

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ  
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM  
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL DE MESTRADO

**Extração e caracterização de óleo de vísceras de rã-touro**  
*(Rana catesbeiana)*

Henrique Alipio Perina

TOLEDO - PR - BRASIL

Fevereiro de 2016

Henrique Alipio Perina

**Extração e caracterização de óleo de vísceras de rã-touro**  
**(*Rana catesbeiana*)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em **Desenvolvimento de Processos**.

Orientadora: Prof. Dr. Mônica L. Fiorese

Co-orientador: Prof. Dr. Carlos E. Borba

**TOLEDO - PR - BRASIL**

**Fevereiro de 2016**

## **FOLHA ASSINATURAS**

# AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha família e minha namorada que me apoiaram incondicionalmente e me ajudaram a chegar ao final deste trabalho

Agradeço aos meus orientados, Mônica L. Fiorese e Carlos E. Borba, pelos suas dedicações, ensinamentos e contribuições para meu crescimento científico e profissional.

Agradeço também aos demais componentes da banca, Fabiano B. Scheufele e Reinaldo A. Bariccatti, por suas valiosas contribuições a este trabalho.

Agradeço a Kátia A. Santos que me ajudou muito com diversos experimentos e análises.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação de Engenharia Química da UNIOESTE, Cleusa Z. Nenevê e a Anna P. V. F. de Lima pelo auxílio e paciência na execução deste trabalho

Agradeço a Capes pelo suporte financeiro.

Por fim, agradeço a todos os demais professores, funcionários, colegas e familiares que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Que os vossos esforços  
desafiem as impossibilidades,  
lembrai-vos de que as grandes  
coisas do homem foram  
conquistadas do que parecia  
impossível.”*

*Charles Chaplin*

# SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	11
<b>2. Objetivos</b> .....	13
2.1 <i>Objetivo geral</i> .....	13
2.2 <i>Objetivos específicos</i> .....	13
<b>3. Revisão Bibliográfica</b> .....	14
3.1 Ranicultura .....	14
3.2 Óleos e gorduras .....	16
3.2.1 <i>Fontes de óleos e gorduras</i> .....	16
3.2.2 <i>Definição e composição de óleos e gorduras</i> .....	18
3.2.2.1 <i>Acilglicerol</i> .....	18
3.2.2.2 <i>Ácidos graxos</i> .....	19
3.2.2.3 <i>Vitaminas lipossolúveis</i> .....	20
3.2.2.4 <i>Esteróis</i> .....	24
3.2.3 <i>Aplicações de óleos e gorduras</i> .....	25
3.2.4 <i>Qualidade de óleos e gorduras</i> .....	26
3.2.4.1 <i>Índice de Acidez</i> .....	27
3.6.4.2 <i>Índice de Peróxido</i> .....	27
3.6.4.3 <i>Análise Térmica</i> .....	28
3.6.4.4 <i>Viscosidade</i> .....	29
3.3 Métodos de Extração .....	30
3.3.1 <i>Extração mecânica</i> .....	30
3.3.2 <i>Extração com solvente</i> .....	32
3.3.3 <i>Extração com fluido supercrítico</i> .....	32
3.4 Considerações finais .....	36
<b>4. Materiais e Métodos</b> .....	37
4.1 Matéria-prima .....	37
4.2 Caracterização da Matéria-prima.....	37
4.2.1 <i>Umidade</i> .....	37
4.2.2 <i>Quantidade total de lipídeos</i> .....	38

