando o limite estabelecido pela RDC nº 429/2020 (as quantidades de gorduras poliinsaturadas do alimento não podem ser inferiores a 20% do valor declarado); esse valor é de 70,6% para EPA e 80,4% para DHA.

Desse modo, a população que consome esse suplemento alimentar não está ingerindo a quantidade declarada de EPA e DHA, nos respectivos rótulos. Na Figura 38, pode ser observado o valor de EPA declarado analisado e o valor percentual da diferença desses valores (círculos), evidenciando que os círculos verdes são para valores menores do que 20% e os vermelhas para valores maiores.

Figura 38 - Comparação dos valores de EPA (mg/porção) declarados pelo fabricante com o analisado



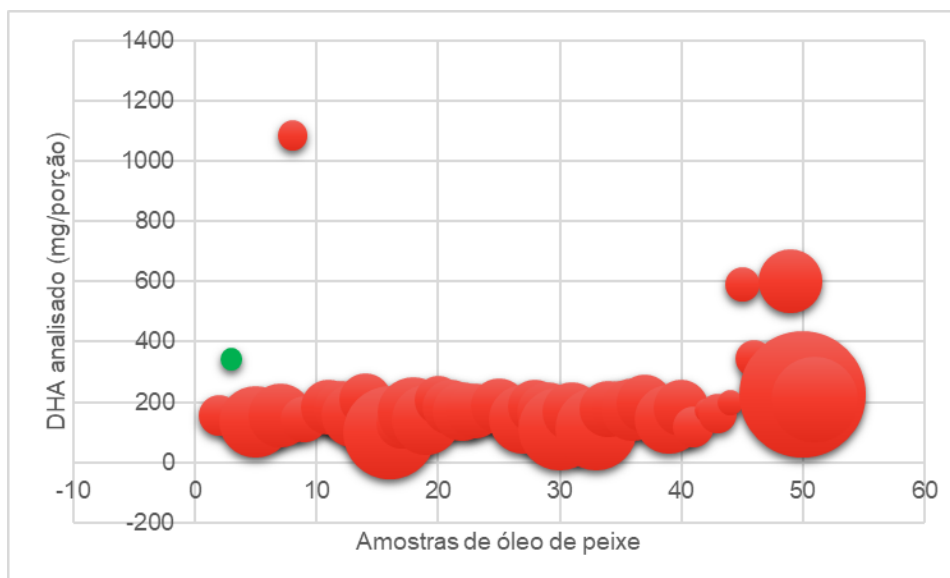
Fonte: Autora. A Os círculos representam a diferença (%) entre o valor declarado na informação nutricional e o analisado. Círculos vermelhos, valores >20%, círculos verdes valores <20%

Apenas 13 amostras de óleo de peixe declararam valores de EPA, dentro da tolerância aceita pela RDC nº 360/2003. São elas: OP 8, OP 17, OP 19, OP 21, OP 26, OP 28, OP 32, OP 38, OP 39, OP 46, OP 45, OP 47 e OP 48; as amostras OP 7, OP 56, OP 49 e OP 50 declararam valores menores do que os analisados para EPA, e, de acordo com a RDC nº 429/2020, estariam satisfatórias.

As maiores variações dos valores declarados com os analisados para o EPA foi verificado nas amostras OP 22 – valor declarado: 540mg/porção e analisado: 125mg/porção (variação de 332%); OP 30 – valor declarado: 540mg/porção e analisado: 188mg/porção (variação de 187%); e OP 16 – valor declarado: 558mg/porção e analisado: 239mg/porção (variação de 134%).

Na Figura 39, podem ser observados o valor de DHA declarado no rótulo e o valor percentual da diferença desses valores (círculos), evidenciando que os círculos verdes são para valores menores do que 20% e, os vermelhos, para valores maiores.

Figura 39 - Comparação dos valores de DHA (mg/porção) declarados pelo fabricante com o analisado



Fonte: Autora. Os círculos representam a diferença (%) entre o valor declarado na informação nutricional e o analisado. Círculos vermelhos valores > 20%, círculos verdes valores < 20%.

Devido às grandes variações entre o valor declarado e o analisado para DHA, os círculos vermelhos cobriam os círculos menores, verdes, portanto, na Figura 39, é possível visualizar apenas uma amostra (OP 3), com valores de acordo com a tolerância preconizada pela RDC nº 360/2003; no entanto, foram observadas que oito amostras satisfizeram esse critério, dentre as quais, a OP 3, OP 6, OP 10, OP 24, OP 26, OP 38, OP 42 e OP 48.

Nas amostras OP 45 e OP 46, o valor de DHA analisado foi maior do que o declarado na informação nutricional, em consonância com a RDC nº 429/2020 (BRASIL, 2020a). Avaliando as concentrações de DHA, foram observadas mais variações do que para EPA, possivelmente devido à sua maior suscetibilidade à oxidação. As maiores variações verificadas para DHA foram na amostra OP 51 – valor declarado: 1.400mg/porção e analisado: 224mg/porção (variação de 523%); OP 16 – valor declarado: 375mg/porção e analisado: 97mg/porção (variação de 284%); e OP 30 – valor declarado: 360mg/porção e analisado: 110mg/porção (variação de 523%).

Tanto para EPA quanto para DHA, verificou-se um valor padrão na informação nutricional (Tabela 10), para EPA, de 540mg/porção; e, DHA, de 360mg/porção, demonstrando que esses valores são fornecidos pelas empresas que produzem a matéria-prima e muitas vezes não são verificados pelas empresas que comercializam

os suplementos. A maioria dos trabalhos que avaliam a qualidade dos óleos de peixe realizam a comparação dos valores de EPA e DHA, ou a soma deles (EPA+DHA), em relação aos valores declarados nos respectivos rótulos. No Quadro 2, observam-se os estudos analisados, a sua origem, e se há comparação desses valores para EPA, DHA e EPA+DHA.

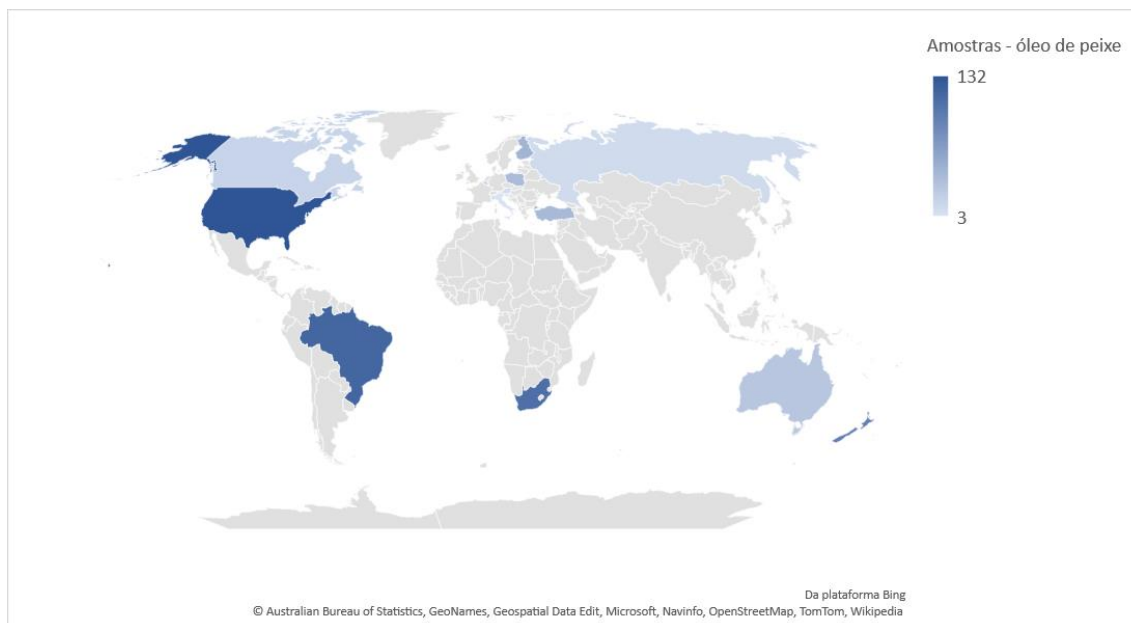
Quadro 2 - Trabalhos realizados por países comparando os valores de ácido eicosapentaenóico (EPA), ácido docosahexaenóico (DHA), ou a soma deles (EPA+DHA) com o valor declarado no rótulo

Trabalhos	País	EPA	DHA	EPA+DHA
ACKMAN <i>et al.</i> (1989)	Canadá	x	x	-
FANTONI <i>et al.</i> (1996)	Brasil	x	x	
SHIM <i>et al.</i> (2003)	EUA	x	x	
TATARCZYK <i>et al.</i> (2007)	Áustria			x
FIERENS; CORTHOUT (2007)	Bélgica			x
HAMILTON <i>et al.</i> (2010)*	Austrália	x	x	
KOLANOWSKI (2010)	Polônia			x
OPPERMAN; BENADE; MARAIS (2011)	África do Sul	x	x	
OZYURT <i>et al.</i> (2013)	Turquia	x	x	
RITTER <i>et al.</i> (2013)	EUA	x		x
OPPERMAN e BENADE (2013)	África do Sul	x	x	
YI <i>et al.</i> (2014)	Hong Kong	x	x	
SRIGLEY; RADER (2014)	EUA			x
ALBERT <i>et al.</i> (2015)*	Nova Zelândia			x
KLEINER <i>et al.</i> (2015)	EUA	x	x	
NICHOLS <i>et al.</i> (2016)	Austrália			x
OSADNIK; JAWORSKA (2016)	Polônia			x
BANNENBERG <i>et al.</i> (2017)*	Nova Zelândia			x
GALUCH <i>et al.</i> (2018)	Brasil			x
NÉIA <i>et al.</i> (2019)	Brasil			x
GOUVEA <i>et al.</i> (2019)	Brasil	x	x	
DAMERAU <i>et al.</i> (2020)	Finlândia			x
BROTAS <i>et al.</i> (2020)	Brasil			x
TORSHIN <i>et al.</i> (2020)	Rússia			x
RUCKLIDGE; SHAW (2020)*	Nova Zelândia			x
KARSLI (2021)	Turquia			x
MARTINEZ; MCDONALD (2021)*	Austrália			x
NEVIGATO; MASCI; CAPRONI (2021)	Itália	x	x	
OZYURT <i>et al.</i> (2022)	Turquia			x
Nosso estudo	Brasil	x	x	

Fonte: Autora. *países em que o limite de tolerância na informação nutricional é de 10%.

Na Figura 40, verifica-se a quantidade de amostras analisadas nos estudos listados no Quadro 2, por países.

Figura 40 - Quantidade de amostras de óleo de peixe avaliadas por países nos estudos expostos no Quadro 2



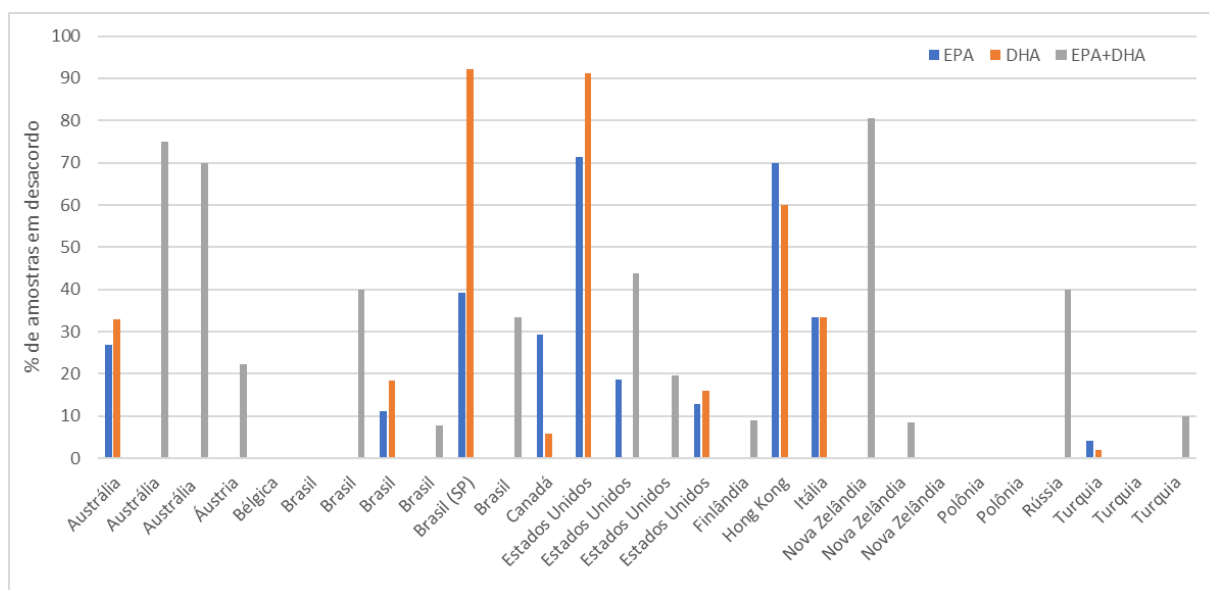
Fonte: *Software* Excel e plataforma Bing.

De acordo com o Quadro 2 e a Figura 40 verifica-se que em 18 estudos com óleo de peixe foram comparados os valores para a soma de EPA e DHA; 12 para EPA e 11 para DHA. As maiores amostragens foram nos EUA, com análise de 132 amostras, seguidos do Brasil, com 116 (não foram contabilizadas as amostras deste estudo); e Nova Zelândia, com 93; e as menores quantidades, na Áustria, com nove amostras e, na Itália, com três amostras.

A quantidade de trabalhos reflete a preocupação dos órgãos de Vigilância Sanitária dos países em garantir a qualidade desse suplemento, que foi o mais consumido nos EUA e na Europa, nos anos de 2005 a 2015 (CIRIMINNA *et al.*, 2017; ALBERT *et al.*, 2017). E no Brasil, entre os anos de 2018 e 2020, foi o segundo suplemento alimentar mais consumido (ABIAD, 2022).

Na Figura 41, verifica-se a quantidade (%) de amostras em desacordo com os valores de EPA, DHA e EPA+DHA analisados nos estudos e aqueles declarados nos rótulos dos óleos de peixes, estes dados foram avaliados por países.

Figura 41 - Quantidades (%) de amostras em desacordo dos valores de EPA, DHA e EPA+DHA analisados nos estudos (países) com os valores declarados nos rótulos dos produtos



Fonte: Autora.

Estudos realizados no Brasil, por Fantoni *et al.* (1996), demonstraram que, em todas as amostras, os valores de EPA e DHA estavam de acordo com a rotulagem, fato este também observado para os valores de EPA+DHA em estudos na Bélgica, de Fierens; Corthout (2007); na Polônia, de Kolanowski (2010); e Osadnik; Jaworska (2016); na Nova Zelândia, de Rucklidge; Shaw (2020); e na Turquia, de Karsli (2021). Cabe ressaltar que os dados identificados como Brasil (SP) referem-se ao nosso estudo.

Nos trabalhos em que foi verificada a concordância dos valores de EPA e DHA com os da rotulagem, na maioria (4) os valores de DHA eram mais discordantes, como em nosso estudo. Grande quantidade dos estudos teve valores em torno de 30%, das amostras, em desacordo para os valores declarados nos rótulos. Para os valores EPA+DHA, observa-se que os estudos realizados na Nova Zelândia e Austrália tiveram valores maiores para essa discrepância do que em outros países, o que pode ser devido ao limite de tolerância para o valor analisado e o declarado nos rótulos adotados por esses países, que é de 10%, diferentemente dos outros países, com 20%. Em estudo, nos EUA, de Shim *et al.* (2003), o percentual de amostras em desacordo com a rotulagem foi similar ao nosso estudo, ou seja, de 71,4% para EPA e 91,3% para DHA, como também observado em estudo de Yi *et al.* (2014), em Hong

Kong, de 70% para EPA e 60% para DHA. Em estudos realizados na Europa (Turquia, Polônia, Bélgica, Finlândia), os percentuais de amostras em desacordo com a rotulagem foram os mais baixos.

Uma das razões para essa diferença entre os valores analisados e os declarados nos rótulos dos suplementos alimentares de óleo de peixe, pode ser as flutuações nas concentrações de AGPI n-3 durante as épocas do ano; das diferentes espécies; e do modo de cultivo de peixe (ou seja, cativo ou selvagem) (CALDER, 2018). Evidências científicas demonstram que suplementos alimentares vendidos sem a necessidade de receita médica tem menor qualidade e, no caso dos óleos de peixe, apresentam níveis de oxidação dos AGPIs (ISMAIL *et al.*, 2016), fato este observado em nosso estudo, em que 90% das amostras estavam oxidadas.

Também é possível que os fabricantes pretenderam cumprir o limite de conformidade regulamentar de 80%, em vez de 100% dos valores indicados nos rótulos, como forma de limitar os custos de produção associados aos óleos de peixe. Em geral, os estudos demonstram a ampla variabilidade entre os valores indicados no rótulo de EPA e DHA e aqueles determinados de forma analítica.

Esses resultados apontam que ainda há margem para melhorar a regulação dos suplementos alimentares, já que todos os suplementos não conformes estavam disponíveis comercialmente. Além da regulamentação governamental, os fabricantes devem melhorar seus processos de garantia de qualidade desses suplementos para que contenham, pelo menos, a quantidade indicada de EPA e DHA. (ALBERT *et al.*, 2013; CALDER, 2017).

4.4.3 Perfil de ácidos graxos nas amostras de óleo de peixe comerciais

Na Tabela 42, pode-se observar o perfil de AGs para as amostras de óleos de peixe comercializados no Estado de São Paulo e, nas últimas colunas (p. 143), o perfil de AGs preconizado pelo Codex Alimentarius, para as espécies de peixe: Anchova, Atum, Arenque, Salmão Selvagem e Salmão de Cativeiro. Na legislação brasileira, não consta a obrigatoriedade de informar, na lista de ingredientes dos suplementos de óleo de peixe, de qual espécie o óleo foi extraído.

Figura 42 - Perfil de ácidos graxos (% de ésteres metílicos de ácidos graxos) nas amostras de óleo de peixe comercializadas no Estado de São Paulo.

