

Refino de óleos de corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico de farinha

Refinement of corvine (*Micropogonias furnieri*) oil manufactured by means of acid ensilage procedure and thermo treatment processing for meal production

RIALA6/1103

Valéria T. CREXI, Fernanda L. GRUNENVALDT, Leonor A. S. SOARES, Luiz A. A. PINTO*

* Endereço para correspondência: Engenharia de Alimentos FURG. Departamento de Química - Laboratório de Operações Unitárias - Fundação Universidade Federal do Rio Grande. e-mail: dqmpinto@furg.br. Campus Cidade, Rua Engº Alfredo Huch, 475, Caixa Postal 474 - CEP: 96201-900 - Rio Grande - RS - Brasil Telefone: (0xx-53) 3233-8648
Recebido: 26/09/2006 - Aceito para publicação: 30/04/2007

RESUMO

O óleo de pescado constitui importante fonte de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA) benéficos à saúde humana. No entanto, há presença de impurezas que afetam suas características. Esse óleo pode ser obtido a partir do processo de ensilagem ácida e pelo processo termomecânico tradicional de produção de farinha. Para o consumo humano, o óleo deve passar pelo processo de refino. No presente trabalho realizou-se o refino dos óleos de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*), provenientes dos processos de ensilagem ácida e de tratamento termomecânico, e comparou-se a qualidade final dos óleos refinados. O óleo refinado por meio de ambos processos apresentou características semelhantes. A etapa de "winterização", em ambos os processos, resultou no ganho de ácidos eicosapentaenóico mais docosahexaenóico (EPA+DHA) em torno de 8,5% e redução de ácidos graxos saturados na faixa de 12,5%. Outrossim, os óleos refinados apresentaram teores de ácidos graxos insaturados na faixa de 62%, o que os tornam favoráveis como fonte de ácidos graxos poliinsaturados.

Palavras-chaves. óleo de pescado, ácidos graxos, cor Lovibond, índice de iodo, índice de saponificação, winterização.

ABSTRACT

Fish oil constitutes an important source of poly-unsaturated ω -3 fatty acids (PUFA), which are beneficial human health; however, the occurrence of impurities affects oil characteristics. The corvine oil can be obtained from the ensilage acidification process or from thermo treatment process for meal production. For human consumption, the oil should be passed through a refining process. In the present work, refinement of corvine (*Micropogonias furnieri*) residues was performed by means of acid ensilage and thermo-treatment processes; and also the characteristics of refined oils were compared. Similar characteristics were observed in products from both refinement procedures. The winterization step, in both process, resulted in an increase of EPA+DHA around 8.5%, and a reduction saturated contents in range of 12.5%. Also, the corvine oil refined from both thermo treatment and ensilage processes presented unsaturated fatty acids contents in a range of 62%, which turns to be favorable as a source of unsaturated and polyunsaturated fatty acids (PUFA).

Key words. fish oil, fatty acids, color Lovibond, iodine index, saponification index, winterization.

INTRODUÇÃO

O óleo de pescado constitui importante fonte de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFA), principalmente ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA)¹. Esses ácidos graxos são benéficos à saúde humana, pois são essenciais para o desenvolvimento e funcionalidade de certos órgãos e para algumas respostas bioquímicas e fisiológicas do organismo¹.

Nutricionalmente, o óleo possui alto conteúdo de calorías (37 MJ/kg), o qual é duas vezes maior que o valor de energia de alimentos com carboidratos. Esse óleo também fornece as vitaminas lipossolúveis A, D e E^{2,3}.

O óleo de pescado pode ser obtido a partir do processo de ensilagem ácida, através da acidificação dos resíduos de pescado^{4,5,6}, ou pela elaboração tradicional de farinha, sendo este submetido a processos hidrotérmicos e mecânicos⁷.

Entretanto, o óleo bruto apresenta impurezas e outros compostos como ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, fosfatídios, esteróides, vitaminas, hidrocarbonetos, pigmentos, carboidratos, proteínas e seus produtos de degradação e materiais coloidais, que o tornam inadequado para o consumo^{8,9}.

O processo de refino busca purificar esse óleo removendo os componentes não triacilgliceróis que afetam a estabilidade do produto de maneira adversa, conferindo ao óleo melhores características^{9,10,11}. O refino químico ou alcalino inclui as etapas de degomagem, neutralização, lavagem, clarificação e desodorização^{8,12}.