4.2.3	<i>Quantidade total de proteínas</i> .....	38
4.2.4	<i>Quantidade cinzas</i> .....	39
4.3	Extração do Óleo .....	40
4.3.1	<i>Extração mecânica</i> .....	40
4.3.2	<i>Extração supercrítica</i> .....	42
4.4	Caracterização do óleo de rã.....	43
4.4.1	<i>Índice de acidez</i> .....	43
4.4.2	<i>Índice de Peróxido</i> .....	44
4.4.3	<i>Análise da composição de ácidos graxos</i> .....	45
4.4.4	<i>Análise térmica do óleo de rã-touro</i> .....	45
4.4.5	<i>Viscosidade cinemática</i> .....	46
4.4.6	<i>Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier</i> .....	46
<b>5.</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>47</b>
5.1	Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima .....	47
5.2	Extração de óleo do corpo gorduroso da rã-touro .....	48
5.2.1	<i>Extração mecânica</i> .....	48
5.2.2	<i>Extração supercrítica</i> .....	51
5.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier .....	54
5.4	Análise Térmica - DSC.....	55
5.5	Composição de Ácidos graxos .....	58
5.6	Viscosidade cinemática .....	61
5.7	Considerações finais .....	62
<b>6.</b>	<b>Conclusões</b> .....	<b>64</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas</b> .....	<b>66</b>
<b>APÊNDICE A</b>	.....	<b>79</b>
<b>ANEXO A</b>	.....	<b>84</b>
<b>ANEXO B</b>	.....	<b>85</b>
<b>ANEXO C</b>	.....	<b>86</b>
<b>ANEXO D</b>	.....	<b>87</b>
<b>ANEXO E</b>	.....	<b>876</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 – RÃ-TOURO ( <i>RANA CATESBEIANA</i> ) .....	15
FIGURA 3.2 – CORPO GORDUROSO DA RÃ-TOURO. ....	16
FIGURA 3.3 – ESTRUTURAS DOS ACILGLICERÓIS.....	19
FIGURA 3.4 – ESTRUTURA QUÍMICA DE DIFERENTES FORMAS DA VITAMINA A. ....	21
FIGURA 3.5 – ESTRUTURA QUÍMICA DA (A) VITAMINA D2 (ERGOCALCIFEROL) E (B) VITAMINA D3 (COLECALCIFEROL). ....	22
FIGURA 3.6 - ESTRUTURA QUÍMICA DO TOCOFEROL E TOCOTRIENOL.....	23
FIGURA 3.7 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DAS PRINCIPAIS VITAMINAS K.....	24
FIGURA 3.8 – ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS ESTERÓIS. ....	25
FIGURA 3.9 - EXEMPLO DE ANÁLISE TÉRMICA PELA TÉCNICA CALORIMETRIA EXPOLATÓRIA DIFERENCIAL (DSC) .....	29
FIGURA 3.10 – PRENSA HIDRÁULICA (A) E CONTINUA DO TIPO EXPELER (B) .....	31
FIGURA 3.11 - DIAGRAMA DE FASES GENÉRICO PARA FLUÍDO SUPERCRÍTICO MONOCOMPONENTE.....	34
FIGURA 4.1 - MÓDULO DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAL COM AQUECIMENTO.....	40
FIGURA 4.2 - FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO POR Prensagem. ....	41
FIGURA 4.3 - FLUXOGRAMA DO MÓDULO DE EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA. ....	43
FIGURA 5.1 – ÍNDICE DE ACIDEZ E DE PERÓXIDO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA DE EXTRAÇÃO POR Prensagem. ....	49
FIGURA 5.2 - CURVAS CINÉTICAS EXPERIMENTAIS DAS EXTRAÇÕES DE ÓLEO DE RÃ-TOURO COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA: ■ (80°C, 150 BAR); ● (60°C, 150 BAR); ▲ (40°C, 150 BAR).....	52
FIGURA 5.3 – COMPARAÇÃO ENTRE OS RENDIMENTOS OBTIDOS NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA NESTE TRABALHO COM OS OBTIDOS POR RUBIO-RODRÍGUEZ ET AL. (2008) NA EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE ÓLEO DE PEIXE A PARTIR DE RESÍDUOS. ....	53
FIGURA 5.4 – ESPECTROS FTIR: (A) EXTRAÇÃO MECÂNICA (40°C); (B) EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA (80°C).....	54
FIGURA 5.5 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 ML MIN <sup>-1</sup> .....	56
FIGURA 5.6 – VISCOSIDADE DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDOS EM DIFERENTES TEMPERATURAS DE EXTRAÇÃO MECÂNICA: ■ VISCOSIDADE MEDIDA A 30°C; ● VISCOSIDADE MEDIDA A 20°C.....	62
FIGURA A.1 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 30°C SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 ML MIN <sup>-1</sup> .....	79
FIGURA A.2 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 40°C SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 ML MIN <sup>-1</sup> .....	79