AG/Amostras	OP_1	OP_2	OP_3	OP_4	OP_5	OP_6	OP_7	OP_8	OP_9	OP_10	OP_11	OP_12
C12	0,2151	0,2004	0,1949	0,1968	0,2067	0,1751	0,1707	0,0000	0,0000	0,1213	0,1989	0,1986
C14	7,0131	7,1796	6,9852	7,1873	7,4080	6,3946	7,2846	0,1437	0,1555	7,6207	7,2324	7,2010
C15	0,5183	0,6602	0,6424	0,6438	0,6812	0,5937	0,6286	0,0426	0,0460	0,6772	0,6672	0,6460
C16	16,5975	16,8078	16,3529	16,8297	17,3425	15,0325	17,0817	0,3182	0,3443	17,3819	16,9903	16,7856
C16:1 t	0,1601	0,1707	0,1661	0,1722	0,1762	0,1507	0,1722	0,0000	0,0000	0,1586	0,1734	0,1690
C16:1 c	8,5030	8,8127	8,5742	8,9952	9,0931	7,7384	9,9266	0,2045	0,2212	9,3450	8,9230	8,9837
C17	0,2855	0,3405	0,3313	0,3508	0,3513	0,3098	0,2970	0,1541	0,1668	0,3175	0,3445	0,5397
C17:1	1,2234	1,0794	1,0502	1,1107	1,1138	0,9628	1,1950	0,0964	0,1043	1,4080	1,0931	1,1111
C18	3,2233	3,3186	3,2288	3,3588	3,4242	2,9898	3,3719	0,0970	0,1050	3,3208	3,3780	3,3442
C18:1 t	1,5342	1,2698	1,2355	1,2715	1,3102	1,1428	1,4515	0,8077	0,8739	1,8511	1,2924	1,2804
C18:1 c	11,1367	13,6185	13,2499	11,7731	14,0518	10,4264	9,7647	0,4393	0,4753	10,2398	11,7730	10,8396
C18:2 t	2,2153	2,0156	1,9610	2,0917	2,0797	1,7767	2,2991	0,4634	0,5014	2,9155	2,0418	2,1164
C18:2 c	6,4510	1,4872	1,4469	1,4696	1,5345	1,3467	1,4003	0,1849	0,2001	1,7564	1,5466	1,5265
C18:3 t	0,2426	0,3176	0,3090	0,3367	0,3277	0,2833	0,3615	0,0000	0,0000	0,4447	0,3243	0,3354
C20	0,0727	0,0527	0,0513	0,0583	0,0544	0,0470	0,0448	0,0000	0,0000	0,0518	0,0529	0,0575
C18:3 c n-6	0,4429	0,4005	0,3896	0,5041	0,4132	0,3611	0,4116	0,0523	0,0566	0,2903	0,4126	0,4957
C18:3 c n-3	1,1751	1,1608	1,1294	1,3359	1,1977	1,0411	1,5335	0,0713	0,0772	0,9891	1,1918	1,3146
C20:1	0,1703	0,1973	0,1919	0,0000	0,2036	0,1758	0,1972	0,0000	0,0000	0,2854	0,2023	0,2001
C20:2	0,1545	0,1732	0,1685	1,0042	0,1787	0,1570	0,1632	0,0000	0,0000	0,1660	0,1755	0,1722
C20:3 n-6	0,1576	0,1366	0,1329	0,1581	0,1409	0,1250	0,1364	0,1212	0,1312	0,1260	0,1435	0,1419
C20:3 n-3	0,0640	0,0562	0,0546	0,0907	0,0579	12,5241	0,0718	0,0564	0,0610	0,0621	0,0686	0,0631
C20:4	0,6949	0,9080	0,8835	0,6334	0,9369	0,7060	0,0000	0,0000	0,0000	1,3383	0,7237	0,5345
C22:1	1,0301	0,8296	0,8072	1,5032	0,8560	0,9776	2,8723	2,8079	3,0380	1,0063	1,1862	1,9186
C20:5 (EPA)	17,7380	17,4083	16,9372	18,4144	17,9622	15,5732	17,6067	9,3336	10,0983	17,3538	17,8480	18,2744
C24	0,0850	0,0681	0,0662	0,0721	0,0702	0,0607	0,0648	0,0000	0,0000	0,0551	0,0688	0,0694
C24:1	0,1530	0,0000	0,0000	0,0261	0,0000	0,0250	0,0348	0,0000	0,0000	0,0000	0,0287	0,0000
C22:5 (DPA)	1,7326	1,7846	1,7363	1,7749	1,8414	1,5915	1,8257	3,6823	3,9839	2,0058	1,8656	1,7834
C22:6 (DHA)	10,1042	12,1377	11,8092	12,1731	12,5239	10,9405	11,0835	53,2074	57,5662	11,4912	12,5169	12,0041

(continua)

Figura 42 (continuação)

AG/Amostras	OP_13	OP_14	OP_15	OP_16	OP_17	OP_18	OP_19	OP_20	OP_21	OP_22	OP_23	OP_24
C12	0,0000	0,2012	0,0000	0,0000	0,1821	0,2012	0,1864	0,1829	0,1864	0,2012	0,1598	0,1691
C14	0,1696	7,2950	0,1845	0,1828	7,5852	7,2950	7,7635	7,6209	7,7635	7,2950	7,6268	8,5523
C15	0,0502	0,6544	0,0546	0,0541	0,6057	0,6544	0,6199	0,6085	0,6199	0,6544	0,5648	0,5871
C16	0,3755	17,0046	0,4085	0,4046	17,4105	17,0046	17,8199	17,4925	17,8199	17,0046	17,3925	17,4690
C16:1 t	0,0000	0,1712	0,0000	0,0000	0,1596	0,1712	0,1634	0,1604	0,1634	0,1712	0,1733	0,2021
C16:1 c	0,2413	9,1010	0,2625	0,2600	8,6436	9,1010	8,8469	8,6844	8,8469	9,1010	9,0094	9,9501
C17	0,1819	0,5468	0,1979	0,1960	0,0000	0,5468	0,0000	0,0000	0,0000	0,5468	0,2659	0,2424
C17:1	0,1138	1,1256	0,1237	0,1226	1,1373	1,1256	1,1640	1,1426	1,1640	1,1256	1,3044	1,4699
C18	0,1145	3,3878	0,1245	0,1234	3,5248	3,3878	3,6077	3,5414	3,6077	3,3878	3,3808	3,4129
C18:1 t	0,9532	1,2971	1,0369	1,0270	1,2765	1,2971	1,3065	1,2825	1,3065	1,2971	1,7432	1,8236
C18:1 c	0,5184	10,9810	0,5639	0,5586	10,9992	10,9810	11,2579	11,0511	11,2579	10,9810	11,0407	10,0980
C18:2 t	0,5469	2,1440	0,5949	0,5893	2,1160	2,1440	2,1657	2,1259	2,1657	2,1440	2,3282	2,2680
C18:2 c	0,2182	1,5464	0,2374	0,2351	1,4622	1,5464	1,4966	1,4691	1,4966	1,5464	1,3685	1,2259
C18:3 t	0,0000	0,3398	0,0000	0,0000	0,3513	0,3398	0,3595	0,3529	0,3595	0,3398	0,3739	0,4048
C20	0,0000	0,0583	0,0000	0,0000	0,0675	0,0583	0,0690	0,0678	0,0690	0,0583	0,0649	0,0682
C18:3 c n-6	0,0618	0,5022	0,0672	0,0665	0,4813	0,5022	0,4926	0,4835	0,4926	0,5022	0,3629	0,3022
C18:3 c n-3	0,0842	1,3318	0,0915	0,0907	1,4593	1,3318	1,4937	1,4662	1,4937	1,3318	1,3303	1,1089
C20:1	0,0000	0,2027	0,0000	0,0000	0,2183	0,2027	0,2234	0,2193	0,2234	0,2027	0,1921	0,7313
C20:2	0,0000	0,1745	0,0000	0,0000	0,1785	0,1745	0,1827	0,1793	0,1827	0,1745	0,1647	1,0096
C20:3 n-6	0,1431	0,1437	0,1556	0,1542	0,1578	0,1437	0,1615	0,1586	0,1615	0,1437	0,1264	0,1341
C20:3 n-3	0,0666	0,0639	0,0724	0,0717	0,0593	0,0639	0,0607	0,0596	0,0607	0,0639	0,0530	0,0954
C20:4	0,0000	0,5415	0,0000	0,0000	0,0000	0,5415	0,0000	0,0000	0,0000	0,5415	1,2419	1,1338
C22:1	3,3138	1,9436	3,6045	3,5703	1,9561	1,9436	2,0021	1,9653	2,0021	1,9436	1,0279	1,0070
C20:5 (EPA)	11,0151	18,5129	11,9815	11,8679	18,3413	18,5129	18,7726	18,4277	18,7726	18,5129	17,9356	12,5879
C24	0,0000	0,0703	0,0000	0,0000	0,0705	0,0703	0,0722	0,0708	0,0722	0,0703	0,1605	0,0000
C24:1	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0302	0,0000	0,0309	0,0303	0,0309	0,0000	0,4229	0,0000
C22:5 (DPA)	4,3456	1,8067	4,7269	4,6821	1,8093	1,8067	1,8518	1,8178	1,8518	1,8067	2,0763	2,0177
C22:6 (DHA)	62,7930	12,1607	68,3021	67,6545	10,7735	12,1607	11,0268	10,8242	11,0268	12,1607	11,0085	9,8511

(continua)

Figura 42 (continuação)

AG/Amostras	OP_25	OP_26	OP_27	OP_28	OP_29	OP_30	OP_31	OP_32	OP_33	OP_34	OP_35	OP_36
C12	0,1463	0,0875	0,1303	0,1501	0,1226	0,0971	0,1393	0,2036	0,2020	0,1692	0,1320	0,1462
C14	7,8619	4,7025	6,4369	8,4430	7,9304	4,8786	7,8983	7,2947	8,0941	8,4767	8,5348	7,9953
C15	0,5708	0,3370	0,4445	0,5917	0,4987	0,3256	0,5227	0,6708	0,5223	0,5786	0,5845	0,5498
C16	16,9291	14,7574	15,5075	17,7607	17,2828	14,3977	16,3771	17,0774	16,9271	17,5788	18,0872	17,0276
C16:1 t	0,1975	0,1072	0,1580	0,2942	0,2078	0,1084	0,1842	0,1735	0,1793	0,2021	0,3521	0,1861
C16:1 c	9,4423	5,2558	7,6292	9,9138	9,7300	5,6316	9,3701	8,9541	10,0829	9,5053	9,5082	9,5419
C17	0,6249	0,2300	0,5341	0,3291	0,5444	0,2097	0,4048	0,3459	0,2230	0,3066	0,0000	0,2930
C17:1	1,4039	0,7559	1,1379	1,3383	1,3020	0,8913	1,4481	1,0968	1,4951	1,5285	0,5464	1,2409
C18	3,2643	3,5879	3,1823	3,3779	3,2379	3,6159	3,3945	3,3719	3,1097	3,2937	3,3882	3,5619
C18:1 t	1,8041	1,0623	1,5092	1,9629	1,4980	1,1788	1,9498	1,2902	1,8842	1,9821	2,0387	1,7566
C18:1 c	9,3338	18,4297	14,3411	7,3426	9,7040	15,3552	8,6940	13,8370	8,4038	9,4347	8,7635	10,0778
C18:2 t	2,3295	1,5960	1,8651	2,5790	0,3904	1,5438	1,1244	2,0479	2,7675	1,8124	2,6885	2,3553
C18:2 c	1,2104	22,7413	11,1845	1,3332	1,4219	21,1708	1,3136	1,5111	1,0977	1,2024	1,2842	1,3517
C18:3 t	0,3727	0,2019	0,2964	0,3893	0,3129	0,2367	0,4006	0,3227	0,4562	0,4193	0,4398	0,3760
C20	0,0698	0,0868	0,0321	0,1283	0,0758	0,0316	0,0318	0,0535	0,0363	0,0426	0,2383	0,0605
C18:3 c n-6	0,2749	0,3267	0,3207	0,2640	0,3501	0,3907	0,4343	0,4069	0,2952	0,2275	0,2311	0,3946
C18:3 c n-3	1,3227	0,8101	1,0608	0,9983	1,3016	0,7323	1,1352	1,1794	1,4025	1,3523	0,6972	1,4284
C20:1	0,3308	0,1358	0,2692	0,2662	0,2478	0,1722	0,3337	0,2004	0,2570	0,3293	3,1053	0,3095
C20:2	0,1729	0,1083	0,1382	0,1784	0,1674	0,1105	0,1711	0,1760	0,1434	0,1682	0,3886	0,1812
C20:3 n-6	0,1063	0,0998	0,1605	0,1554	0,1139	0,1804	0,1458	0,1388	0,1039	0,1060	0,1545	0,1804
C20:3 n-3	0,0472	0,3295	0,0418	0,0658	0,0425	0,0253	0,0503	0,0571	0,0954	0,0582	0,1459	0,0373
C20:4	0,4525	0,5612	0,8155	0,9304	1,5672	0,3713	0,9575	0,9226	1,1739	1,3998	0,9874	1,1898
C22:1	0,8955	0,0438	0,8372	0,1221	0,8867	0,3686	0,4232	0,8429	1,2029	0,9192	0,1607	0,1707
C20:5 (EPA)	17,6216	9,6107	13,8407	18,2441	17,5655	10,8447	18,6670	17,6876	20,0529	17,5262	18,3166	17,8006
C24	0,2224	0,1239	0,0902	0,0813	0,1045	0,1332	0,1075	0,0692	0,0000	0,1066	0,0741	0,1314
C24:1	0,4004	0,2206	0,2959	0,3856	0,4290	0,2188	0,3753	0,0000	0,3518	0,3899	0,0000	0,4020
C22:5 (DPA)	2,0198	1,1242	1,6685	2,0961	1,7762	1,2839	2,3180	1,8133	2,1990	2,1878	2,2674	2,1140
C22:6 (DHA)	11,3111	6,1382	8,6632	11,4791	10,8516	6,5235	11,3543	12,3325	8,6234	10,5221	10,9848	10,8654

(continua)

Figura 42 (continuação)

AG/Amostras	OP_ 37	OP_ 38	OP_ 39	OP_ 40	OP_ 41	OP_ 42	OP_ 43	OP_ 44	OP_ 45	OP_ 46	OP_ 47	OP_ 48
C12	0,2082	0,1550	0,2029	0,1709	0,1127	1,0718	0,1897	0,2244	0,2160	0,0000	0,1472	0,0000
C14	7,4411	8,2662	8,0124	8,0085	5,1562	5,5729	8,7046	7,7016	0,0521	0,2677	10,0800	0,0000
C15	0,6640	0,5634	0,5197	0,5903	0,3506	0,5643	0,6099	0,6620	0,0481	0,2710	0,1859	0,0000
C16	17,1363	17,1863	16,9034	17,6704	14,6842	17,1236	18,8462	17,5424	0,2908	0,4063	0,2457	1,5310
C16:1 t	0,1762	0,4451	0,1797	0,1794	0,1163	0,2039	0,4946	0,5586	0,0000	0,5716	0,0000	0,0000
C16:1 c	8,9144	9,5233	10,0890	9,2840	5,9259	9,8298	9,9064	8,9921	0,0341	0,5993	11,2988	0,0000
C17	0,3598	0,3178	0,2232	0,3138	0,1779	0,3136	0,3542	0,3779	0,0313	0,0353	0,3946	0,0000
C17:1	1,0875	0,4108	1,4828	1,2182	0,8588	1,4614	0,9865	1,1638	0,0000	0,1077	0,0000	0,0000
C18	3,3701	3,2591	3,1255	3,3334	3,5934	3,3339	3,5652	3,3756	0,0759	0,7593	3,9829	4,3899
C18:1 t	1,3145	1,9625	1,8920	1,7286	1,2506	1,9224	1,7184	1,4118	0,0351	0,6746	0,2757	0,5682
C18:1 c	10,7532	9,2773	8,4477	10,0114	16,3274	9,3365	6,5034	8,1687	0,4260	2,5419	17,1308	8,8815
C18:2 t	2,0324	2,5131	1,9770	2,5461	1,2800	2,4528	2,6201	2,3323	0,0000	0,3617	0,2357	0,7043
C18:2 c	1,4524	1,2651	1,1055	1,3879	20,0167	1,2592	1,5179	1,5058	0,2980	0,5014	2,7077	0,8495
C18:3 t	0,2873	0,3827	0,4237	0,3703	0,2414	0,3844	0,3794	0,3069	0,0000	0,1123	0,0242	0,0000
C20	0,0526	0,2765	0,0350	0,0489	0,0000	0,0426	0,4070	0,5037	0,0000	0,0000	0,4343	0,2423
C18:3 c n-6	0,4122	0,2382	0,3015	0,3451	0,4004	0,2792	0,2681	0,2336	0,0000	0,9236	1,4209	0,1265
C18:3 c n-3	1,1887	1,2915	1,4067	1,2902	0,7247	1,3201	1,4779	1,3576	0,0559	3,3150	0,1065	1,3940
C20:1	0,2048	0,3439	0,1982	0,2591	0,1835	0,3481	0,2678	0,2125	0,0000	0,5800	0,1354	0,0502
C20:2	0,1867	0,1696	0,1168	0,1620	0,1155	0,1772	0,1811	0,1856	0,0000	0,4409	0,0804	0,0000
C20:3 n-6	0,1406	0,1471	0,1023	0,1597	0,1116	0,1103	0,2024	0,1610	0,1408	0,2507	0,2392	0,0000
C20:3 n-3	0,0493	0,1254	0,0540	0,0414	0,0563	0,0528	0,1315	0,1530	0,0000	0,1217	0,6414	0,1015
C20:4	0,9352	0,9643	1,2313	1,1260	0,6857	1,0418	1,3135	1,4339	0,0453	0,2097	0,0000	0,0000
C22:1	1,4124	0,1510	1,7052	0,4935	0,0803	0,6754	0,1771	0,1952	2,9078	4,9593	0,0000	0,0000
C20:5 (EPA)	17,5567	17,6497	20,2330	17,7799	11,3705	18,1486	18,9442	18,7107	44,9765	36,7372	22,2615	41,1575
C24	0,0860	0,0695	0,0716	0,0334	0,0548	0,0490	0,0958	0,0984	0,0000	0,0522	0,8593	0,0000
C24:1	0,4473	0,3719	0,3612	0,3712	0,2281	0,3937	0,3839	0,4071	0,0000	0,0747	0,0000	0,0000
C22:5 (DPA)	1,8660	2,0773	2,2558	2,0175	5,4714	4,3168	1,9995	1,8397	3,2929	6,3245	2,4455	5,4714
C22:6 (DHA)	12,3260	10,9624	8,8086	10,6578	28,6725	28,0908	10,5686	12,3084	38,2452	28,2157	16,6155	28,6725