O presente trabalho teve por objetivo realizar o refino dos óleos de pescado da espécie corvina (*Micropogonias furnieri*) provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico, e comparar as características de identidade dos óleos refinados obtidos.

MATERIAL E MÉTODOS

Matéria-prima

Para obtenção e caracterização dos óleos refinados provenientes dos processos termomecânico e de ensilagem ácida, utilizou-se os óleos brutos de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*) do processamento de farinha de uma indústria local, e do processo da silagem ácida realizado em laboratório.

Metodologia experimental para a ensilagem

Realizou-se o processo de ensilagem para obtenção do óleo, conforme a metodologia apresentada por Benites¹³.

Para a elaboração da silagem ácida foram utilizados 100kg de resíduos de corvina (*Micropogonias furnieri*), que foram moídos em moedor elétrico, acondicionados em baldes, em seguida acidificados com ácido acético glacial (10% p/v) acrescentando-se antioxidante butil hidroxitolueno, BHT, (250mg/kg). Após o período de 15 dias foi realizada a separação

dos resíduos da silagem, em peneira 14 tyler, para retirada de espinhas e escamas e posterior centrifugação.

Elevou-se a temperatura da silagem a 50°C em banho termostático, depois centrifugou-se este material em centrífuga modelo Sigma 6-15, com rotação de 7000g durante 20 min, obtendo-se a fração sólida da silagem, a parte líquida (ácido acético e água) e o óleo bruto de pescado.

Metodologia experimental para o refino

As etapas do processo de refino para os óleos brutos provenientes dos processos de ensilagem ácida e termomecânico foram realizadas de acordo com a metodologia apresentada por Moraes et al.⁸ e a winterização foi realizada através da metodologia descrita por Cunha et al.¹¹. A etapa de desodorização foi realizada em condições estabelecidas em testes preliminares. A Figura 1 apresenta o diagrama de blocos das etapas do processo de refino realizado.

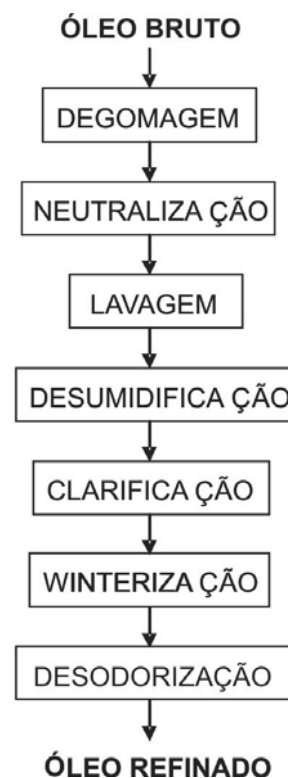


Figura 1. Etapas do processo de refino do óleo bruto de pescado.

No processo de refino, a etapa de degomagem foi realizada durante 30 min, a uma temperatura de 80°C e agitação de 500rpm, com adição de 1,0% de ácido fosfórico (85%) em relação à massa do óleo. A etapa de neutralização ocorreu durante 20min, com uma temperatura de 40°C e agitação de 500rpm, com adição de solução de hidróxido de sódio 20% p/p (utilizando 4,0% de excesso em relação ao índice de acidez determinado após a etapa da degomagem). Após cada etapa, o material foi centrifugado por 20min a 7000g, para a separação do óleo⁸.

Na etapa de lavagem, ocorreu a adição de 10% de água em relação à massa de óleo a 95°C durante um tempo de contato de 10min, com agitação de 500rpm e temperatura do óleo mantida a 50°C. Essa etapa foi repetida três vezes. A etapa de desumidificação teve a duração de 20min com uma temperatura de 90 a 95°C e agitação de 500rpm. A etapa de clarificação foi realizada à temperatura de 70°C, agitação de 40 rpm, com adição de 5% de adsorvente (mistura de terra ativada e carvão ativado na relação de 9:1), sendo o tempo de contato de 20min. A filtração foi realizada em funil de Buchner com uma pré-capa de terra diatomácea. Todas as etapas do processo de refino foram realizadas com pressão manométrica de vácuo de aproximadamente 600mmHg⁸.