FIGURA A.3 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 50°C SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	80
FIGURA A.4 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 60°C SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	80
FIGURA A.5 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 70°C SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	81
FIGURA A.6 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 80°C SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	81
FIGURA A.7 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 90°C SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	82
FIGURA A.8 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 40°C E 150 BAR SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	82
FIGURA A.9 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 60°C E 150 BAR SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	83
FIGURA A.10 - CURVA DE ESTABILIDADE OXIDATIVA NÃO-ISOTÉRMICA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 80°C E 150 BAR SUBMETIDO AO FLUXO DE OXIGÊNIO DE 50 mL MIN <sup>-1</sup> .....	83
FIGURA E.1 – CROMATOGRAMA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA A 40°C.....	89
FIGURA E.2 - CROMATOGRAMA DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA A 80°C E 150 BAR.....	90

## LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - TÉCNICAS TERMOANALÍTICAS CLASSIFICADAS CONFORME A PROPRIEDADE FÍSICA MENSURADA. ....	28
TABELA 3.2 - PROPRIEDADES FÍSICAS CRÍTICAS DE FLUÍDOS. ....	34
TABELA 4.1 – RAMPAS DE TEMPERATURA DO BLOCO DIGESTOR.....	38
TABELA 5.1 – CARACTERIZAÇÃO DO CORPO GORDUROSO DA RÃ-TOURO. ....	47
TABELA 5.2 - RENDIMENTO DE ÓLEO EXTRAÍDO NA Prensagem Mecânica.....	48
TABELA 5.3 - CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS DAS EXTRAÇÕES COM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO E RENDIMENTOS OBTIDOS APÓS 180 MINUTOS DE EXTRAÇÃO.....	51
TABELA 5.4 - TEMPO E TEMPERATURA DE INDUÇÃO OXIDATIVA OBTIDOS POR TERMOGRAMAS NÃO-ISOTÉRMICOS DO ÓLEO. ....	57
TABELA 5.5 - COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE RÃ-TOURO OBTIDO POR EXTRAÇÃO MECÂNICA E SUPERCRÍTICA. ....	59
TABELA 5.6 – COMPARAÇÃO ENTRE A COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA RÃ-TOURO NA LITERATURA E NESTE TRABALHO.....	59
TABELA 5.7 – COMPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DE RÃ-TOURO COM ÓLEOS DE VÍSCERAS DE PEIXES. ....	60
TABELA A.1 – EXEMPLO DE ÁCIDOS GRAXOS. ....	84

# **Extração e caracterização de óleo de vísceras de rã-touro**

## **(*Rana Catesbeiana*)**

**AUTOR: HENRIQUE ALIPIO PERINA**

**ORIENTADORES: MÔNICA LADY FIORESE**

**CARLOS EDUARDO BORBA**

Dissertação de Mestrado; Programa de Pós-graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do oeste do Paraná; Rua da faculdade, 645; CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brasil.

### **RESUMO**

O processamento da carne de rã-touro (*Rana catesbeiana*) produz um resíduo chamado corpo gorduroso, rico em óleo e/ou gordura. Na extração de óleos vegetais e animais, tradicionalmente, são empregados métodos como a prensagem e/ou a utilização de solventes orgânicos, porém o método de extração com solventes apresenta diversos inconvenientes. Dentro deste contexto, este projeto de investigação teve por objetivo caracterizar o corpo gorduroso, avaliar a influência da temperatura tanto na extração por prensagem quanto na extração supercrítica e por fim realizar a modelagem matemática do processo de extração supercrítica empregando um modelo fenomenológico. Na caracterização do corpo gorduroso o teor médio de umidade foi de 4,23%, teor de proteínas de 2,98%, teor de cinzas de 0,18% e um teor de lipídios de 92,52%. Empregando-se a extração mecânica obteve-se rendimentos entre 62,78% e 68,54% de óleo final. Ao passo que na extração supercrítica com dióxido de carbono obtiveram-se rendimentos de 17,24%, 31,78% e 52,61% de óleo final. O óleo obtido por extração mecânica apresentou valores de índice de acidez entre 2,32 a 2,86 KOH g<sup>-1</sup> e valores de índice de peróxido entre 0,47 a 1,26 mEq kg<sup>-1</sup>. Os ensaios de viscosidade cinemática para as amostras obtidas por diferentes temperaturas de extração mecânica indicam que os óleos apresentam viscosidades cinemáticas similares, sugerindo que as composições também sejam similares. A técnica de espectroscopia por FT-IR sugeriu que os óleos obtidos por extração mecânica (40°C) e por extração supercrítica (80°C) apresentam espectros vibracionais similares. No que se refere à ácidos graxos observa-se que as diferentes técnicas