(continua)

Figura 42 (conclusão)

AG/Amostras	OP_49	OP_50	OP_51	Anchova*	Atum*	Arenque*	Salmão Selvagem*	Salmão Cativoiro*
C12	0,0000	0,0000	0,1293					
C14	0,0000	0,0000	8,0421	2,7-11,5	ND-5,0	8,0-11,0	2,0-5,0	1,5-5,5
C15	0,0276	0,0000	0,2084	ND-1,5	ND-2,0	ND-1,0	ND-1,0	ND-0,5
C16	9,5817	19,8201	17,7728	13,0-22,0	14,0-24,0	18,0-20,0	10,0-16,0	6,5-12,0
C16:1 t	0,2144	0,5079	0,2220					
C16:1 c	4,7842	10,2572	9,3539	4,0-12,6	ND-12,5	9,0-13,0	4,0-6,0	2,0-5,0
C17	0,1703	0,4034	1,0199	ND-2,0	ND-3,0	ND-1,0	ND-1,0	ND-0,5
C17:1	0,0220	0,0522	0,0000					
C18	2,1658	3,6975	3,3078	1,0-7,0	ND-7,5	2,5-4,0	2,0-5,0	2,0-5,0
C18:1 t	0,7524	1,5001	0,4492					
C18:1 c	23,7853	9,7244	14,1981	3,6-17,0	10,0-25,0	5,5-8,5	8,0-16,0	30,0-47,0
C18:2 t	0,1517	0,0302	0,1086					
C18:2 c	1,2183	2,4771	2,0989	ND-3,5	ND-3,0	2,0-3,5	1,5-2,5	8,0-15,0
C18:3 t	0,1671	0,3658	0,0496					
C20	0,6950	1,5187	0,3618	ND-1,8	ND-2,5	0,1-0,5	ND-0,5	0,1-0,5
C18:3 c n-6	0,0000	0,0000	0,0000	ND-5,0	ND-4,0	ND-2,5	ND-2,0	ND-0,5
C18:3 c n-3	0,1592	0,0000	0,2893	ND-7,0	ND-2,0	ND-2,0	ND-2,0	3,0-6,0
C20:1	0,1361	0,2417	0,0000	ND-4,0	ND-2,5	ND-0,5	2,0-10,0	1,5-7,0
C20:2	0,0818	0,0969	0,0000					
C20:3 n-6	0,0981	0,0000	0,0000					
C20:3 n-3	0,3952	0,0000	0,0493					
C20:4	0,1350	0,2918	0,0000	ND-2,5	ND-3,0	ND-2,0	0,5-2,5	ND-1,2
C22:1	0,0000	0,0000	0,0000	ND-2,3	ND-2,0	0,1-0,5	ND-1,5	3,0-7,0
C20:5 (EPA)	16,7793	20,7617	18,4317	5,0-26,0	2,5-9,0	12,5-19,0	6,5-11,5	2,0-6,0
C24	0,0000	0,0000	0,0000					
C24:1	0,0000	0,0000	0,0000					
C22:5 (DPA)	4,3168	2,1121	2,0402	ND-4,0	ND-3,0	2,0-3,0	1,5-3,0	1,0-2,5
C22:6 (DHA)	28,0908	17,7564	13,8384	4,0-26,5	21,0-42,5	5,0-11,5	6,0-14,0	3,0-10,0

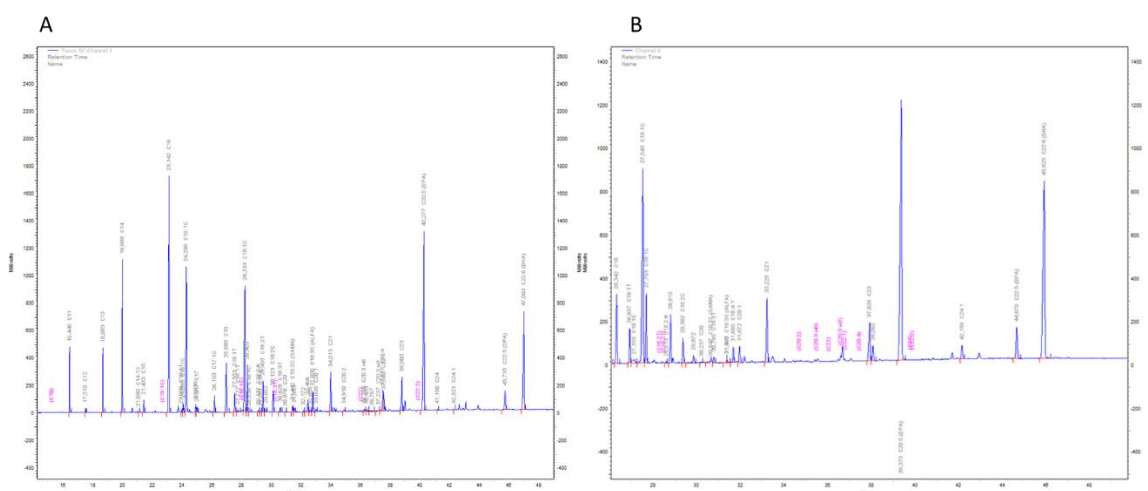
Fonte: Autora; *Codex Alimentarius (2021)

De acordo com a Tabela 42, verificamos que a maioria das amostras de óleo de peixe apresenta o mesmo comportamento. Predominam os AGs C16:0, C14:0 e C18:0; os AGMs; os AGs C18:1c e C16:1c. Nos AGPI n-6, os AGs C18:2c e C18:3 n-6, e para os AGPI n-3, o EPA, DHA e DPA, similar aos trabalhos de Tatarczuk *et al.* (2007); Hamilton *et al.* (2010); Kolanowski *et al.* (2010); Stankova *et al.* (2013); e Gouvea *et al.* (2019).

A proporção de 18% de EPA e 12% de DHA foi observado na maioria das amostras, sugerindo ser óleo extraído de anchova, de acordo com o perfil de AG do Codex Alimentarius. Nas amostras OP 8, OP 9, OP 13, OP 15, OP 16, OP 45, OP 46 e OP 47, foi verificada maior quantidade de EPA e DHA, e a diminuição dos AGs C16:0, C18:0, C18:1 e C18:2, quando comparados com a maioria das amostras.

E nas amostras com menor quantidade de EPA e DHA (OP 26, OP 27 e OP 30), notou-se aumento dos AGs C18:1c e C18:2c. Diferentemente de outros trabalhos, neste estudo, foi determinada a quantidade de AGT nas amostras de óleo de peixe, e observa-se cerca de 0,5% em EMAG do C18:3 t, 1,5% em EMAG do C18:1 t; e 2,0% em EMAG do C18:2 t. Como os trabalhos são escassos, não é possível afirmar que esses AGs foram formados durante o processamento do óleo de peixe, ou são exógenos. Na Figura 43, observa-se um cromatograma para amostra de óleo de peixe.

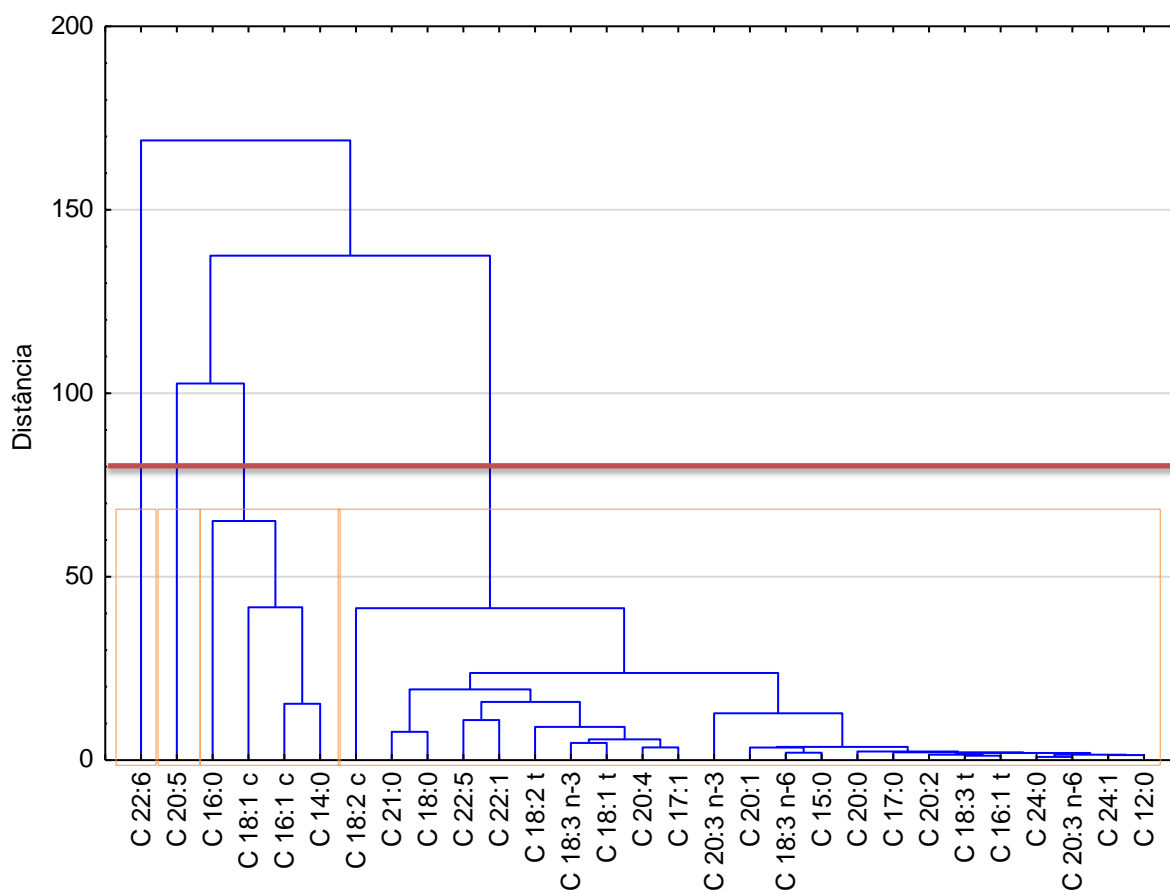
Figura 43 - Cromatograma de uma amostra de óleo de peixe



Fonte: ChromQuest. A: cromatograma geral; B: detalhes da região de eluição dos AGPI n-3.

Foram utilizadas análises multivariadas, a fim de classificar e/ou agrupar as amostras de óleo de peixe comercializadas no Estado de São Paulo, de acordo com o perfil de AGs; para isso, utilizou-se o *software* Statistica, Tbisco. Na Figura 44, pode-se observar o gráfico de dendograma para os AGs, ou seja, esses foram agrupados, a fim de verificar suas semelhanças; para isso, foi utilizada a distância euclidiana.

Figura 44 - Dendograma das variáveis (ácidos graxos) para as amostras de óleo de peixe comercializados no Estado de São Paulo



Fonte: *Software* Statistica.

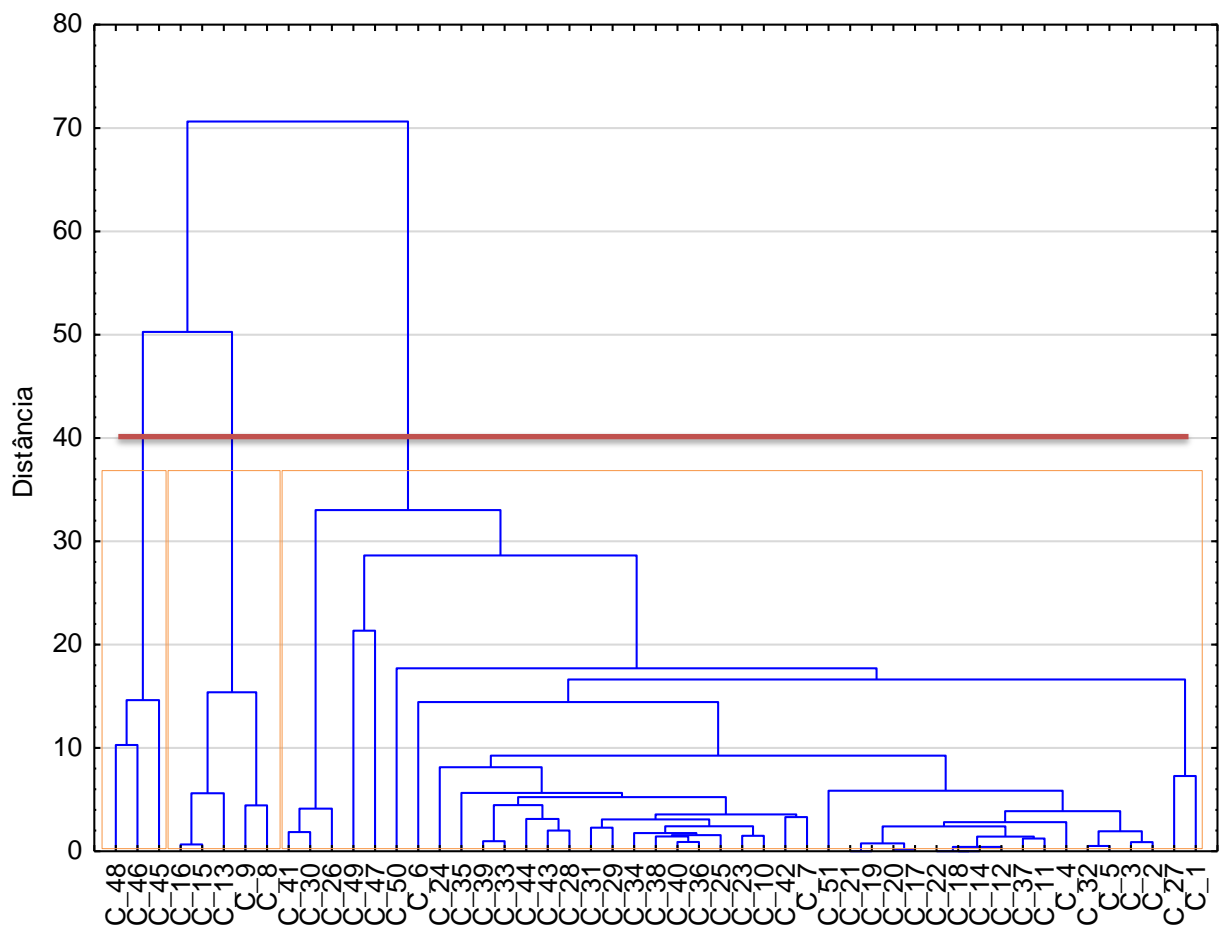
Para a formação dos grupos, utilizou-se o corte (reta vermelha) em que ocorreu uma variação expressiva da distância; desse modo, há 4 grupos: Grupo 1: C18:2c, C21:0, C18:0, C22:5, C22:1, C18:2t, C18:3 n-3, C18:1 t, C20:4, C17:1, C20:3 n-3, C20:1, C20:3 n-6, C15:0, C20:0, C17:0, C18:3 t, C16:1t, C24:0, C20:3

n-6, C24:1 e C12:0; Grupo 2: C16:0, C18:1 c, C16:1 c e C14:0; Grupo 3: C20:5 e Grupo 4: C22:6.

Demonstrando que os AGs EPA e DHA são importantes, pois formaram grupos isolados e são característicos para as amostras de óleos de peixe estudadas, também se observa a importância dos AGs que formaram o Grupo 2, uma vez que, na Tabela 42, verificamos que há uma variação do seu conteúdo nas amostras. Portanto, de acordo com o dendograma da Figura 44, podemos inferir que, para caracterizar um óleo de peixe, a análise dos AGs C16:0, C18:1 c, C16:1 c, C14:0, EPA e DHA são muito importantes.

Na Figura 45, consta o dendograma construído a partir das amostras, pela distância euclidiana.

Figura 45 - Dendograma das amostras de óleo de peixe comercializados no Estado de São Paulo



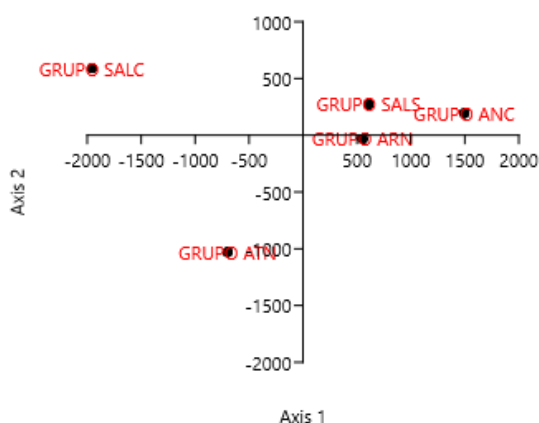
Fonte: Software Statistica.

Na Figura 45, observa-se a análise multivariada das amostras, ou seja, de acordo com o cálculo da distância euclidiana, há o agrupamento das amostras. E, nesse caso, formaram-se três grupos, conforme o posicionamento da linha vermelha e os retângulos laranjas. Grupo 1: amostras OP 48, OP 46 e OP 45; Grupo 2: amostras OP 16, OP 15, OP 13, OP 9 e OP 8; Grupo 3: as demais 44 amostras.

Portanto, de acordo com a formação de agrupamento, a maioria das amostras (Grupo 3) tem características similares para o perfil de AGs; as amostras do Grupo 1 possuem quantidades maiores de AGs poli-insaturados, e AGS, AGM e AGT menores, e as amostras do Grupo 2 possuem os AGs C14:0, C16:0, C18:1c, C18:2c menores do que os do Grupo 3 (Tabela 42).

Como no rótulo dos produtos analisados não há a informação sobre a espécie de peixe, foi utilizada uma modelagem estatística para prever essas espécies. Portanto, para classificar os óleos de peixe analisados neste estudo, de acordo com a espécie de peixe, realizou-se a análise multivariada por discriminante. No primeiro momento, foi realizada uma regra de classificação com os dados do perfil de AGs fornecido pelo Codex Alimentarius, para cada tipo de espécie, apresentados na Tabela 42. Na Figura 46, pode-se observar os grupos formados, de acordo com dados do Codex Alimentarius.