A etapa de winterização foi realizada em três estágios. No primeiro estágio de nucleação, o processo ocorreu em estufa incubadora de 30°C até 5°C, com taxa de resfriamento de 0,62°C/min. e agitação vigorosa. O segundo e terceiro estágios, de cristalização, foram realizados em banho termostatizado com mistura de água e álcool, sem agitação, de 5°C até -4°C com taxa de resfriamento de 2,7°C/h e de -4°C a -5°C com taxa de resfriamento de 0,25°C/h. A cristalização deve ser conduzida sob resfriamento lento para fornecer cristais grandes e de formas polimórficas estáveis. Cristais pequenos, formados a partir de resfriamento rápido, com diâmetros entre 50-100 µm podem não ser facilmente filtrados. A separação das frações oleína e estearina foi realizada por centrifugação¹⁴.

A operação de desodorização foi realizada com temperatura de 220°C, pressão manométrica de vácuo de 750mmHg com 5% de vapor em relação à massa de óleo, durante 60 minutos.

Metodologia analítica

Para a caracterização dos óleos brutos e dos óleos refinados provenientes dos processos de ensilagem e termomecânico foram determinados os seguintes parâmetros: Ácidos Graxos Livres (AGL), Índice de Peróxidos (IP), Índice de Iodo (II), Índice de Saponificação (IS), empregando as metodologias da American Oil Chemists Society, AOCS^{15,16}. Além destes parâmetros, foi determinada a cor dos óleos brutos e refinados, segundo o método Lovibond⁷, fixando-se a cor amarelo em 30 unidades, e variando-se a cor vermelho.

Para a identificação e quantificação dos ácidos graxos, realizou-se a análise cromatográfica dos óleos refinados dos processamentos termomecânico e da ensilagem. Essa análise foi realizada em cromatógrafo gasoso capilar modelo CGC AGILEN 6850 séries GC SYSTEM equipado com coluna capilar DB - 23 AGILENT (50% cyanopropyl) methylpolysiloxane. A coluna apresentava 60m de comprimento e 0,25mm de diâmetro interno com um filme de 0,25µm de espessura. O gás de

arraste foi hélio com fluxo de 1,00mL/min e velocidade linear de 24cm/seg. A temperatura inicial da coluna foi de 110°C, permanecendo nesta temperatura por 5 minutos. A seguir foram realizadas duas programações de temperatura: aumento a 5°C/min até 215°C e 215°C durante 24 minutos, totalizando 50 minutos. A quantidade de amostra injetada foi de 1,0µL; razão split: 1:50. Os ácidos graxos foram identificados pela comparação direta dos tempos de retenção com padrões Mostarda e Votag, e quantificados por normalização de áreas. O preparo das amostras, para injeção no equipamento, na forma de ésteres metílicos, seguiu a metodologia Ce-1-62 da AOCS¹⁶, o método empregado detecta de C6:0 a C22:6.

Metodologia Estatística

Os valores dos índices de caracterização para os óleos estudados, bem como o percentual dos ácidos graxos EPA+DHA e o percentual do somatório dos ácidos graxos saturados nos óleos refinados, obtidos pelos dois processos, foram comparados usando o teste de Tukey HSD de diferenças de médias¹⁷, considerando um nível de 0,05 de significância, com auxílio do programa Statistica 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização dos óleos refinados de pescado

A Tabela 1 apresenta a caracterização dos óleos brutos e refinados provenientes dos processos termomecânico e de ensilagem ácida de pescado.

Observando-se a Tabela 1 verifica-se que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) nos valores de ácidos graxos livres, índice de peróxidos, índice de iodo, índice de saponificação e cor Lovibond entre os óleos analisados, comprovado por Teste de Tukey HSD de diferenças de médias¹⁷.

Os índices de peróxidos para os óleos refinados apresentados na Tabela 1, ficaram abaixo do citado por Ganga et al.¹⁸, que obtiveram para um óleo refinado de sardinha índice de peróxidos de $4,02 \pm 0,5 \text{ meqO}_2/\text{kg}$. O valor do índice de peróxidos indica a oxidação dos lipídios, sendo este muito importante por definir seu estado de deterioração, principalmente pela presença de compostos de baixo peso molecular provenientes de sua degradação.

Na Tabela 1, os valores dos índices de iodo (II) e os índices de saponificação (IS) para os óleos provenientes do processo termomecânico e ensilagem ficaram na faixa citada por Bernardini¹⁰, de 120 a 190cg I₂/g e de 160 a 190mg KOH/g respectivamente, para diferentes espécies de pescado. Estes índices estão associados, respectivamente, ao grau de insaturação do óleo e ao peso médio dos ácidos graxos esterificados ao glicerol.