empregadas de extração apresentaram composição similar, sendo esta de 75,5% de ácidos graxos insaturados e 24,5% de ácidos graxos saturados. A análise calorimétrica para avaliação da estabilidade oxidativa (EO) demonstrou que o óleo extraído a 40°C apresentou a melhor EO. Desta forma, este trabalho mostrou o potencial do corpo gorduroso como fonte de obtenção de óleo. As extrações por prensagem obtiveram rendimentos elevados e a temperatura do processo apresentou pouca influência. As extrações supercríticas empregando dióxido de carbono foram influenciadas diretamente pela temperatura e apresentaram rendimento inferior a extração por prensagem.

**Palavras-chave:** rã-touro; óleos e gorduras; extração mecânica; extração supercrítica.

# **Extraction and characterization of bullfrog oil viscera (*Rana catesbeiana*)**

**AUTHOR: HENRIQUE ALIPIO PERINA**

**SUPERVISORS: MÔNICA LADY FIORESE**

**CARLOS EDUARDO BORBA**

Master Dissertation; Chemical Engineering Master Graduation Program; State University of West Paraná; Faculdade St., 645; z/c: 85903-000 - Toledo - PR, Brazil.

## **ABSTRACT**

The processing of bullfrog meat (*Rana catesbeiana*) produces a residue called fat body, rich in oil and/or fats. For the extraction of vegetable and animal oils the traditionally employed methods are pressing and/or the use of organic solvents, but the solvent extraction method has several drawbacks. In this sense, this research project aimed to characterize the fat body, to investigate the influence of temperature both in the press extraction as well as supercritical extraction. In the characterization of the fat body the observed average content of moisture was 4,23%, protein was 2,98%, ash was 0,18% and lipids was 92,52%. The extraction by pressing reached yields of 62.78% and 68.54% of final oil. The supercritical extraction with carbon dioxide achieved yields of 17.24%, 31.78% and 52.61% final oil. The observed acid value ranged between 2.32 and 2.86 KOH g<sup>-1</sup>. The peroxide values varied from 0.47 to 1.26 mEq kg<sup>-1</sup>. The fatty acid composition consisted of 75.5% of unsaturated fatty acids and 24.5% saturated fatty acids. The viscosity tests for oils obtained at different temperatures of mechanical extraction indicated that oils have a similar composition. The FTIR spectroscopy suggested that the oils obtained by both processes are similar. Calorimetric analysis was employed to evaluate the oxidative stability (OS), wherein that the extracted oil at 40°C presented the best OS. The obtained results evidence an alternative the potential of the fat body as a source of obtaining oil. Press extraction obtained high yields and was not influenced by the process temperature. On the contrary, the supercritical extraction using carbon dioxide was directly influenced by temperature and reached lower yields when compared to press extraction.

**Key-words:** Bullfrog; Oils and fats; Press extraction; Supercritical extraction.

## 1. Introdução

A produção de rã-touro (*Rana catesbeiana*) no Brasil iniciou na década de 30, introduzida pelo técnico canadense Tom Cyril Harrison. Ao contrário de outras espécies de Rã nativas, como a Rã Pimenta e a Rã Manteiga, não é considerada um animal silvestre brasileiro e sua criação e comercialização é legal.

Atualmente o Brasil é considerado o segundo maior produtor mundial de carne rã-touro, perdendo somente para Taiwan. A carne das coxas é o principal produto comercializado, entretanto, novos produtos podem ser criados a partir dos seus subprodutos.

Um subproduto que merece destaque é o corpo gorduroso, o principal órgão de armazenamento de lipídios nos anfíbios e, desta forma, uma possível fonte de obtenção do óleo de rã. Estudos acerca do óleo do corpo gorduroso da rã-touro indicam uma grande quantidade de ácidos graxos insaturados em sua composição, entretanto, existem poucos estudos sobre o processo de extração e seus parâmetros na literatura.