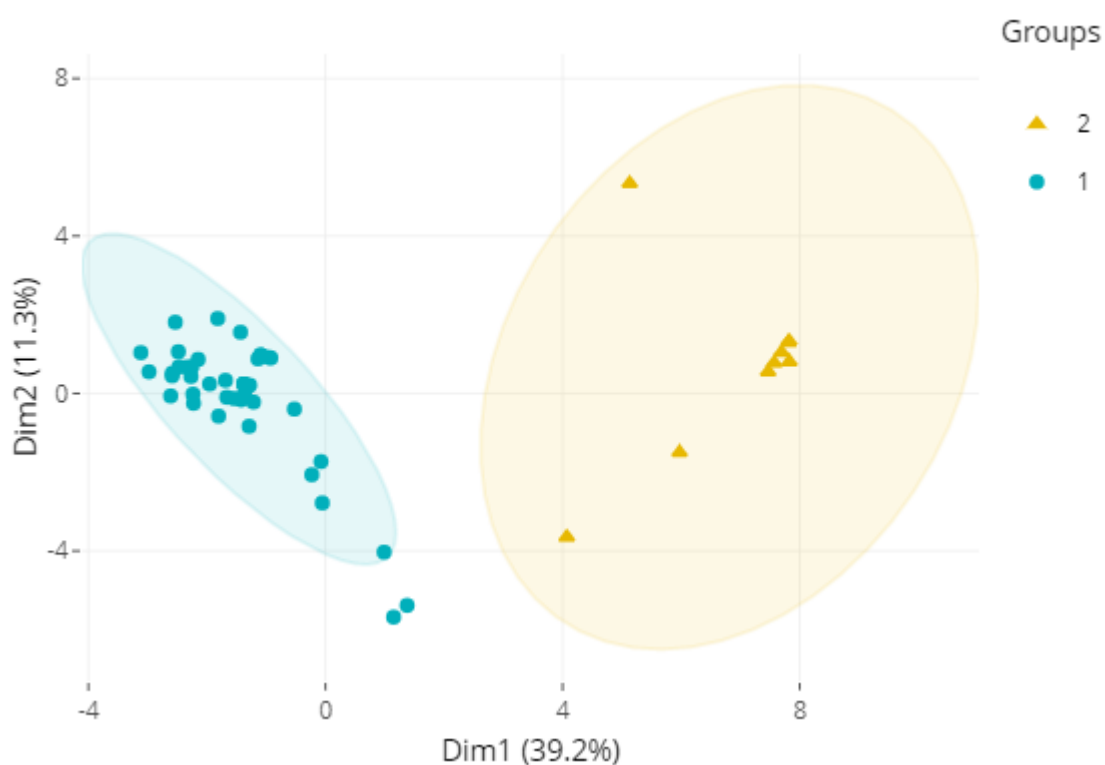
Figura 46 - Análise discriminante do perfil de ácidos graxos das espécies de peixe, de acordo com o Codex Alimentarius



Fonte: *Software* Statistica.

Observam-se, na Figura 46, os cinco grupos bem definidos: ANC – anchova; ATN – atum; ARN – arenque; SALS – salmão selvagem; e SALC – salmão de cativo. Após confirmar essa formação dos grupos, foi realizada a classificação das amostras de óleo de peixe comercializadas no Estado de São Paulo, como consta na Figura 47.

Figura 47 - Classificação das amostras de óleo de peixe comercializadas no Estado de São Paulo, de acordo com a espécie



Fonte: *Software R-Studio*.

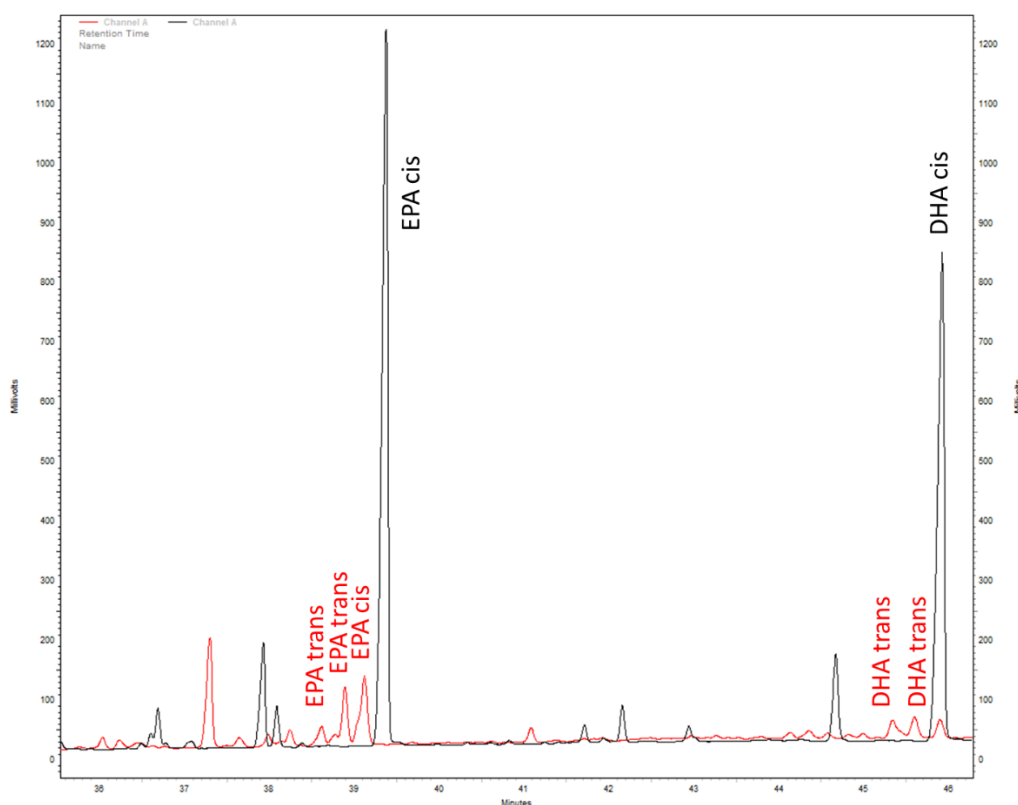
De acordo com a classificação realizada pela análise de discriminante, foram identificadas duas espécies de peixe, nas amostras, sendo o Grupo 1 (azul), da espécie Arenque; e o Grupo 2 (laranja), de Atum. As amostras classificadas no Grupo 2 foram: OP 8, OP 9, OP 13, OP 15, OP 16, OP 45, OP 46, OP 48 e OP 49. O óleo extraído de arenque permeia 82% das amostras dos suplementos de óleo de peixe analisados neste estudo. Cabe ressaltar, que a classificação realizada dos óleos de peixe comercializados no Estado de São Paulo, foi realizada com uma ferramenta estatística, deste modo não se tem o

conhecimento da espécie de peixe utilizada nestes óleos, uma vez que no rótulo destes produtos não há essa informação.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ISÔMEROS *TRANS* DOS ÁCIDOS GRAXOS EPA E DHA

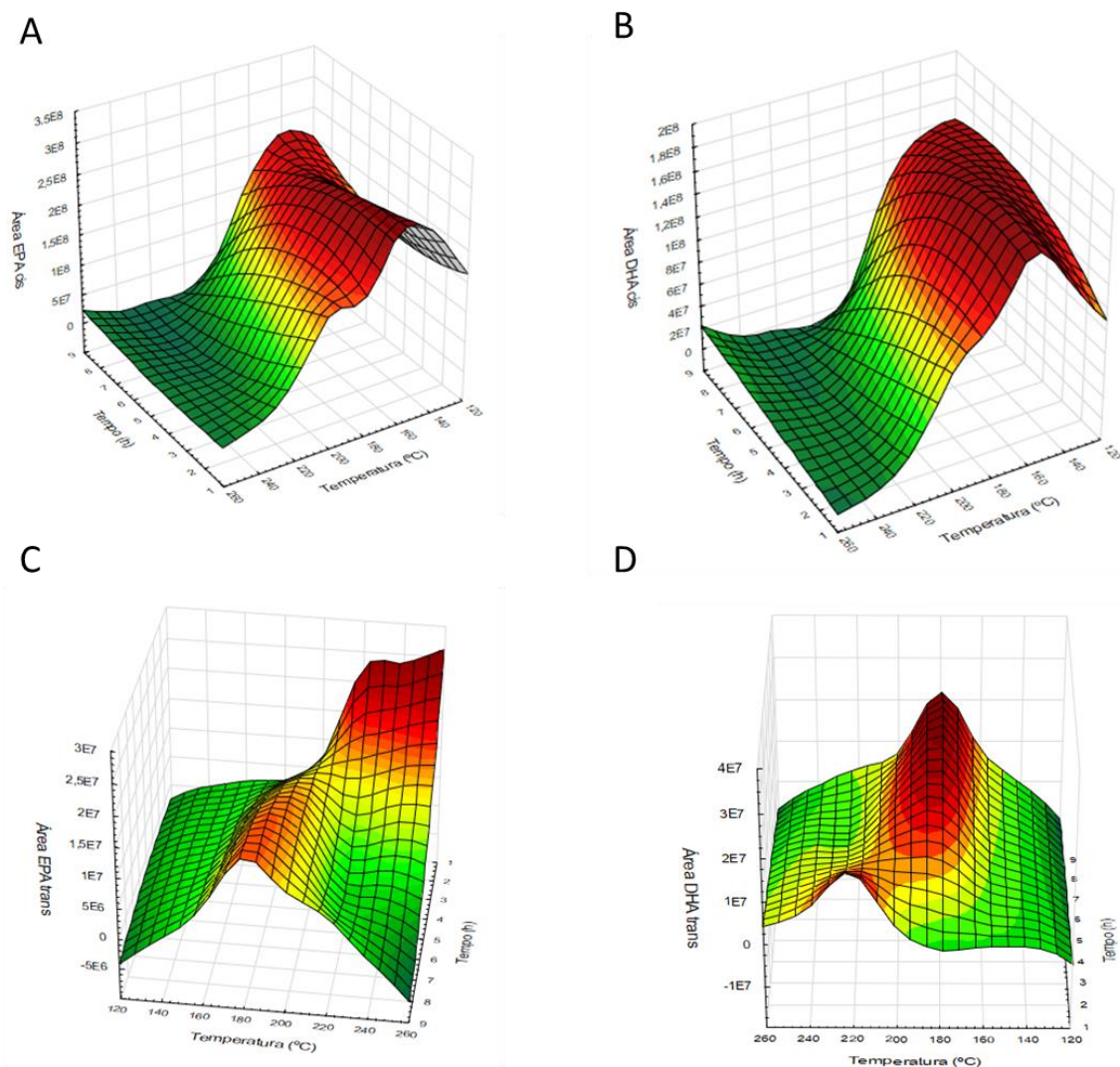
Para a formação dos isômeros dos AGs EPA e DHA, foi realizado um estudo prévio, como consta na Tabela 14. Para avaliar o melhor tempo e a temperatura, foi gerada uma superfície de resposta com os valores analisados dos isômeros *cis* do EPA e DHA e os isômeros nomeados como *trans* do EPA e DHA, conforme identificado na Figura 48. Na Figura 49, podem ser observadas as superfícies de respostas geradas para a amostra OP 47, a partir das áreas dos picos identificados na Figura 48.

Figura 48 - Cromatogramas da amostra OP 47 - identificação dos isômeros dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)



Fonte: ChromQuest e autora. Linha preta – cromatograma da amostra OP 47, sem aquecimento. Linha vermelha – cromatograma após aquecimento (200°C por 6 horas).

Figura 49 - Superfícies de respostas relacionando a temperatura, o tempo e a área de cada ácido graxo após estudo em mufla



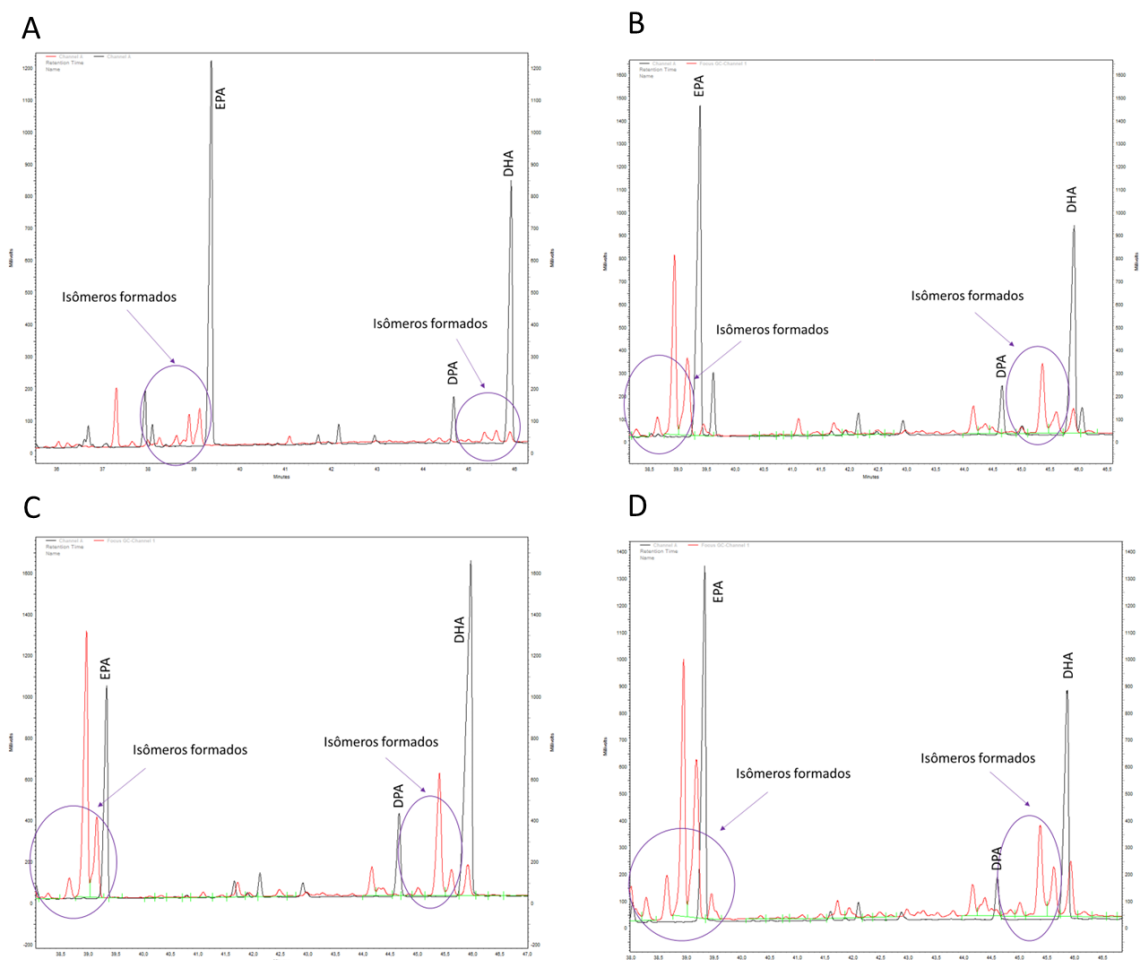
Fonte: Software Statistica. A: área de EPA *cis*; B – área de DHA *cis*, C – área de EPA *trans*; D: área de DHA *cis*. Áreas vermelhas – quantidades maiores; áreas verdes – quantidades menores

A partir das superfícies de respostas observadas na Figura 49, determinou-se que, na temperatura de 200°C e com o tempo de 6 horas, encontram-se os AGs EPA e DHA e a formação dos isômeros desses AGs.

Desse modo, as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51 foram submetidas ao aquecimento em forno Mufla por 6 horas, a 200°C.

Após esse período de aquecimento, as amostras foram resfriadas em dessecador, até atingir a temperatura ambiente e esterificadas segundo o método otimizado neste estudo. As amostras esterificadas foram analisadas por CG e por RMN. Na Figura 50, pode-se observar a análise dos AGs por CG/DIC, para as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51, ressaltando que os cromatogramas na cor preta são para as amostras sem o aquecimento e na cor vermelha após o aquecimento em forno Mufla.

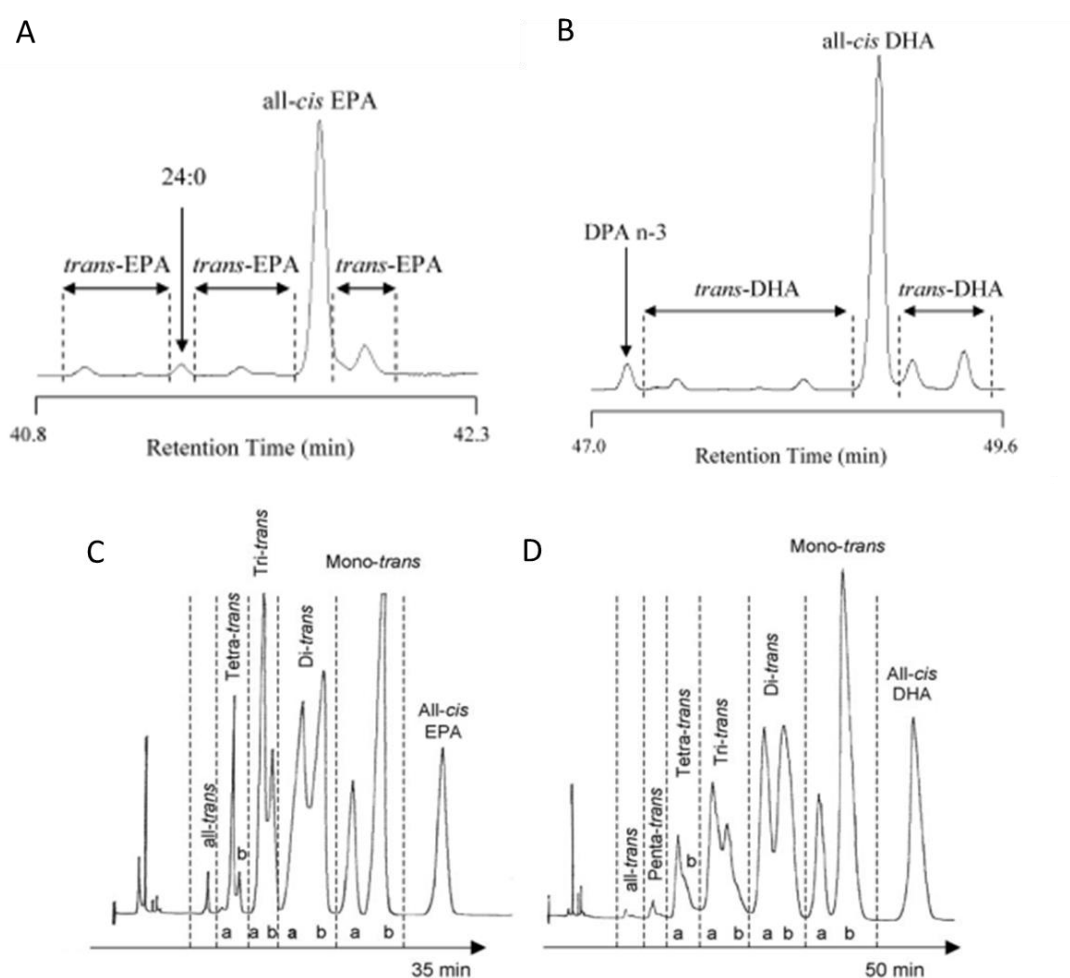
Figura 50 - Cromatogramas das amostras OP 47 (A), OP 48 (B), OP 49 (C) e OP 51 (D), após aquecimento a 200°C, por 6 horas



Fonte: ChromQuest e Autora. Linha preta: cromatograma das amostras sem aquecimento; linha vermelha: cromatograma das amostras após o aquecimento. DPA: ácido docosapentaenóico.