Em relação aos valores da Cor Lovibond (Tabela 1), verifica-se que estes foram inferiores aos relatados por Moraes et al.⁸ para um óleo de pescado clarificado, cujos valores encontrados foram 1,2 Vermelho e 30 Amarelo.

Tabela 1. Caracterização dos óleos refinados provenientes dos processos termomecânico e ensilagem ácida de pescado.

Etapa/Índices	Óleos refinados	
	Óleo termomecânico	Óleo silagem
AGL(% ác. oléico)	0,25 ± 0,03 ^a	0,18 ± 0,01 ^a
IP (meq O ₂ /kg)	1,7 ± 0,4 ^a	1,8 ± 0,5 ^a
II (centigramas I ₂ /g)	135 ± 1 ^a	134 ± 2 ^a
IS (mg KOH/g)	186 ± 1 ^a	186 ± 13 ^a
Cor – Amarelo 30	0,2 Vermelho ^a	0,1 Vermelho ^a

^aletras iguais não apresentam diferença significativa a 95% (Teste de Tukey HSD).

AGL: ácidos graxos livres, IP: índice de peróxido, II: índice de iodo, IS: índice de saponificação, Cor: Lovibond.

Com o objetivo de comparar os óleos obtidos pelos dois processos, determinou-se a composição de ácidos graxos dos óleos brutos e refinados. As composições de ácidos graxos dos óleos estão apresentadas nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Composições em ácidos graxos dos óleos bruto e refinado de corvina provenientes do processo termomecânico.

Acido Graxo	Óleo Bruto Termomecânico (%)	Óleo Refinado Termomecânico (%)
C 14:0	3,7 ± 0,2	3,4 ± 0,3
C 15:0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C 16:0	23,3 ± 0,1	20,5 ± 0,2
C 16:1	12,6 ± 0,1	13,4 ± 0,2
C 17:0	1,5 ± 0,1	1,7 ± 0,1
C 18:0	6,6 ± 0,1	5,7 ± 0,1
C 18:1 ω-9	20,9 ± 0,3	20,9 ± 0,1
C 18:2 ω-6	3,8 ± 0,1	4,2 ± 0,2
C 18:3 ω-3	1,1 ± 0,1	1,9 ± 0,1
C 20:0	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1
C 20:1	2,4 ± 0,1	2,7 ± 0,2
C 20:4	1,8 ± 0,1	1,8 ± 0,3
C 20:5 EPA ω-3	5,2 ± 0,1	5,6 ± 0,2
C 22:0	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,1
C 22:1	1,2 ± 0,1	1,3 ± 0,1
C 22:5 ω-3	3,0 ± 0,3	3,3 ± 0,2
C 22:6 DHA ω-3	5,5 ± 0,1	6,0 ± 0,2
Σ n.i.*	5,7 ± 0,2	5,9 ± 0,3
Σ s	36,8 ± 0,9	33,1 ± 0,9
Σ ins	57,5 ± 1,4	61,1 ± 1,8

Σ n.i.* - não identificados

Σ s- somatório de ácidos graxos saturados

Σ ins – somatório de ácidos graxos insaturados

Tabela 3. Composições em ácidos graxos dos óleos bruto e refinado de corvina provenientes do processo de ensilagem.

Acido Graxo	Óleo Bruto Ensilagem (%)	Óleo Refinado Ensilagem (%)
C 14:0	3,8 ± 0,1	3,7 ± 0,1
C 15:0	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,2
C 16:0	23,2 ± 0,2	20,0 ± 0,3
C 16:1	13,8 ± 0,2	14,2 ± 0,1
C 17:0	1,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1
C 18:0	6,5 ± 0,2	5,3 ± 0,2
C 18:1 ω-9	19,8 ± 0,1	19,9 ± 0,1
C 18:2 ω-6	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,3
C 18:3 ω-3	1,7 ± 0,2	1,9 ± 0,1
C 20:0	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
C 20:1	3,0 ± 0,1	3,5 ± 0,2
C 20:4	1,7 ± 0,3	2,0 ± 0,1
C 20:5 EPA ω-3	5,2 ± 0,2	5,8 ± 0,1
C 22:0	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,1
C 22:1	1,2 ± 0,3	1,8 ± 0,2
C 22:5 ω-3	3,5 ± 0,1	3,7 ± 0,3
C 22:6 DHA ω-3	5,3 ± 0,3	5,6 ± 0,2
Σ n.i.*	4,9 ± 0,3	5,6 ± 0,1
Σ s	37,0 ± 0,9	32,4 ± 1,1
Σ ins	58,7 ± 2,0	62,0 ± 1,7