Para obtenção do óleo do corpo gorduroso da rã-touro pode-se utilizar o método de extração por prensagem, o método de extração com fluido supercrítico, dentre outros. A primeira metodologia não exige equipamentos sofisticados além de não utilizar solventes. Além disso, a extração com fluidos em estado supercrítico pode ser uma alternativa mais eficiente visando a preservação da qualidade final do óleo e a preservação de possíveis compostos especiais pois requer baixas temperaturas para o dióxido de carbono atingir seu ponto crítico ( $T_c = 31,03 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 73,80 \text{ bar}$ ). O método de extração supercrítica, além de permitir o uso de solventes atóxicos, não necessita de etapas posteriores de purificação do óleo como acontece, por exemplo, nas extrações com solventes orgânicos como hexano.

Poucos estudos sobre a composição de ácidos graxos do corpo gorduroso de rã-touro foram relatados na literatura. McMullin et al. (1968) estudaram a composição em ácidos graxos do óleo de gordura corporal obtidos por extração por solvente com metanol. Mendez et al. (1998) estudaram a composição de ácidos graxos da gordura corporal. No entanto, nenhuma informação pode ser encontrada na literatura sobre a obtenção de óleo de rã-touro aplicando o processo de extração mecânica, extração supercrítica, e os efeitos dos parâmetros (temperatura) na composição química e no rendimento. Além disso, nenhuma informação pode ser encontrada na literatura sobre a cinética de extração supercrítica

empregando dióxido de carbono na obtenção de óleo de rã-touro a partir do corpo gorduroso.

Neste contexto, o presente estudo focou na avaliação do processo de extração mecânica (ME) com extração com fluido supercrítico (SFE) para obtenção do óleo de rã-touro de forma a avaliar o rendimento de extração em ambos processos, composição química e qualidade dos óleos obtidos. Para isto, definiu-se como parâmetros de qualidade a serem determinados o índice de peróxido, índice de acidez, ácidos graxos totais, viscosidade e estabilidade oxidativa.



## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Este trabalho teve como objetivo geral a extração e caracterização do óleo do corpo gorduroso da rã-touro.

### **2.2 Objetivos específicos**

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

- Caracterização da matéria-prima (corpo gorduroso) por meio da determinação dos seguintes parâmetros: teor de umidade, teor de lipídios, teor de proteínas e o teor de cinzas.
- Avaliação do efeito da temperatura no processo de obtenção do óleo do corpo gorduroso por prensagem mecânica (extração convencional) e no processo de extração supercrítica empregando dióxido de carbono.
- Caracterização do óleo por meio da determinação dos seguintes parâmetros; índice de acidez, índice de peróxido, composição de ácidos graxos, viscosidade, FT-IR e estabilidade oxidativa.

### 3.Revisão Bibliográfica

#### 3.1 Ranicultura

A ranicultura é definida como a criação racional de rãs utilizando técnicas específicas, com o objetivo principal de produzir carne de rã (BELTRÃO, 2008). No Brasil a criação de rãs teve início em 1935 quando o canadense Tom Cyrill Harrison instalou o primeiro ranário na baixada fluminense (RJ), importando dos Estados Unidos cerca de 300 casais de rã-touro popularmente conhecidas como rã-touro (LIMA e AGOSTINHO, 1992 citado por CARRARO, 2008).

A ranicultura até então, não se baseava em qualquer tipo de parâmetro técnico ou de manejo. Registros mostram que somente a partir de 1970 foi estabelecida com caráter científico a produção intensiva de rã-touro, mas mesmo assim, mantinha-se o interesse voltado somente ao aprimoramento dos padrões zootécnicos de sua produção. No início da década de 1980 com a evolução do setor, a utilização de ração balanceada para as rãs foi introduzida, sendo possível com isto um aumento significativo no número de ranários (CARRARO, 2008).

A três espécies de rã nativas que se destacam no cenário nacional são a rã manteiga (*Leptodactylus latrans*), rã pimenta (*Leptodactylus labyrinthicus*) e a gia (*Leptodactylus pentadactylus*), porém estas espécies são classificadas como animais silvestres brasileiros e suas comercializações são proibidas pelo IBAMA. Somente a espécie rã-touro é legalizada para a criação, comercialização e exportação nos ranários nacionais (CRIBB, 2013).