Portanto, como pode ser verificado na Figura 50, após o aquecimento, formaram-se picos cromatográficos próximos à região de eluição do EPA e DHA. De acordo com estudos de Fournier *et al.* (2006; 2007), as regiões circuladas nos cromatogramas identificados como isômeros, formados na Figura 50, possivelmente, são isômeros *trans* dos AGs EPA e DHA, como pode ser observado na Figura 51.

Figura 51 - Identificação dos isômeros *trans* dos ácidos graxos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)



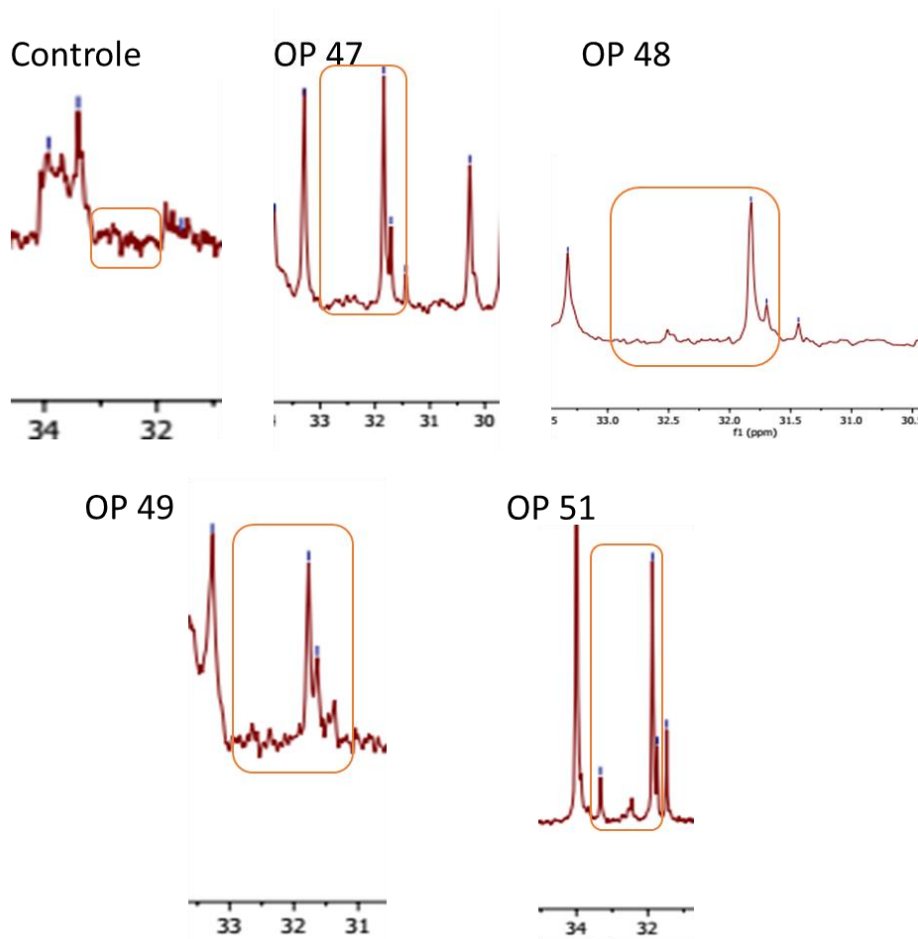
Fonte: Fournier *et al.* (2006; 2007).

Para confirmar que os picos cromatográficos são isômeros *trans* de EPA e DHA, foi realizada a análise das amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51, por RMN de ^{13}C .

A espectroscopia de RMN é utilizada para identificar as ligações entre carbono e hidrogênio de uma substância orgânica, por meio da oscilação dos spins dos átomos quando um campo magnético constante é aplicado nessa substância. O espectro de RMN apresenta os sinais de frequência da oscilação dos spins versus a sua intensidade. Os sinais em um espectro de RMN ^{13}C nos informa os diferentes tipos de carbonos que uma substância possui (BRUICE). A espectroscopia de RMN de alta resolução de ^{13}C , tem sido amplamente utilizada, como um método confiável para a determinação de AGs, como AGS, AGM, AGPI e AGT, diferenciação dos isômeros *cis* e *trans* e verificação das autenticidades dos óleos (GAO *et al.*, 2009).

De acordo com as literaturas estudadas, há duas regiões do espectro de RMN de ^{13}C características para avaliar a configuração *trans*. Gao *et al.* (2009) e Pfeffer *et al.* (1977) demonstraram que, na região de deslocamento químico (δ) entre 32,1 e 32,7 ppm, é similar à configuração *trans* dos AGs. Na Figura 52, pode ser observada essa região nas amostras controle (sem aquecimento), OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51.

Figura 52 - Espectro de RMN para ^{13}C da região de deslocamento característica de ácidos graxos *trans* para as amostras controle, OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51.



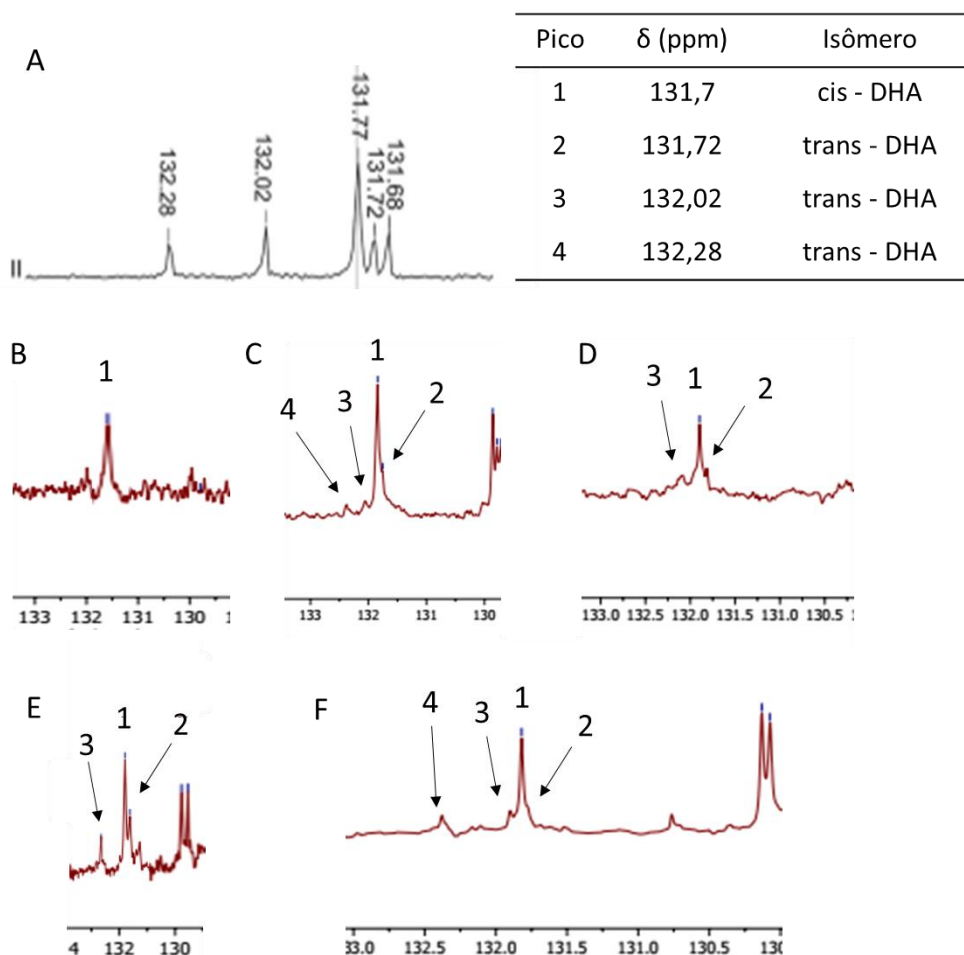
Fonte: *Software* MNova e autora.

Na Figura 52, são comparados os espectros de RMN de ^{13}C para as amostras controle, OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51, e observado que na amostra controle não há nenhum pico na região de δ entre 33 e 32 ppm, destacada em laranja, e nas demais amostras, há formação de picos próximos ao δ de 32 ppm, sugerindo, de acordo com Gao *et al.* (2009) e Pfeffer *et al.* (1977), que esses picos são de AGs *trans* dessas amostras. Observando a Figura 50, do perfil de AGs analisados por CG, pode-se propor que os picos dos isômeros formados são EPA e DHA, na configuração *trans*, uma vez que não foi identificado um aumento dos demais AGs nas amostras. Além disso, tanto nas amostras controle analisadas por CG, como na amostra controle analisada por RMN de ^{13}C , não foram verificados picos nas regiões identificadas nas amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51, após o aquecimento.

Corroborando com essa inferência, Menounou *et al.* (2018) identificaram, na região de δ entre 133 e 130 ppm, os isômeros *cis/trans* de éster metílico de

DHA; desse modo, na Figura 53, verificamos os espectros de RMN de ^{13}C para a amostra controle e as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51.

Figura 53 - Espectros de RMN de ^{13}C na região dos isômeros *cis/trans* dos ésteres metílicos do DHA para as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51



Fonte: *Software MNova*, adaptado de Menounou *et al.* (2018) e autora. A: espectro de RMN e tabela observados no estudo de Menounou *et al.* (2018); B: Amostra Controle; C: Amostra OP 47; D: Amostra OP 48; E: Amostra OP 49; F: Amostra OP 51.

Portanto, de acordo com a Figura 53, constata-se que, na amostra controle, apenas foi identificado o isômero *cis* do DHA, em δ próximo de 131,7ppm; nas amostras submetidas a aquecimento, foram verificados picos correspondentes a isômeros *trans* de DHA, observado na tabela da Figura 53, segundo Menounou *et al.* (2018). Portanto, podemos propor que os isômeros observados na Figura 50 são AGs na configuração *trans* de EPA e DHA.

Sciotto e Mjos (2012) analisaram em 77 amostras de óleos de peixe comercializadas na Europa, *trans* de EPA e DHA, e verificaram que, em 19

amostras, a % de isômeros *trans* de EPA, do total de EPA, foi considerado alto (acima de 1,89%) e, em 23 amostras para DHA, a % de isômeros *trans* do total de DHA foi acima de 2,5%, considerado alto para os autores (SCIOTTO; MJOS, 2012). Ácidos graxos *trans* de EPA e DHA podem ser formados no processo de desodorização do óleo de peixe em diferentes temperaturas; desse modo, esse processo deve ser controlado para se obter óleo de peixe com boa qualidade nutricional (FOUNIER *et al.* 2007).

Em nosso estudo (Figura 49), observamos a formação de isômeros *trans* de EPA e DHA, em aquecimento de 2 horas a 180°C. Outra possível fonte desses isômeros *trans* pode ser o processo de destilação utilizado para concentrar EPA e DHA em óleos de peixe (SCIOTTO; MJOS, 2012).

Há poucas informações dos efeitos biológicos dos isômeros *trans* de EPA e DHA. Considerando as diferentes funções biológicas exercidas pelos isômeros *trans* do C18:1, analisando analogamente, espera-se que os isômeros *trans* do EPA e do DHA tenham efeitos semelhantes aos *trans* do C18:1 (SCIOTTO; MJOS, 2012).

Os isômeros *trans* de EPA são alongados e dessaturados em AGs *trans* C22:5 e C24:5; os isômeros *trans* da EPA comportam-se de forma diferente que *cis* EPA na síntese de eicosanóides (LOÏ *et al.*, 2000) Foi também demonstrado que *trans* EPA e *trans* DHA têm efeitos diferentes dos seus análogos *cis* sobre agregação plaquetária (LOÏ *et al.*, 1998; O'KEEFE *et al.*, 1990).

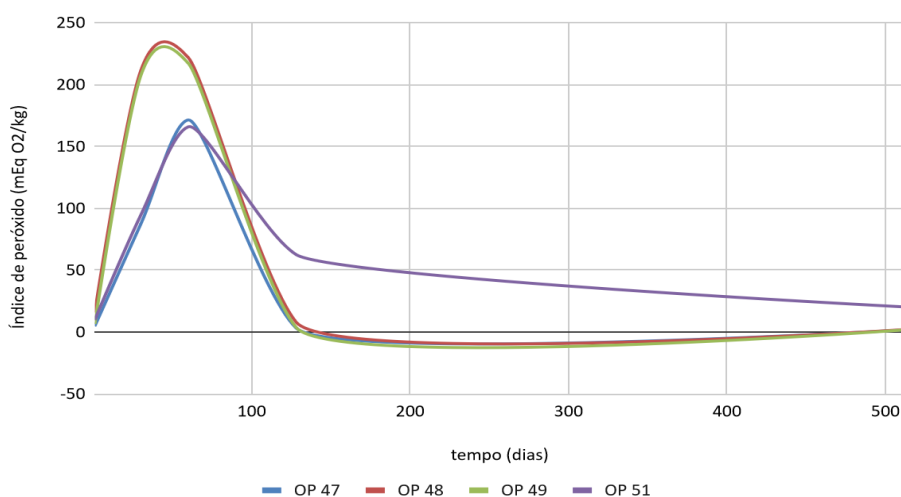
Atualmente, não há conhecimentos necessários para avaliar quais níveis de *trans* EPA e DHA podem ter efeitos negativos para a saúde humana. Portanto, são necessários mais estudos sobre os efeitos biológicos dos isômeros *trans* de EPA e DHA. Entretanto, o monitoramento da quantidade desses isômeros deve ser incentivado.

4.6 ESTUDO DE ESTABILIDADE DOS ÓLEOS DE PEIXES COMERCIAIS

Os testes de estabilidade oxidativa são normalmente usados para avaliar o prazo de validade dos óleos de peixe, mas, a fim de completar os testes em tempo razoável, a temperatura elevada é frequentemente utilizada para acelerar a oxidação (SULLIVAN; BUDGE; ST-ONGE, 2011).

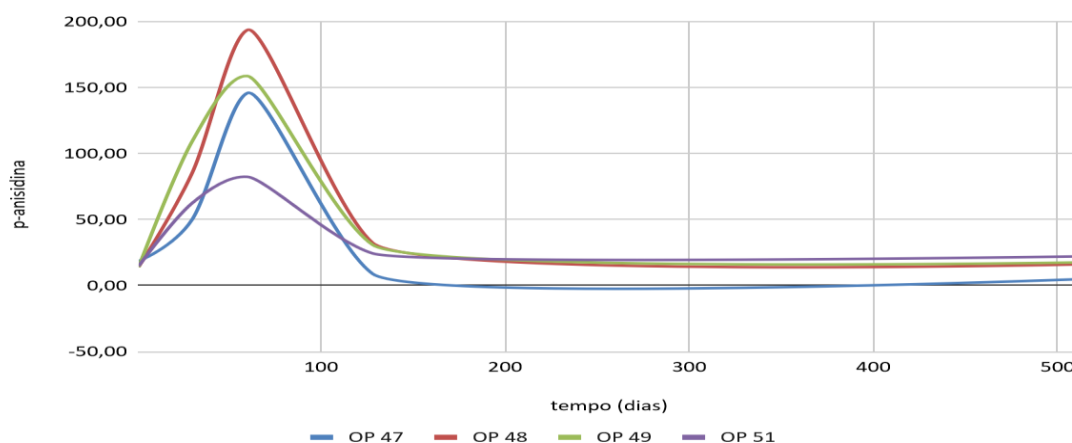
Nas amostras utilizadas para o estudo de estabilidade acelerado, foram avaliados os índices de acidez e peróxido, p-anisidina, EPA e DHA. Os valores do índice de acidez nos óleos de peixe, utilizando as diferentes condições de tempo e temperatura, não alcançaram o valor de 3mg KOH/g, preconizado como limite pelo Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS, 2017) e, portanto, não foram utilizados para o estudo de estabilidade. Nas Figuras 54 e 55 observam-se os valores de índice de peróxido e p-anisidina, em relação ao tempo em dias, considerando o tempo e a temperatura em que as amostras permaneceram em estufa, refletindo que, a cada aumento de 10°C na temperatura (BRASIL, 2019), o tempo real é duplicado (Tabela 15). Como o cálculo de ToTox utiliza esses índices, esse não foi avaliado.

Figura 54 - Valores de índice de peróxido (mEq O₂/kg) analisados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerado



Fonte: Autora.

Figura 55 - Valores de p-anisidina observados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerado



Fonte: Autora.

Tanto o índice de peróxido (PV), como o de p-anisidina, demonstraram um comportamento similar, ou seja, em forma de parábola, com o valor máximo atingido em torno de 60 dias. Desse modo, se considerarmos esses índices para avaliar a vida de prateleira dos óleos de peixe encapsulados, para o índice de peróxido, em apenas alguns dias de envase, o produto não estaria adequado para consumo, pois teria o limite de 5mEq O₂/Kg estabelecido pelo Codex Alimentarius (CODEX ALIMENTARIUS, 2021) alcançado; como pode ser observado na Tabela 21, a maioria das amostras, no momento da análise, estava acima do limite estabelecido (CODEX ALIMENTARIUS, 2021).