Σ n.i.* - somatório de não identificados

Σ s - somatório de ácidos graxos saturados

Σ ins - somatório de ácidos graxos insaturados

Os óleos brutos e refinados de pescado obtidos nos processos termomecânico e ensilagem apresentam como componentes majoritários, os ácidos palmítico (C 16:0), palmitoléico (C 16:1) e oléico (C 18:1), conforme apresentado nas Tabelas 2 e 3, constituindo aproximadamente 56,8% dos ácidos graxos totais do óleo obtido pelo processo termomecânico e 54,5% dos ácidos graxos totais do óleo obtido da ensilagem.

Nas Tabelas 2 e 3 constata-se que o óleo refinado de pescado obtido via processo termomecânico apresentou percentual de EPA+DHA de 11,6%. O óleo da ensilagem apresentou percentual de EPA+DHA de 11,4%. Estes dois óleos apresentaram valores abaixo do citado por Cozzolino et al.², aproximadamente 20% dos ácidos graxos totais. Porém, Duarte¹⁹ cita para um óleo obtido de resíduos de corvina, valores de 1,3% de EPA e 6,2% de DHA, totalizando 7,5%. Assim, os valores encontrados para os óleos de resíduos de corvina nos processos termomecânicos e de ensilagem, no presente trabalho, estão acima dos citados por esse autor.

Os somatórios dos teores dos ácidos graxos saturados apresentados nas Tabelas 2 e 3 foram, respectivamente, 33,1% e 32,4% para os óleos refinados dos processos termomecânico e de ensilagem. Valores superiores a estes foram citados por Duarte¹⁹, para óleo de corvina apresentando 36,9% dos ácidos graxos saturados.

Em relação ao percentual de ácidos graxos insaturados (Tabelas 2 e 3), os óleos refinados de ambos processos apresentaram valores de ácido oléico e de ácido linoléico superiores aos citados por Duarte¹⁹, que obteve para o óleo de resíduos de corvina percentuais destes ácidos de 17,8% e 3,5%, respectivamente. Em relação ao ácido linolênico (C 18:3), os óleos refinados apresentaram valores semelhantes ao citado pelo autor.

Nas Tabelas 2 e 3 constata-se que os ácidos graxos insaturados presentes nos óleos refinados termomecânico e da ensilagem perfizeram 61,1% e 62% do total dos ácidos graxos respectivamente, o que torna-os favoráveis como fonte de ácidos graxos insaturados.

Tabela 4. Percentuais de EPA + DHA e dos ácidos graxos saturados nos óleos refinados.

Ácido Graxo	Óleo Refinado Termomecânico	Óleo Refinado Ensilagem
% (EPA+DHA)	11,6 ± 0,2 ^a	11,4 ± 0,2 ^a
% ácidos graxos saturados	33,1 ± 0,9 ^a	32,4 ± 1,1 ^a

*letras iguais não apresentam diferença significativa a 95% (Teste de Tukey HSD).

A Tabela 4 apresenta os valores do percentual de ácidos graxos do grupo w-3 e do percentual dos ácidos graxos saturados nos óleos refinados. O aumento de 8,5% no valor do somatório de EPA+DHA em relação ao valor do óleo bruto, ocorreu durante o processo de refino devido a etapa de winterização que favorece o aumento destes ácidos graxos.

Os valores encontrados na Tabela 4 para o percentual do somatório de EPA+DHA e do percentual de ácidos graxos saturados dos óleos refinados obtidos pelos dois processos, resultaram numa variação média de 8,5% e 12,5%, respectivamente, em relação aos valores do óleo bruto (Tabelas 2 e 3). Estas variações foram maiores do que as citadas por Cunha et al.¹¹, que obtiveram para óleo de pescado um ganho de EPA+DHA de 5,2% e uma redução de saturados de 9,5%.

Os teores de EPA+DHA nos dois métodos de obtenção do óleo (Tabela 4) não apresentaram diferenças de médias, através do Teste de Tukey, a um nível de 95% ($p < 0,05$). Também observa-se nesta tabela, que esses métodos não apresentaram diferenças de médias em relação ao percentual de saturados, constatando-se que os valores deste percentual ficaram dentro da faixa do desvio-padrão.