A rã-touro conforme Figura 3.1, pertencente à classe *Amphibia*, família *Ranidae*, gênero *Rana* e espécie *Rana catesbeiana*. Esta espécie foi introduzida no Brasil por empreendedores que viram grandes potencialidades comerciais pelas qualidades nutricionais e organolépticas da sua carne. O Brasil é o maior produtor de carne de rã-touro na América Latina, exportando para países como o Chile e a Argentina (PASTERIS, 2006; BELTRÃO, 2008)

Estimativas recentes da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), referente ao ano de 2009, mostram que o Brasil figura como um dos maiores produtores mundiais de carne rã com 400 toneladas por ano, ficando atrás somente de Taiwan (SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA, 2013).



**Figura 3.1** – Rã-touro (*Rana catesbeiana*) Fonte: Página do departamento de pesquisa sobre ranicultura da Universidade Federal de Viçosa<sup>1</sup>.

Atualmente a criação de rãs é uma atividade em fase emergente e em franco crescimento no Brasil, com mais de 600 ranários e 15 indústrias de abate e beneficiamento, implantados principalmente na Região Sudeste do país (BELLUZZO *et al.*, 2010).

Esta carne possui baixo teor de gordura ( $\approx 3\%$ ) e, além disto, é a única carne produzida em cativeiro que possui os 10 aminoácidos básicos para o ser humano. A carne de rã tem sido recomendada por médicos e nutricionistas para controle de obesidade, colesterol e arteriosclerose (LIMA e AGOTINHA, 1988 citado por CARRARO, 2008; BELTRÃO, 2008).

A carne das coxas das rãs, que representam em média 50% da parte comestível deste anfíbio, consiste no principal produto da ranicultura. No entanto, segundo Furtado (2006) o mercado não tem se limitado apenas ao consumo da carne das coxas. Novos produtos derivados do processamento da rã-touro estão sendo desenvolvidos e ganhando cada vez mais mercado. A pesquisadora tem como exemplo a criação de um patê desenvolvido com a carne do dorso da rã-touro.

Gonçalves & Otta (2008) desenvolveram um hambúrguer com a carne do dorso da rã-touro. O hambúrguer apresentou características físico-químicas similar da carne de rã-touro e obteve um alto índice de aceitabilidade pelos provadores, sendo este nível de 88,4% de aprovação.

---

<sup>1</sup> Disponível em: <<http://www.ufv.br/dta/ran/>> Acesso em março, 2016.

O Laboratório de Ranicultura e Produtos da Aquicultura, da Universidade Federal da Paraíba desenvolve pesquisa sobre a ranicultura desde 2000. Segundo os pesquisadores, há a possibilidade do aproveitamento dos resíduos da rã-touro, como fígado, pele e outros órgãos, no desenvolvimento de novos produtos.

Um dos resíduos gerados no processamento da carne de rã-touro é o corpo gorduroso, apresentado na Figura 3.2. Este órgão constituído de tecido adiposo e corresponde em média 2% do peso vivo do animal e, é o principal responsável pelo armazenamento de lipídios na forma de triacilglicerídeos. Assim este resíduo pode ser uma possível fonte de obtenção de óleo e/ou gordura (MÉNDEZ *et al.*, 1998; WRIGHT *et al.*, 2011).



**Figura 3.2** – Corpo gorduroso da rã-touro. Fonte: Página do departamento de pesquisa sobre ranicultura da Universidade Federal de Viçosa<sup>2</sup>.

## 3.2 Óleos e gorduras

### 3.2.1 Fontes de óleos e gorduras

Óleos e gorduras podem ser obtidos a partir de diversas fontes vegetais ou animais. As principais fontes vegetais, segundo Gunstone (2011), são constituídas por sementes oleaginosas como a palma, soja e canola. Fontes animais são constituídas por tecidos de armazenagem lipídica, e estes podem ser de peixes, mamíferos ou até mesmo anfíbios (GIOIELLI, 1996).

O óleo de palma, também conhecido como azeite de dendê, é extraído da polpa do fruto da palma que contém um teor de óleo média entre 45% a 50% (GUSTONE, 2011). O óleo de palma é uma das *commodities* mais negociadas do mundo, representando 25% do total óleo e gorduras produzidos 2007 (LAM *et al.*, 2009). O óleo de palma é constituído

---

<sup>2</sup> Disponível em: <<http://www.ufv.br/dta/ran/>> Acesso em março, 2016.

de aproximadamente 50% de ácidos graxos saturados, sendo o principal o ácido Palmítico (16:0), e aproximadamente 45% de ácidos graxos monoinsaturados, sendo o principal o ácido Oléico (18:1) (SAMBANTHAMURTHI *et al.*, 2000).