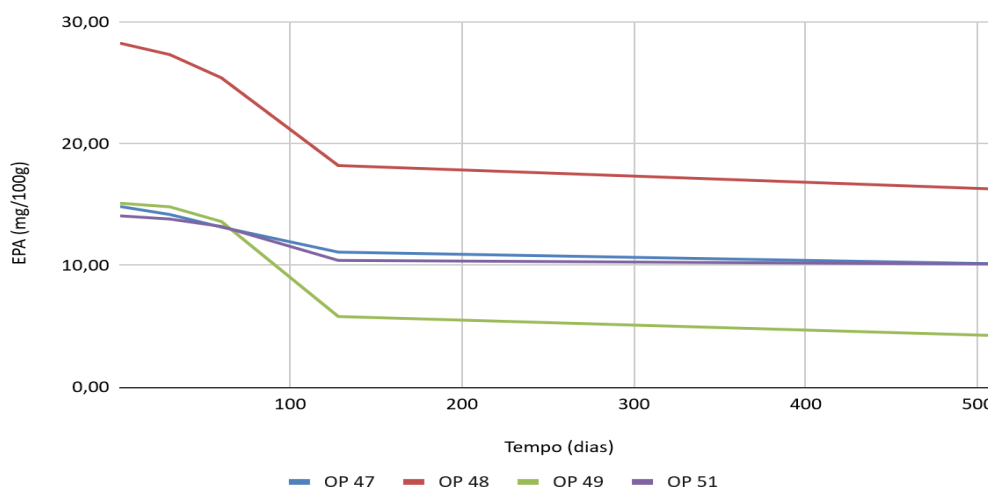
No caso da p-anisidina, esse limite foi verificado antes de 30 dias, revelando, assim, que esse produto pode estar sendo consumido com esse parâmetro de oxidação alterado. Sullivan; Budge e St-Once (2011) verificaram um aumento expressivo para os níveis de PV em óleo de peixe, realizando o estudo de estabilidade acelerada, compatíveis com valores observados em nosso estudo. Wang *et al.* (2011) verificaram, durante 66 dias de armazenamento a 30°C, a elevação do valor de PV inicialmente próximo de 10 mEq O₂/Kg e, no término do estudo, uma estabilidade próxima a 90mEq O₂/Kg, ou seja, um comportamento similar ao encontrado em nosso estudo.

Na temperatura de 60°C, os óleos oxidam mais rapidamente, provavelmente devido à decomposição dos hidroperóxidos mais acelerada do

que poderiam formar, refletindo um decaimento do valor de PV (SULLIVAN; BUDGE; ST-ONGE, 2011).

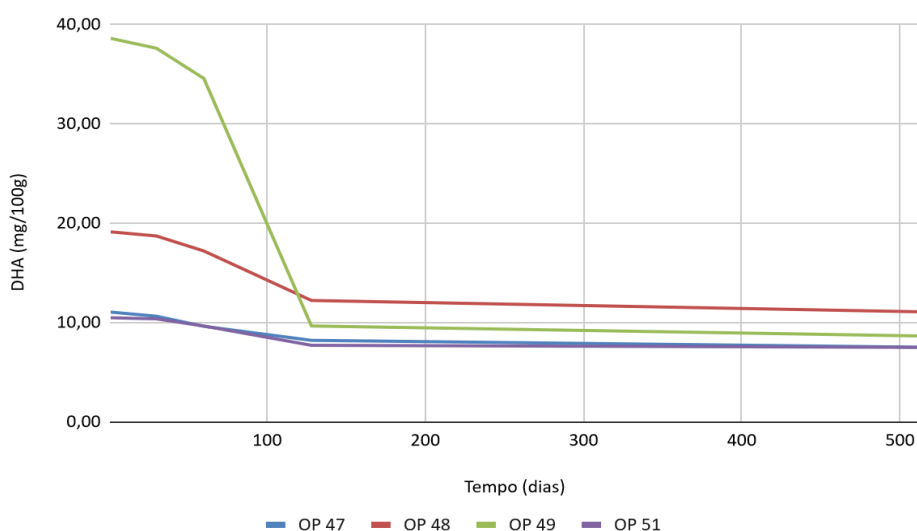
Nas Figuras 56 e 57, pode-se observar o comportamento do EPA e DHA em relação ao tempo em dias; os valores desses ácidos graxos decrescem no decorrer do tempo, revelando que podem estar sofrendo reações de oxidação, diminuindo assim sua concentração, e que, após 120 dias, há uma estabilidade nesses valores.

Figura 56 - Comportamentos dos valores de EPA (mg/100g) quantificados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerada



Fonte: Autora.

Figura 57 - Comportamento dos valores de DHA (mg/100g) quantificados nas amostras comerciais de óleo de peixe submetidos ao estudo de estabilidade acelerada



Fonte: Autora.

Independentemente das quantidades de EPA e DHA, nas amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51, foi verificado que, em 60 dias, não poderiam ser consideradas aptas ao consumo, devido à diminuição nas quantidades de EPA e DHA, superior a 20%. Na amostra OP 47, foram verificadas as maiores diferenças entre a quantidade de EPA e DHA (primeiro ensaio e no último ensaio), com diminuição de 72% e 77%, respectivamente, para cada AG. No caso da amostra OP 51, foram observadas as menores reduções, o que pode ser justificado pela adição de antioxidante nesse óleo.

O comportamento verificado nas Figuras 56 e 57 foi observado por Lee *et al.* (2003), em estudo acelerado para óleo de peixe por 10 dias, a 80°C, demonstrando uma perda de 60% da massa de DHA e de 15% de EPA. Polavarapu *et al.* (2011) demonstraram que houve diminuição de 10% de DHA e 5% de EPA, durante o armazenamento à temperatura ambiente por 3 meses. WANG *et al.* (2011) também observaram a diminuição dos AGPI, durante o período de armazenamento (30°C por 65 dias), de 60% para cerca de 30%.

Alimentos com níveis mais elevados de AGPI, como é o caso dos óleos de peixe, são mais vulneráveis ao ranço oxidativo e as alterações, tanto na temperatura como no tempo, têm efeito significativo na oxidação. Desse modo,

o óleo de peixe deve ser armazenado em baixas temperaturas e com adição de antioxidantes (WANG *et al.*, 2011).

4.7 ESTUDO DAS VARIÁVEIS NO PROCESSO DE OXIDAÇÃO DOS ÓLEOS DE PEIXE

A suscetibilidade da peroxidação lipídica nos alimentos depende da composição lipídica; de pró-oxidantes e antioxidantes; níveis de oxigênio; temperatura; luz; e métodos de processamento, ou seja, alimentos ricos em AGPI são mais suscetíveis à oxidação lipídica. Da mesma forma, a presença de pró-oxidantes, como metais ativos redoxes (Fe, Cu) e hemeoproteínas, exposição a altos níveis de oxigênio e a altas temperaturas, pode acelerar o processo de oxidação.

A oxidação lipídica gera problemas no processamento e armazenamento de alimentos, afetando negativamente o sabor do alimento, devido à formação de aldeídos e cetonas, que conferem odores e sabores indesejáveis. Além disso, a oxidação lipídica pode reduzir o valor nutricional, causando a degradação de AG essenciais, das vitaminas solúveis A, D, E e K, bem como a diminuição do teor energético (TAO, 2015).

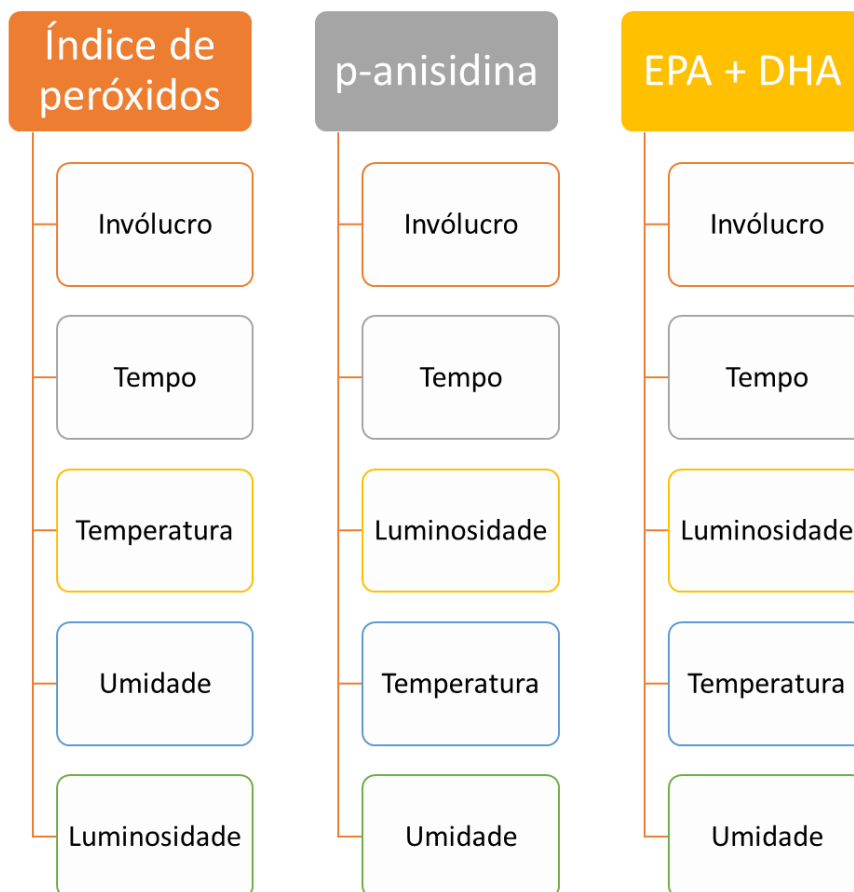
Desse modo, foram elencadas algumas variáveis que influenciam no processo de oxidação dos óleos de peixe para o estudo de seu impacto nessa reação. Foram elencados cinco variáveis: temperatura, tempo, luminosidade, umidade e invólucro e as análises foram realizadas de acordo com o planejamento fatorial fracionado exposto na Tabela 16 e Figura 8.

Os resultados das análises podem ser verificados na Tabela 22, para os valores do índice de peróxido para as amostras OP 47, OP 48, OP 49 e OP 51; na Tabela 23, para a p-anisidina; e na Tabela 24, para a soma de EPA e DHA. De acordo com os dados das Tabelas 22, 23 e 24, foi realizada a análise desse fatorial no *software* Statistica. Como a intenção foi verificar a influência desses fatores, não foram realizadas as etapas para gerar um modelo matemático.

Nesse caso, foram avaliados os fatores em relação ao índice de peróxido, p-anisidina e da soma de EPA e DHA, pois esses AGs tiveram mesmo comportamento. Na Figura 58, podemos observar as variáveis mais importantes

para cada análise realizada, considerando a maioria das observações de cada fator para as amostras.

Figura 58 - Variáveis que influenciam na oxidação, avaliadas pelo planejamento fatorial 2^{5-2}



Fonte: Autora.

Tabela 22 - Valores do índice de peróxido (mEg/kg O₂) nas amostras OP 47, OP 48, OP 49, e OP 51, para o estudo das variáveis que influenciam a oxidação

Ensaio	Temperatura	Tempo	Luminosidade	Umidade	Invólucro	OP 47	OP 48	OP 49	OP 51
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	5,4	14,48	11,45	9,92
2	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	11,49	29,67	47,68	14,32
3	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	4,31	19,21	10,07	9,1
4	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	171,39	211,3	207,34	165,86
5	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	9,75	33,18	41,42	16,53
6	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	4,43	12,59	9,94	8,05
7	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	87,31	221,72	217,14	94,51
8	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	7,74	11,77	13,62	39,91

Fonte: Autora.

Tabela 23 - Valores de p-anisidina nas amostras OP 47, OP 48, OP 49, e OP 51 para o estudo das variáveis que influenciam a oxidação

Ensaio	Temperatura	Tempo	Luminosidade	Umidade	Invólucro	OP 47	OP 48	OP 49	OP 51
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	13,71	12,21	12,15	20,9
2	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	23,09	16,44	20,74	17,75
3	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	24,37	15,34	16,51	13,53
4	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	145,94	193,69	158,86	82,45
5	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	9,33	17,38	19,89	17,24
6	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	16,84	12,87	16,41	26,42
7	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	50,05	85,27	109,25	62,49
8	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	14,02	13,94	10,25	19,18

Fonte: Autora.

Tabela 24 - Valores da soma do ácido eicosapentaenóico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA), em g/100g, nas amostras OP 47, OP 48, OP 49, e OP 51 para o estudo das variáveis que influenciam a oxidação

Ensaio	Temperatura	Tempo	Luminosidade	Umidade	Invólucro	OP 47	OP 48	OP 49	OP 51
1	-1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	26,81	48,7	57,22	25,9
2	1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	-1,00000	26,34	48,84	56,87	25,7
3	-1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	1,00000	27,46	49,59	58,67	26
4	1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	21,14	43,41	46,21	18,2
5	-1,00000	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	27,02	47,71	56,78	26,08
6	1,00000	-1,00000	1,00000	-1,00000	1,00000	26,95	49,66	59,3	25,94
7	-1,00000	1,00000	1,00000	-1,00000	-1,00000	24,22	45,97	53,97	24,31
8	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	27	51,2	60,09	25,35

Fonte: Autora.

No caso do índice de peróxido, o fator de mais relevância para as quatro amostras foi o invólucro. Observar-se, na Tabela 23, que os valores de peróxidos para os ensaios 2, 4, 5 e 7 (sem o invólucro) obtiveram os maiores valores para o PV.

Na análise da contribuição de cada fator, para o índice de peróxido, os dois primeiros fatores é que têm as maiores contribuições (na ordem de 1,5); os demais fatores têm contribuições similares (em torno de 0,05), e, portanto, não tem muita influência na oxidação, que é avaliada pelo índice de peróxido; exceção para a amostra OP 51, que possui antioxidante, e os fatores umidade e temperatura têm contribuições em cerca de 0,70 e a luminosidade em torno de 0,3.

O uso de antioxidante previne a oxidação em óleos de peixe; desse modo, os fatores podem ficar mais evidentes, pois é como se a oxidação ocorresse mais devagar e os processos intermediários pudessem ser mais bem avaliados (TAO, 2015). Para a p-anisidina, para as quatro amostras, as contribuições são maiores para as duas primeiras variáveis, ou seja, o invólucro e o tempo, as demais não tem influência representativa, de acordo com o modelo avaliado.

Nas amostras de óleo de peixe estudados, foi citado, na rotulagem, o uso de gelatina, como material encapsulante. Pacheco e RegitanoD'Arce (2009), observaram que diferentes invólucros podem afetar a oxidação dos AGs em óleo de peixe; em sua pesquisa, utilizaram diferentes tipos de invólucros e, ao analisarem o índice de peróxido, a embalagem que menos protegeu o óleo foi o blíster com filme de policloreto de vinila (PVC); os blísters de policlorotrifluoretileno (PCTFE), e os de cloreto de polivinilideno (PVDC) apresentaram proteção semelhante, maior do que os de PVC, contudo, inferiores às embalagens rígidas.

As embalagens que mais protegeram o óleo de peixe encapsulado da oxidação foram os frascos de polietileno de alta densidade, com e sem sachê de sílica. Observou-se que as embalagens rígidas foram mais eficientes, ao impedirem a troca de gases com o ambiente, reduzindo a exposição do óleo ao oxigênio (PACHECO; REGITANOD'ARCE, 2009). Linke; Weiss e Kohlus (2020), verificaram, em seus estudos, que o óleo de peixe não encapsulado oxidou, em média, 7,4 vezes mais rápido do que os encapsulados. Em outro estudo, Linke; Linke e Kohlus (2020) verificaram que o oxigênio interno na embalagem tem

pouco impacto na oxidação, se comparado ao oxigênio externo, uma vez que é o principal fator determinante da autooxidação; além de oxidar o óleo não encapsulado, o oxigênio externo penetra na partícula e reage com o óleo encapsulado, desencadeando o processo de oxidação.

Desse modo, os trabalhos de Linke; Linke e Kohlus (2020) e Linke; Linke e Kohlus (2020), demonstram que fatores principais na oxidação dos AGs são o invólucro e o tempo (maior contato com o oxigênio) de exposição a esses fatores, como observado em nosso estudo.

Para a soma de EPA e DHA, o fator do invólucro teve a maior contribuição (1,6), seguido do tempo (0,9), e os fatores temperatura, luminosidade e umidade tiveram contribuições em torno de 0,6. De acordo com Sullivan; Budge e St-Onge (2011), as taxas de oxidação podem ser monitoradas através da degradação de AGs específicos; entretanto, para o óleo de peixe, que possui um perfil complexo de AGs, essa aplicação não é muito precisa, devido a alterações muitas vezes imperceptíveis, no perfil de AGs.

Portanto, como observado ao avaliar a oxidação pela soma de EPA e DHA, há diversas reações de oxidações envolvidas, e cada uma delas mediadas por fatores, dificultando a avaliação dos fatores isoladamente, podendo ser essa uma explicação para as contribuições dos fatores estudados, que influenciam a oxidação, terem ordem de grandeza similares. A auto-oxidação do EPA, pode formar 8 hidroperóxidos, e a de DHA, 10; ou seja, a oxidação de EPA e DHA gera uma mistura altamente complexa de substâncias (MOZURAITYTE *et al.*, 2016).

Portanto, manter uma concentração de oxigênio baixa é extremamente importante para a estabilidade dos óleos de peixe. Como a luz promove a oxidação, o óleo de peixe também deve ser protegido da luz UV. O encapsulamento dos óleos marinhos com gelatina, como observado nas amostras comerciais utilizadas neste estudo, ajuda a controlar a estabilidade oxidativa do óleo, protegendo-o contra o ambiente físico, incluindo o oxigênio, a luz e a umidade.

Contudo, as propriedades físicas do material de encapsulação têm uma importante influência sobre a qualidade oxidativa e estabilidade do óleo. Uma película de gelatina que reveste o óleo funciona como barreira contra o oxigênio e a luz. Mas o uso do glicerol, como um aditivo, pode alterar a permeabilidade

do oxigênio; sabe-se que a adição de até 20% de glicerol diminui essa permeabilidade, mas ultrapassar esse valor pode também aumentar essa permeabilidade. As embalagens utilizadas para o armazenamento dos óleos de peixe são também importantes, por isso, são preferíveis os recipientes herméticos que protegem do oxigênio e da luz (KIM *et al.*, 2007; MOZURAITYTE *et al.*, 2016).

5 CONCLUSÃO

Diante dos temas abordados durante o estudo das características químicas dos óleos de peixe comercializados no Estado de São Paulo, verificou-se que o método otimizado para a análise de ácidos graxos em óleos de peixe foi preciso e exato, além de reduzir o uso de solventes orgânicos. O método ainda se mostrou apropriado para a análise de isômeros *trans* dos ácidos graxos EPA e DHA.