CONCLUSÕES

O óleo de pescado refinado de corvina obtido pelo processo da ensilagem apresentou características semelhantes ao óleo refinado obtido via processo termomecânico, em relação ao percentual de ácidos graxos livres, ao índice de iodo, ao índice de saponificação e à Cor Lovibond, não apresentando diferença significativa ao nível de 95% pelo teste de Tukey.

Os ácidos graxos insaturados presentes nos óleos refinados termomecânico e da ensilagem ficaram na faixa de 62% do total de ácidos graxos, o que os tornam favoráveis como uma importante fonte de ácidos graxos insaturados. A etapa de winterização, em ambos os processos, resultou num ganho médio de EPA+DHA em torno de 8,5% e uma redução média de saturados na faixa de 12,5%.

REFERÊNCIAS

1. Navarro-García G, Pachego-Aguillar R, Alvarado-Bringas L, García-Ortega J. Characterization of the lipid composition and natural antioxidants in the liver oil of *Dasyatis brevis* and *Gymnura marmorata* rays. *Food Chem* 2004; 87: 89-96.
2. Cozzolino D, Murray I, Chree A, Scaife Jr. Multivariate determination of free fatty acids and moisture in fish oils by partial least-square regression and near-infrared spectroscopy. *Food Sc Technol* 2005; 38 (8): 821-58.
3. Hartmann L, Esteves W. Tecnologia de Óleos e Gorduras. São Paulo, Secretária da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia (Série Tecnologia Agroindustrial, 13); 1981.
4. Dapkevicius MLNE, Nout R, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. Lipid and protein changes during the ensilage of blue whiting (*Micromesistius poutassou* Risso) by acid and biological methods. *Food Chem* 1998; 63 (1): 97-102.
5. Goddard JS, Perret JSM. Co-drying fish silage for use in aquafeeds. *Anim Feed Sci Technol*, 2005; 118 (3-4): 337-42.
6. Seibel NF, Souza SAAL. Produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. *Braz J Food Technol* 2003; 6 (2): 333-7.
7. Windsor M, Barlow S. Introducción a los Subproductos de Pesquería. Zaragoza: Ed. Acirbia; 1984.
8. Morais MM, Pinto LAA, Ortiz SCA, Crexi VT, Silva RL, Silva JD. Estudo do processo de refino do óleo de pescado. *Rev Inst Adolfo Lutz* 2001; 60(1):23-33.
9. Salas A, Chavez J, Cueto M, Ayala ME. Estabilización de aceite de pescado destinado a la alimentación humana. *Bol Inv Tec Pes Peru* 2003; 5:73-80.
10. BERNardini, E. Tecnologia de aceites y grasas. Madrid: Ed. Alhambra S.A.; 1986.
11. Cunha DC, Souza-Soares LA, Pinto LAA. Estudo do fracionamento físico do óleo de pescado via "winterização". *Braz J Food Technol* 2002; 97(5): 183-8.

12. Azbar N, Yonar T. Comparative evaluation of laboratory and full-scale treatment alternatives for the vegetable oil refining industry wastewater (VORW). *Process Biochem* 2004; 39: 869-75.
13. Benites A I. Farinha de silagem de resíduos de pescado: elaboração, complementação com farelo de arroz e avaliação biológica em diferentes espécies. [Dissertação de mestrado]. Rio Grande, RS: Fundação Universidade Federal do Rio Grande; 2003.
14. Simões IS, Gioelli LA. Crystal morphology of binary and ternary mixtures of hydrogenated fats and soybeans oil. *Braz Arch Biol Technol* 2000; 43(2): 241-8.
15. American Oil Chemists Society. Official and Tentative Methods of American Oil Chemist's Society, 3rded., 1980.
16. American Oil Chemists Society. Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. 5 ed. Washington: AOCS; 2002.
17. Box GEP, Hunter WG, Hunter JS. *Statistics for Experiments: An Introduction to Design, Data Analysis and Model Building*. 1sted. New York: Ed. John Wiley & Sons; 1978.
18. Ganga A, Nieto S, Sanhuez J, Romo C, Speisky H, Valenzuela A. Concentration and stabilization of n-3 polyunsaturated fatty acids sardine oil. *J Am Oil Chem Soc* 1998; 75 (6): 733-6.
19. Duarte G R M. Estudo da composição de ácidos graxos e colesterol em óleos de peixes do rio Araguaia. [Dissertação de mestrado]. Goiânia, Goiás: Universidade de Goiás, 2001. 120p.