A soja é uma das oleaginosas mais importantes do mundo, fornecendo proteína vegetal e óleo (IWANAGA *et al.*, 2007). Esta oleaginosa fornece entre 18% a 20% de teor de óleo (GUNSTONE, 2011). O óleo de soja é constituído principalmente de ácidos graxos insaturados, aproximadamente 84%, sendo os principais ácidos o ácido Linoléico (18:2) e o Oléico (18:1) (FONSECA & GUITARREZ, 1974).

O óleo de canola é obtido da oleaginosa *Brassica napus*, sendo este óleo o terceiro mais consumido no mundo (GUSTONE, 2011). Seus tores médios de óleo variam entre 33% a 47% (VASCONCELOS, 1998). O óleo de canola contém, em média, 65% de ácidos graxos insaturados e 35% de ácidos graxos saturados. Os principais ácidos graxos é o Oléico (18:1) e o Linoléico (18:2) (KARANI *et al.*, 2013). Além de ser uma fonte de ácidos graxos a canola, soja, dentre outras oleaginosas tem demonstrado ser fonte de vitaminas lipossolúveis, como a vitamina E (GLISZCZYNSKA-SWIGLO *et al.*, 2007; ELISIA *et al.*, 2013).

Óleos de peixes, geralmente, são produzidos a partir do fígado do peixe, principalmente de peixes classificados como gordurosos. O teor de óleo do fígado do peixe varia entre espécie, chegando a um teor de 45% (SEGURA, 2012). Temos como exemplos comerciais o óleo de salmão, fígado de bacalhau, dentre outros. Os óleos de peixes, diferentemente dos óleos de oleaginosas, são ricos em de ácidos graxos polinsaturados de longa cadeia, principalmente o ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5) e o ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6). Além disso, os oleos de peixe, geralmente, também apresentam teores elevados de vitamina A e D (RUBINO, 2008; EFSA, 2010).

O óleo da rã-touro obtido do corpo gorduroso apresenta a composição de ácidos graxos, em média, de 75,5% de ácidos graxos insaturados e de 24,5% de ácidos graxos saturados. McMullin (1968) obteve a composição de ácidos graxos do óleo do corpo gorduroso de rã-touro de 21% de ácidos graxos saturados e 79% de ácidos graxos insaturados, sendo os principais ácidos graxos o Oléico (18:1) e o Palmitoléico (16:1) e também obteve os ácidos graxos EPA e DHA. Méndez (1998) obteve como composição de ácidos graxos do óleo do corpo gorduroso de rã-touro de 28% de ácidos graxos saturados e 72% de ácidos graxos insaturados, sendo os principais o ácido Oléico (18:1), Palmítico (16:0) e também obteve os ácidos EPA e DHA.

### 3.2.2 Definição e composição de óleos e gorduras

A classificação de lipídeos em óleos e gorduras não depende da natureza da fonte de obtenção, mas sim do seu ponto de fusão na temperatura de 25°C. A 25°C os óleos são líquidos e as gorduras são sólidas ou pastosas (ANVISA, 2004).

Óleos e gorduras são misturas de lipídeos formados, principalmente, por triacilglicerídeos, que representam mais de 95% da massa total, além de outros componentes presentes em menor quantidade, como mono e diacilglicerídeos, ácidos graxos livres, esteróis e vitaminas lipossolúveis (A, D, K e E) (FARIA *et al.*, 2002; HIDALGO & ZAMORA, 2003).

#### 3.2.2.1 Acilglicerol

Os acilgliceróis consistem em até três moléculas de ácidos graxos ligados em um glicerol. São constituídos por monoacilglicerol, diacilglicerol e triacilglicerol e são a principal forma dos lipídios presentes em alimentos. Entre eles, o triacilglicerol é a forma mais comum encontrada, pois representa a principal forma de armazenamento de energia em plantas e nos animais por serem mais resistente a oxidação (KOŁOKOWSKA e SIKORSKI, 2002).