Sugere-se a seguinte padronização, para a análise de ácidos graxos: (1) para determinação dos valores apresentados na informação nutricional (gorduras saturadas, *trans* e monoinsaturados); o uso do padrão interno do C13:0; e fatores de correção teóricos do detector de ionização em chama em relação ao C16:0; (2) para a quantificação dos ácidos poli-insaturados, EPA e DHA, o uso do padrão interno do C23:0 e fatores de correção experimental em relação ao próprio padrão interno.

A maioria das amostras apresentou valores acima dos limites preconizados pelo Codex Alimentarius, para os parâmetros de oxidação, e 90% em desacordo para o índice de peróxido; 24% para p-anisidina; e 73% para ToTox. Quanto aos valores de ácidos graxos declarados na informação nutricional dos rótulos, 75% das amostras estava acima da tolerância admitida para os ácidos graxos saturados; 73% para os monoinsaturados; 73%, para os poli-insaturados; 75%, para o ácido EPA e 84% para o DHA.

Os ácidos graxos saturados com maiores quantidades nos óleos de peixe foram o C16 e C18; os monoinsaturados C16:1 e C18:1; além dos poli-insaturados C20:5, C22:6, C22:5. A partir do perfil dos ácidos graxos e dos dados do Codex Alimentarius dos ácidos graxos para diferentes espécies de peixe, foram separadas as amostras de óleo de peixe em dois grupos, caracterizados pelas espécies arenque (82%) e atum.

Os fatores que mais influenciaram a oxidação dos ácidos graxos foram o invólucro e o tempo de exposição ao oxigênio. Em suma, os óleos de peixe demonstraram, em sua maioria, estar oxidados e com valores menores do que os declarados, para os ácidos graxos ômega 3; desse modo, o monitoramento desses suplementos deve ser constante, devido ao seu alto consumo pela população, relacionado aos seus inúmeros benefícios.

Os isômeros gerados pela ação do tratamento térmico foram identificados, por meio da ressonância magnética nuclear, como *trans* do ácido EPA e DHA. Trabalhos futuros para quantificar esses isômeros nos óleos de peixe são relevantes e muito importantes, pois não há muitos dados, nem conhecimentos sólidos da ação desses *trans* no organismo.

6 REFERÊNCIAS¹

ABDELHAMID, A. S. *et al.* Ômega-3 fatty acids for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 11, n. 3, 2020.

ACKMAN, R. G.; RATNAYAKE, W. M. N.; MACPHERSON, E. J. EPA and DHA contents of encapsulated fish oil products. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 66, n. 8, p. 1.162-1.164, 1989.

AGOSTONI, C. *et al.* The role of ômega-3 fatty acids in developmental psychopathology: A systematic review on early psychosis, autism, and ADHD. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2.608, 2017.

ALBERT, B. B. *et al.* Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and do not meet label content of n-3 PUFA. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 1-7, 2015.

ALBERT, B. B. *et al.* Oxidation of marine ômega-3 supplements and human health. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

ALFANO, C. M. *et al.* Fatigue, inflammation, and ω -3 and ω -6 fatty acid intake among breast cancer survivors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 12, p. 1.280, 2012.

ANNAMALAI, J.; DUSHYANT C. K.; GUDIPATI, V. Oxidative stability of microencapsulated fish oil during refrigerated storage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 1.944-1.955, 2015.

ARMENTA, R. E. *et al.* Optimization of fatty acid determination in selected fish and microalgal oils. **Chromatographia**, v. 70, n. 3, p. 629-636, 2009.

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, NBR 6023).

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS PARA FINS ESPECIAIS E CONGÊNERES (ABIAD). Disponível em: <https://abiad.org.br/>. Acesso em: 10 out. 2022.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC Internacional**. Rockville: AOAC Internacional, ed. 21., 2019.

AURSAND, M.; STANDAL, I. B.; AXELSON, D. E. High-resolution ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy pattern recognition of fish oil capsules. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 1, p. 38-47, 2007.

BADOLATO, E. S.G. *et al.* Determinação dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) em óleo de sardinha (*Sardinella brasiliensis*) brasileira e em suplementos alimentares à base de óleo de sardinha. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 51, n. 1-2, p. 75-81, 1991.

BAE, J.; KIM, G. Systematic review and meta-analysis of ômega-3-fatty acids in elderly patients with depression. **Nutrition Research**, v. 50, p. 1-9, 2018.

BAKO, T.; VICTOR, U. I.; AWULU, O. J. Criteria for the extraction of fish oil. **Agricultural Engineering International: CIGR Journal**, v. 19, n. 3, p. 120-132, 2017.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; NIELSEN, A. B. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. **The Lancet**, v. 297, n. 7.710, p. 1.143-1.146, 1971.

BANG, H. O.; DYERBERG, J.; SINCLAIR, H. M.. The composition of the Eskimo food in north western Greenland. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 33, n. 12, p. 2.657-2661, 1980.

BANNENBERG, G. *et al.* Ômega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid content and oxidation state of fish oil supplements in New Zealand. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

BAYS, H. E. Safety considerations with ômega-3 fatty acid therapy. **The American journal of cardiology**, v. 99, n. 6, p. S35-S43, 2007.

BELLA, G. *et al.* Variations in fatty acid composition of Mediterranean anchovies (*Engraulis encrasicolus*) after different cooking methods. **European Food Research and Technology**, p. 1-6, 2022.

BHATT, D. L. *et al.* Reduce-IT USA: Results from the 3146 patients randomized in the United States. **Circulation**, v. 141, n. 5, p. 367-375, 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 318, de 6 de novembro de 2019. Estabelece os critérios para a realização de estudos de estabilidade de insumos farmacêuticos ativos e medicamentos, exceto biológicos, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, Brasília, DF, 7 nov. 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Estabelece regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, Brasília, DF, 26 dez. 2003.

BRASILa. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 429, de 8 de outubro de 2020. Dispõe sobre a rotulagem nutricional dos alimentos embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, Brasília, DF, 9 out. 2020.

BRASILb. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Instrução Normativa nº 75, de 8 de outubro de 2020. Estabelece os requisitos técnicos para declaração da rotulagem nutricional nos alimentos embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, seção 1, Brasília, DF, 9 out. 2020.

BROTAS, M. S. C.; CARVALHO, G. A.; PEREIRA, P. A. P. Determination, through derivatization and GC-MS analysis, of ômega-3 and ômega-6 fatty acids in fish oil capsules sold in Salvador, Bahia. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, p. 447-455, 2020.

BRUICE, P. Y. **Química orgânica** – v. 1. 4. ed. São Paulo: Pearson, 2006, 704 p. ISBN 978-85-760-5004-9.

CALDER, P. C. Very long-chain n-3 fatty acids and human health: Fact, fiction and the future. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 77, n. 1, p. 52-72, 2018.

CALDER, P. New evidence that ômega-3 fatty acids have a role in primary prevention of coronary heart disease. **Journal of Public Health and Emergency**, v. 1, n. 35, 2017.

CIRIMINNA, R. *et al.* Enhancing and improving the extraction of ômega-3 from fish oil. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 5, p. 54-59, 2017.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. **Standard for fish oils** – Codex Stan 329-2017. New York: Standard of Codex Alimentarius Comission, 2016. 6 p.

CONSELHO OLEÍCOLA INTERNACIONAL (COI). **Relatório COI CHEM/2021** – Parâmetros físico-químicos COI 2021. Gabinete de Servicios para la Qualidade. 2021.

DAMERAU, A. *et al.* Evaluation of the composition and oxidative status of ômega-3 fatty acid supplements on the finnish market using NMR and SPME-GC–MS in comparison with conventional methods. **Food Chemistry**, v. 330, p. 127-194, 2020.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de alimentos de Fennema**. 5. ed. Tradução: Adriano Brandelli. São Paulo: Artmed, 2018. 1120 p. ISBN 978-85-827-1545-1.

DAVE, D.; ROUTRAY, W. Current scenario of canadian fishery and corresponding underutilized species and fishery byproducts: A potential source of ômega-3 fatty acids. **Journal of Cleaner Production**, v. 180, p. 617-641, 2018.

DE OLIVEIRA, M. R. *et al.* Ômega-3 polyunsaturated fatty acids and mitochondria, back to the future. **Trends in Food Science & Technology**, v. 67, p. 76-92, 2017.

DEEPIKA, D. *et al.* Investigation on oil extraction methods and its influence on ω -3 content from cultured salmon. **Journal of Food Processing and Technology**, v. 5, n. 12, p. 1-13, 2014.

DJURICIC, I.; CALDER, P. C. Beneficial outcomes of ω -6 and ω -3 polyunsaturated fatty acids on human health: An update for 2021. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2.421, 2021.

DOAEI, S. *et al.* The effect of ω -3 fatty acid supplementation on clinical and biochemical parameters of critically ill patients with Covid-19: A randomized clinical trial. **Journal of Translational Medicine**, v. 19, n. 1, p. 1-9, 2021.

DUMAN, E.; ÖZCAN, M. M. The influence of industrial refining stages on the physico-chemical properties, fatty acid composition and sterol contents in hazelnut oil. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 7, p. 2.501-2.506, 2020.

DYERBERG, J.; BANG, H. O. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. **The Lancet**, v. 314, n. 8.140, p. 433-435, 1979.

EFSA PANEL ON DIETETIC PRODUCTS, NUTRITION AND ALLERGIES (NDA). Scientific opinion on the tolerable upper intake level of eicosapentaenoic acid (EPA), docosahexaenoic acid (DHA) and docosapentaenoic acid (DPA). **EFSA Journal**, v. 10, n. 7, p. 2.815, 2012.

EGGERSDORFER, M. *et al.* Perspective: Role of Micronutrients and Omega-3 Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids for Immune Outcomes of Relevance to Infections in Older Adults—A Narrative Review and Call for Action. **Advances in Nutrition**, v. 13, n. 5, p. 1415-1430, 2022.

ESQUERDO, V. M. *et al.* Nanoemulsions from unsaturated fatty acids concentrates of carp oil using chitosan, gelatin, and their blends as wall materials. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 120, n. 2, p. 1700240, 2018.

EUROPEAN PHARMACOPEIA. **2.4.29 - Composition of fatty acids in oils rich in ômega-3 acids**. Strasbourg: Council fo Europe, 2008. 130p.

FANG, Y. *et al.* Deodorisation of fish oil by nanofiltration membrane process: focus on volatile flavour compounds and fatty acids composition. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, n. 3, p. 692-699, 2018.

FANTONI, C. M.; CUCCIO, A. P.; BARRERA-ARELLANO, D. Brazilian encapsulated fish oils: Oxidative stability and fatty acid composition. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 73, n. 2, p. 251-253, 1996.

FAO. Food and Agriculture Organization. **Fats and fatty acids in human nutrition**. Report of an expert consultation, 10-14 nov. 2008, Geneva, 2010.

FIERENS, C.; CORTHOUT, J. Ômega-3 fatty acid preparations - a comparative study. **Journal de Pharmacie de Belgique**, v. 62, n. 4, p. 115-119, 2007.

FINCO, A. M. O. *et al.* Technological trends and market perspectives for production of microbial oils rich in ômega-3. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 656-671, 2017.

FIROUZABADI, F. D.; SHAB-BIDAR, S.; JAYEDI, A. The effects of ômega-3 polyunsaturated fatty acids supplementation in pregnancy, lactation, and infancy: an umbrella review of meta-analyses of randomized trials. **Pharmacological Research**, p. 106100, 2022.

FOURNIER, V. *et al.* Analysis of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization. **Journal of Chromatography A**, v. 1.129, n. 1, p. 21-28, 2006.

FOURNIER, V. *et al.* Quantification of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization by gas-liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1.154, n. 1-2, p. 353-359, 2007.

GALUCH, M. B. *et al.* Quality assessment of ômega-3 supplements available in the Brazilian market. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, p. 631-638, 2018.

GANESAN, B.; BROTHERSEN, C.; MCMAHON, D. J. Fortification of foods with ômega-3 polyunsaturated fatty acids. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 1, p. 98-114, 2014.

GAO, L. *et al.* ¹³C NMR as a primary method for determining saturates, cis-and trans-monounsaturates and polyunsaturates in fats and oils for nutritional labeling purposes. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 111, n. 6, p. 612-622, 2009.

GOUVÊA, H. R. *et al.* Fatty acid content, oxidation markers and mercury in fish oil supplements commercialized in Brasília, Brazil. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v. 11, n. 3, p. 168-177, 2019.

GROSSO, G. *et al.* Ômega-3 fatty acids and depression: Scientific evidence and biological mechanisms. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

GUILLÉN, M. D. *et al.* Characterization of cod liver oil by spectroscopic techniques. New approaches for the determination of compositional parameters, acyl groups, and cholesterol from ¹H nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectral data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9.072-9.079, 2008.

HALVORSEN, B. L.; BLOMHOFF, R. Determination of lipid oxidation products in vegetable oils and marine ômega-3 supplements. **Food & Nutrition Research**, v. 55, n. 1, p. 5.792, 2011.

HAMILTON, K. *et al.* Evaluation of the composition of ômega-3 fatty acids in dietary oil supplements. **Nutrition & Dietetics**, v. 67, n. 3, p. 182-189, 2010.

HARRIS, W. S. Expert opinion: Ômega-3 fatty acids and bleeding - Cause for concern? **The American Journal of Cardiology**, v. 99, n. 6, p. S44-S46, 2007.

HARRIS, W. S. Ômega-3 fatty acids. *In: Encyclopedia of dietary supplements*, CRC Press, 2004, p. 493-504.

HARRIS, W. S.; DEL GOBBO, L.; TINTLE, N. L. The Ômega-3 Index and relative risk for coronary heart disease mortality: Estimation from 10 cohort studies. **Atherosclerosis**, v. 262, p. 51-54, 2017.

HARRIS, W. S.; VON SCHACKY, C. The Ômega-3 Index: A new risk factor for death from coronary heart disease? **Preventive Medicine**, v. 39, n. 1, p. 212-220, 2004.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HATHAWAY III, D. *et al.* Ômega 3 fatty acids and Covid-19: A comprehensive review. **Infection & Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 478, 2020.

HELLER, M. *et al.* Oxidation of fish oil supplements in Australia. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 70, n. 5, p. 540-550, 2019.

HERNANDEZ, E. M. Issues in fortification and analysis of ômega-3 fatty acids in foods. **Lipid Technology**, v. 26, n. 5, p. 103-106, 2014.

HOLLER; SKOOG; CROUCH. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1.056p. ISBN 978-85-778-0460-3.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Marine ômega-3 (N-3) fatty acids for cardiovascular health: An update for 2020. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 4, p. 1.362, 2020.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de Alimentos**. 4. ed., Brasília: Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. 1.018 p.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008** - Guia de orientação para validação de métodos analíticos - versão 09. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade de Tecnologia, 2020.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Standard method 2.301, preparation of fatty acid methyl ester**. Oxford: Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives, 1987.

IRVING, C. B.; MUMBY-CROFT, R.; JOY, L. A. Polyunsaturated fatty acid supplementation for schizophrenia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 3, 2006.

ISMAIL, A. *et al.* Oxidation in EPA-and DHA-rich oils: An overview. **Lipid Technology**, v. 28, n. 3-4, p. 55-59, 2016.

ISO 27107: 2008. **Animal and vegetable fats and oils** - Determination of peroxide value - Potentiometric end-point determination. Geneva: International Organization of Standardization, 2008.

ISO 660: 2020. **Animal and vegetable fats and oils** - Determination of acid value and acidity. Geneva: International Organization of Standardization, 2020.

IZAR, M. C. O. *et al.* Position statement on fat consumption and cardiovascular health – 2021. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 116, p. 160-212, 2021.

JACKOWSKI, S. A. *et al.* Oxidation levels of North American over-the-counter n-3 (omega-3) supplements and the influence of supplement formulation and delivery form on evaluating oxidative safety. **Journal of Nutritional Science**, v. 4, 2015.

JAIROUN, A. A.; SHAHWAN, M.; ZYOUD, S. H. Fish oil supplements, oxidative status, and compliance behaviour: Regulatory challenges and opportunities. **PLoS One**, v. 15, n. 12, p. e0244688, 2020.

JIA, W. *et al.* Comparison of six methylation methods for fatty acid determination in yak bone using gas chromatography. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 11, p. 3.496-3.507, 2017.

KARSLI, B. Comparative analysis of the fatty acid composition of commercially available fish oil supplements in Turkey: Public health risks and benefits. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 103, p. 104-105, 2021.

KAUSHIK, P. *et al.* Microencapsulation of ômega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 868-881, 2015.

KAZUO, M. Prevention of fish oil oxidation. **Journal of Oleo Science**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2019.

KIM, Y. T. *et al.* New approach for characterization of gelatin biopolymer films using proton behavior determined by low field ¹H NMR spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10.678-10.684, 2007.

KLEINER, A. C.; CLADIS, D. P.; SANTERRE, C. R. A comparison of actual versus stated label amounts of EPA and DHA in commercial ômega-3 dietary supplements in the United States. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 6, p. 1.260-1.267, 2015.

KNAPP, H. R. Dietary fatty acids in human thrombosis and hemostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n. 5, p. 1.687S-1.698S, 1997.

KOLANOWSKI, W. Ômega-3 LC PUFA contents and oxidative stability of encapsulated fish oil dietary supplements. **International Journal of Food Properties**, v. 13, n. 3, p. 498-511, 2010.

KOTANI, A. *et al.* A Portable voltammetric sensor for determining titratable acidity in foods and beverages. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 167, n. 3, p. 037517, 2019.

KRIS-ETHERTON, P. M. *et al.* Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **The American Journal of Medicine**, v. 113, n. 9, p. 71-88, 2002.

KUS, M. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; MANCINI-FILHO, J. Comparação de métodos analíticos para determinação de lipídios e ácidos graxos polinsaturados por cromatografia gasosa em fórmula infantil. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 68, n. 1, p. 12-20, 2009.

KUS-YAMASHITA, M. M. M. *et al.* Polyunsaturated fatty acids: Health impacts. **European Journal of Nutrition & Food Safety**, v. 6, n. 3, p. 111-131, 2016.

KUS-YAMASHITA, M. M. M.; MANCINI FILHO, J. Considerações sobre a participação dos ácidos graxos poli-insaturado ômega 3 na epidemia por Covid 19 Considerations on the role of ômega-3 polyunsaturated fatty acids in the Covid 19 epidemic. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 5, n. 3, p. 8.655-8.673, 2022.

KUS-YAMASHITA, M. M. M.; MANCINI-FILHO, J. Ácidos graxos. *In*: SÉRIE DE PUBLICAÇÕES ILSI BRASIL. **Funções plenamente reconhecidas de nutrientes**. 2017, p. 40

LALINDE, J. D. H. *et al.* Sobre el uso adecuado del coeficiente de correlación de Pearson: definición, propiedades y suposiciones. **Archivos venezolanos de Farmacología y Terapéutica**, v. 37, n. 5, p. 587-595, 2018.

LAVIANO, A. *et al.* Omega-3 fatty acids in cancer. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v. 16, n. 2, p. 156-161, 2013.

LEE, H. *et al.* Analysis of headspace volatile and oxidized volatile compounds in DHA-enriched fish oil on accelerated oxidative storage. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 7, p. 2.169-2.177, 2003.

LEE, J. *et al.* Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB s), heavy metals and ômega-3 fatty acids in commercially available Korean functional fish oil supplements. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 51, n. 10, p. 2.217-2.224, 2016.

LEE, J. H. *et al.* Ômega-3 fatty acids: Cardiovascular benefits, sources and sustainability. **Nature Reviews Cardiology**, v. 6, n. 12, p. 753-758, 2009.

LEMBKE, P.; SCHUBERT, A. Introduction to Fish Oil Oxidation, Oxidation Prevention, and Oxidation Correction. *In*: **Ômega-3 Fatty Acids in Brain and Neurological Health**. Academic Press, 2014, p. 455-460.

LEONARDIS, A.; MACCIOLA, V. A study on the lipid fraction of Adriatic sardine filets (*Sardina pilchardus*). **Food/Nahrung**, v. 48, n. 3, p. 209-212, 2004.

LIAO, Y. *et al.* Efficacy of ômega-3 PUFAs in depression: A meta-analysis. **Translational Psychiatry**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 2019.

LIMA, A. C. P. Caraterização nutricional e organolética de conservas de sardinha-influência da sazonalidade da captura. **Dissertação de Mestrado**.2015

LINKE, A.; LINKE, T.; KOHLUS, R. Contribution of the internal and external oxygen to the oxidation of microencapsulated fish oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 122, n. 8, p. 1900381, 2020.

LINKE, A.; WEISS, J.; KOHLUS, R. Oxidation rate of the non-encapsulated-and encapsulated oil and their contribution to the overall oxidation of microencapsulated fish oil particles. **Food Research International**, v. 127, p. 108705, 2020.

LOÏ, C. *et al.* Effects of three trans isomers of eicosapentaenoic acid on rat platelet aggregation and arachidonic acid metabolism. **Thrombosis and Haemostasis**, v. 80, n. 10, p. 656-661, 1998.

LOÏ, C. *et al.* Incorporation and metabolism of trans 20: 5 in endothelial cells. Effect on prostacyclin synthesis. **Lipids**, v. 35, n. 8, p. 911-918, 2000.

LOUCA, P. *et al.* Modest effects of dietary supplements during the Covid-19 pandemic: Insights from 445 850 users of the Covid-19 Symptom Study app. **BMJ Nutrition, Prevention & Health**, v. 4, n. 1, p. 149, 2021.

MAIA, E. L.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n. 1-2, p. 27-35, 1993.

MARTINEZ, N.; MCDONALD, B. A study into the fatty acid content of selected veterinary diets, supplements and fish oil capsules in Australia. **Veterinary Dermatology**, v. 32, n. 3, p. 256-e69, 2021.

MATA, T. M. *et al.* Fish oil enzymatic esterification for acidity reduction. **Waste and Biomass Valorization**, v. 11, n. 3, p. 1.131-1.141, 2020.

MENOUNOU, G. *et al.* Trans Lipid Library: Synthesis of docosahexaenoic acid (DHA) monotrans isomers and regioisomer identification in DHA-containing supplements. **Chemical Research in Toxicology**, v. 31, n. 3, p. 191-200, 2018.

MICHA, R. *et al.* Global, regional, and national consumption levels of dietary fats and oils in 1990 and 2010: A systematic analysis including 266 country-specific nutrition surveys. **British Medical Journal**, v. 348, 2014.

MJØS, S. A.; SOLVANG, M. Geometrical isomerisation of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid at high temperatures. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 7, p. 589-597, 2006.

MOZAFFARIAN, D.; WU, J. H. Y. Ômega-3 fatty acids and cardiovascular disease: Effects on risk factors, molecular pathways, and clinical events. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 58, n. 20, p. 2.047-2.067, 2011.

MOZURAITYTE, R. *et al.* Oxidative stability and shelf life of fish oil. *In: Oxidative stability and shelf life of foods containing oils and fats*. AOCS Press, 2016. p. 209-231.

MURPHY, R. A. *et al.* Supplementation with fish oil increases first-line chemotherapy efficacy in patients with advanced nonsmall cell lung cancer. **Cancer**, v. 117, n. 16, p. 3.774-3.780, 2011.

NEIA, V. J. C. *et al.* Fatty acid composition and lipid profile of oral/Enteral nutrition supplements available on the brazilian market. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 6, p. 1800495, 2019.

NEVIGATO, T.; MASCI, M.; CAPRONI, R. Quality of fish-oil-based dietary supplements available on the Italian market: A preliminary study. **Molecules**, v. 26, n. 16, p. 5.015, 2021.

NEVINS, J. E. H. *et al.* Ômega-3 fatty acid dietary supplements consumed during pregnancy and lactation and child neurodevelopment: A systematic review. **The Journal of nutrition**, v. 151, n. 11, p. 3.483-3.494, 2021.

NICHOLS, P. D.; DOGAN, L.; SINCLAIR, A. Australian and New Zealand fish oil products in 2016 meet label ômega-3 claims and are not oxidized. **Nutrients**, v. 8, n. 11, p. 703, 2016

O'KEEFE, S. F. *et al.* Trans n-3 eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid isomers exhibit different inhibitory effects on arachidonic acid metabolism in human platelets compared to the respective cis fatty acids. **Journal of Lipid Research**, v. 31, n. 7, p. 1.241-1.246, 1990.

OLIVEIRA, D. A. S. B. *et al.* Physicochemical and sensory characterization of refined and deodorized tuna (*Thunnus albacares*) by-product oil obtained by enzymatic hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 207, p. 187-194, 2016.

OPPEDISANO, F. *et al.* The anti-inflammatory and antioxidant properties of n-3 PUFAs: Their role in cardiovascular protection. **Biomedicines**, v. 8, n. 9, p. 306, 2020.

OPPERMAN, M.; BENADE, A. J. S.; MARAIS, D. W. Analysis of ômega-3 fatty acid content of South African fish oil supplements: cardiovascular topics. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 22, n. 6, p. 324-329, 2011.

OPPERMAN, M.; BENADE, S. Analysis of the ômega-3 fatty acid content of South African fish oil supplements: A follow-up study: Cardiovascular topics. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 24, n. 8, p. 297-302, 2013.

ORSSO, C. E. *et al.* Mapping ongoing nutrition intervention trials in muscle, sarcopenia, and cachexia: a scoping review of future research. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 13, n. 3, p. 1442-1459, 2022.

OSADNIK, K.; JAWORSKA, J. Analysis of ω -3 fatty acid content of polish fish oil drug and dietary supplements. **Acta Poloniae Pharmaceutica Drug Research**, v. 73, p. 875-883, 2016.

ÖZCAN, M. M.; DUMAN, E.; DUMAN, S. Influence of refining stages on the physicochemical properties and phytochemicals of canola oil. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 45, n. 2, p. e15.164, 2021.

ÖZYURT, G. *et al.* Assessment of the safety of dietary fish oil supplements in terms of content and quality. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 17, p. 25.006-25.019, 2022.

ÖZYURT, G. *et al.* Fatty acid composition and oxidative stability of fish oil products in Turkish retail market. **Journal of Aquatic Food Product Technology**, v. 22, n. 3, p. 322-329, 2013.

PACHECO, S. G. A.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. Encapsulated fish oil oxidative stability stored in different types of packing under ambient conditions. **Food Science and Technology**, v. 29, p. 927-932, 2009.

PATEIRO, M. *et al.* $\hat{\Omega}$ mega-3-rich oils from marine side streams and their potential application in food. **Marine Drugs**, v. 19, n. 5, p. 233, 2021.

PFEFFER, P. E. *et al.* Analytical ^{13}C NMR: A rapid, nondestructive method for determining the cis, trans composition of catalytically treated unsaturated lipid mixtures. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 54, n. 9, p. 380-386, 1977.

POLAVARAPU, S. *et al.* Physicochemical characterisation and oxidative stability of fish oil and fish oil–extra virgin olive oil microencapsulated by sugar beet pectin. **Food Chemistry**, v. 127, n. 4, p. 1.694-1.705, 2011.

PRECOMA, D. B. *et al.* Updated cardiovascular prevention guideline of the Brazilian Society of Cardiology-2019. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, p. 787-891, 2019.

PUBCHEM. NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NIH). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 25 ago. 2022.

RIBEIRO, F. A. L. *et al.* Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. **Química Nova**, v. 31, p. 164-171, 2008.

RIES, A. *et al.* A systematic review on the role of fish oil for the treatment of cachexia in advanced cancer: an EPCRC cachexia guidelines project. **Palliative Medicine**, v. 26, n. 4, p. 294-304, 2012.

RIMM, E. B. *et al.* Seafood long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular disease: a science advisory from the American Heart Association. **Circulation**, v. 138, n. 1, p. e35-e47, 2018.

RITTER, J. C. S.; BUDGE, S. M.; JOVICA, F. Quality analysis of commercial fish oil preparations. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 8, p. 1.935-1.939, 2013.

RUCKLIDGE, J. J.; SHAW, I. C. Are over-the-counter fish oil supplements safe, effective and accurate with labelling? Analysis of 10 New Zealand fish oil supplements. **The New Zealand Medical Journal**, v. 133, p. 52-62, 2020.

RUCKLIDGE, Julia J.; SHAW, Ian C. Are over-the-counter fish oil supplements safe, effective and accurate with labelling? Analysis of 10 New Zealand fish oil supplements. **NZ Med J.**, v. 133, p. 52-62, 2020.

RUPP, T. P. *et al.* Replacement of reduced highly unsaturated fatty acids (HUFA deficiency) in dilative heart failure: Dosage of EPA/DHA and variability of adverse peroxides and aldehydes in dietary supplement fish oils. **Cardiology**, v. 125, n. 4, p. 223-231, 2013.

SCHAEFER, E. J. *et al.* Plasma phosphatidylcholine docosahexaenoic acid content and risk of dementia and Alzheimer disease: The framingham heart study. **Archives of neurology**, v. 63, n. 11, p. 1.545-1.550, 2006.

SCHLÖGELHOFER, M. *et al.* Polyunsaturated fatty acids in emerging psychosis: a safer alternative?. **Early intervention in psychiatry**, v. 8, n. 3, p. 199-208, 2014.

SCIOTTO, C.; MJØS, S. A. Trans isomers of EPA and DHA in ômega-3 products on the European market. **Lipids**, v. 47, n. 7, p. 659-667, 2012.

SCRIMGEOUR, C.; TRAYNOR, C. Quantifying long chain polyunsaturated fatty acids (LC-PUFA) in fish oil concentrates and algal oils– choosing the correct method. **Lipid Technology**, v. 29, n. 7-8, p. 71-73, 2017.

SCZANIECKA, A. K. *et al.* Dietary intake of specific fatty acids and breast cancer risk among postmenopausal women in the VITAL cohort. **Nutrition and Cancer**, v. 64, n. 8, p. 1.131-1.142, 2012.

SERFERT, Y.; DRUSCH, S.; SCHWARZ, K. Chemical stabilisation of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenisation, microencapsulation and storage. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1.106-1.112, 2009.

SHIM, S. M. *et al.* Ômega-3 fatty acids and total polychlorinated biphenyls in 26 dietary supplements. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 8, p. 2.436-2.440, 2003.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SILVERSTEIN, R. *et al.* **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 8. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019. 468 p. ISBN 978-85-216-3637-3.

SIMOPOULOS, A. P. An increase in the ômega-6/ômega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, v. 8, n. 3, p. 128, 2016.

SIMOPOULOS, A. P. Genetic variants in the metabolism of ômega-6 and ômega-3 fatty acids: Their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 7, p. 785-795, 2010.

SIMOPOULOS, A. P. The ω -6/ ω -3 fatty acid ratio, genetic variation, and cardiovascular disease. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, 2008.

SIOEN, I. *et al.* Systematic review on n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid intake in European countries in light of the current recommendations-Focus on specific population groups. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 70, n. 1, p. 39-50, 2017.

SISCOVICK, D. S. *et al.* ω -3 polyunsaturated fatty acid (fish oil) supplementation and the prevention of clinical cardiovascular disease: A science advisory from the American Heart Association. **Circulation**, v. 135, n. 15, p. e867-e884, 2017.

SKULAS-RAY, A. C. *et al.* ω -3 fatty acids for the management of hypertriglyceridemia: A science advisory from the American Heart Association. **Circulation**, v. 140, n. 12, p. e673-e691, 2019.

SOLOMONS, G.; FRYHLE, C.; SNYDER, S. Química Orgânica. 12. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2018, v. 1, 656 p. ISBN 978-85-216-3547-5.

SONG, G. *et al.* Effect of deodorization method on the chemical and nutritional properties of fish oil during refining. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 560-567, 2018.

SRIGLEY, C. T.; RADER, J. I. Content and composition of fatty acids in marine oil ω -3 supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 29, p. 7268-7278, 2014.

STAŇKOVÁ, B. *et al.* Fatty acid composition of commercially available nutrition supplements. **Czech Journal of Food Sciences**, v. 31, n. 3, p. 241-248, 2013.

STARK, K. D. *et al.* Global survey of the ω -3 fatty acids, docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid in the blood stream of healthy adults. **Progress in Lipid Research**, v. 63, p. 132-152, 2016.

SULLIVAN, J. C.; BUDGE, S. M.; ST-ONGE, M. Modeling the primary oxidation in commercial fish oil preparations. **Lipids**, v. 46, n. 1, p. 87-93, 2011.

SYDENHAM, E.; DANGOUR, A. D.; LIM, Wee-Shiong. Ômega 3 fatty acid for the prevention of cognitive decline and dementia. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 6, 2012.

TAO, Li. Oxidation of polyunsaturated fatty acids and its impact on food quality and human health. **Advances in Food Technology and Nutritional Sciences**, v. 1, p. 135-142, 2015.

TATARCZYK, T. *et al.* Analysis of long-chain ω -3 fatty acid content in fish-oil supplements. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 119, n. 13, p. 417-422, 2007.

TATARCZYK, Tobias *et al.* Analysis of long-chain ω -3 fatty acid content in fish-oil supplements. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 119, n. 13, p. 417-422, 2007.

THE AMERICAN OIL CHEMISTS' SOCIETY (AOCS). **Official methods and recommended practices of the AOCS**. Urbana: AOCS Comittee, 7. ed., 2017.

THE FISHMEAL AND FISH OIL ORGANISATION (IFFO). **IFFO 2021 annual report**. Disponível em: <https://www.iffco.com/annual-report-2021>. Acesso em: 8 ago. 2022.

THE GLOBAL ORGANIZATION FOR EPA & DHA ÔMEGA-3S (GOED). Disponível em: <https://goedomega3.com/intake-recommendations>. Acesso em: 10 ago. 2022.

TIMILSENA, Y. P. *et al.* Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) - rich plant oils using complex coacervation: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 369-381, 2017.

TORRINHAS, R. S. *et al.* Parenteral fish oil: An adjuvant pharmacotherapy for coronavirus disease 2019?. **Nutrition**, v. 81, p. 110900, 2021.

TORSHIN, I. Y. *et al.* . **Kardiologiya**, v. 60, n. 5, p. 47-56, 2020.

TROESCH, B. *et al.* Expert opinion on benefits of long-chain omega-3 fatty acids (DHA and EPA) in aging and clinical nutrition. **Nutrients**, v. 12, n. 9, p. 2555, 2020.

VAN DER MEIJ, B. S. *et al.* n-3 PUFAs in cancer, surgery, and critical care: a systematic review on clinical effects, incorporation, and washout of oral or enteral compared with parenteral supplementation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 94, n. 5, p. 1248-1265, 2011.

VISENTAINER, J. V. Aspectos analíticos da resposta do detector de ionização em chama para ésteres de ácidos graxos em biodiesel e alimentos. **Química Nova**, v. 35, p. 274-279, 2012.

WALKER, R. E. *et al.* Predicting the effects of supplemental EPA and DHA on the omega-3 index. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 110, n. 4, p. 1.034-1.040, 2019.

WANG, H. *et al.* Oxidative stability of fish oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during long-term storage. **Food Chemistry**, v. 128, n. 1, p. 93-99, 2011.

WEED, H. G. *et al.* Lean body mass gain in patients with head and neck squamous cell cancer treated perioperatively with a protein-and energy-dense nutritional supplement containing eicosapentaenoic acid. **Head & Neck**, v. 33, n. 7, p. 1.027-1.033, 2011.

WEYLANDT, K. H. *et al.* Omega-3 polyunsaturated fatty acids: the way forward in times of mixed evidence. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

WOOD, A. H. R.; CHAPPELL, H. F.; ZULYNIK, M. A. Dietary and supplemental long-chain omega-3 fatty acids as moderators of cognitive impairment and Alzheimer's disease. **European Journal of Nutrition**, p. 1-16, 2021.

YANG, C. *et al.* Long covid and long chain fatty acids (LCFAs): Psychoneuroimmunity implication of omega-3 LCFAs in delayed consequences of covid-19. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 103, p. 19-27, 2022.

YI, T. *et al.* Comparative analysis of EPA and DHA in fish oil nutritional capsules by GC-MS. **Lipids in Health and Disease**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2014.

YILDIRIM, O.; ÇANTAŞ, İ. B. A study on the time-dependent change of totox values in feeds of marine fish. **Journal of Anatolian Environmental and Animal Sciences**, v. 5, n. 2, p. 264-269, 2020.

YU, X. *et al.* Fast and specific screening of EPA/DHA-enriched phospholipids in fish oil extracted from different species by HILIC-MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 69, n. 28, p. 7.997-8.007, 2021

ZHANG, X. *et al.* Characterization of refined fish oil from small fish in Mauritania. **Aquaculture and Fisheries**, v. 7, n. 6, p. 639-646, 2022.