Monoacilgliceróis (MAGs) são acilgliceróis compostos por apenas uma molécula de ácido graxo substituída na hidroxila de um glicerol, podendo existir em duas formas isoméricas conforme é apresentado na Figura 3.3 (FREITAS *et al.* 2008).

Diacilgliceróis (DAGs) são acilgliceróis compostos por duas moléculas de ácidos graxos substituídas na hidroxila de um glicerol. DAGs podem existir em duas isoméricas, 1,2 (2,3)-Diacilglicerol e 1,3-Diacilglicerol (TAKASE, 2007). Triacilgliceróis (TAGs) são acilgliceróis compostos por três moléculas de ácidos graxos substituídas na hidroxila de um glicerol (KOŁOKOWSKA e SIKORSKI, 2002). Os TAGs contribuem entre 95% a 98% de toda a composição de óleos e gorduras. Comumente o ácido graxo insaturado está localizado na posição central dos TAGs e os ácidos graxos saturados nas extremidades (TAS e GOKMEN, 2015). Na Figura 3.3 são apresentados os isômeros de MAG e DAG e o TAG.

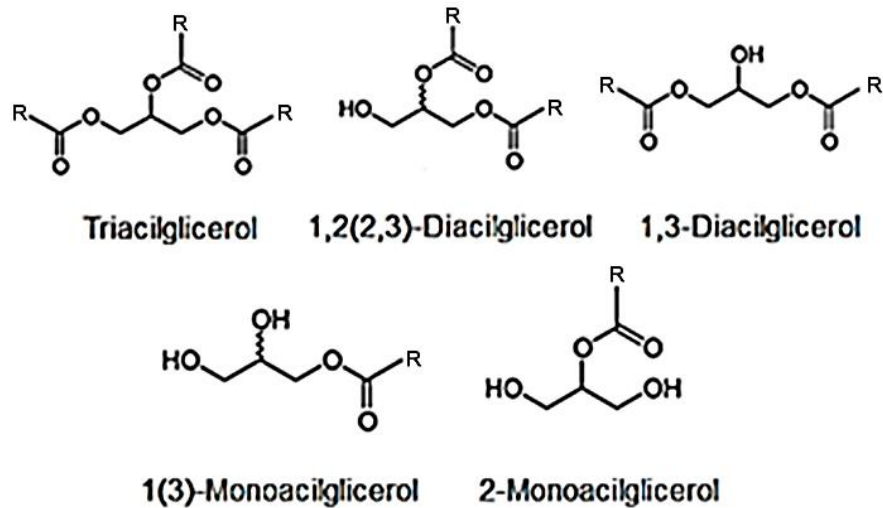


Figura 3.3 – Estruturas dos acilgliceróis. FONTE: FREITAS *et al.* 2008.

Quando se tem a quebra de uma ou mais ligação éster de uma molécula de acilglicerol pela ação enzima lipolíticas, pelo efeito da umidade ou altas temperaturas se tem a hidrólise dos óleos e gorduras produzindo ácidos graxos livres (AGL) (OSAWA *et al.*, 2006).

### 3.2.2.2 Ácidos graxos

Os ácidos graxos, na forma de ácidos graxos livres (AGL), estão presentes em pequenas quantidades nos óleos e gorduras. Entretanto, os ácidos graxos são os principais componentes dos acilglicerídeos que representam até 96% da massa total dos óleos e gorduras. Desta forma, a composição de ácidos graxos é responsável pelas características físico-químicas dos óleos e gorduras (MORETTO e FETT, 1998).

Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias de hidrocarbonetos com comprimento que varia entre quatro e trinta e seis carbonos. Esta cadeia pode ser totalmente saturada ou conter uma ou mais dupla ligação (cadeia insaturada). Uma nomenclatura simplificada especifica o comprimento da cadeia e o número de duplas ligações. A posição da ligação dupla é representada por um número sobrescrito a seguir da letra grega delta ( $\Delta$ ). Por exemplo, um ácido graxo com vinte carbonos e uma ligação dupla entre o carbono nove e dez é abreviado por 20:1 ( $\Delta^9$ ) (NELSON e COX, 2002).

Ácidos graxos que contém apenas ligações simples são denominados de ácidos graxos saturados (AGS). Os que contém uma ou mais duplas ligações entre os átomos de

carbono são denominados de insaturados. O ácido graxo que contém uma dupla ligação é chamado de ácido graxo monoinsaturado (AGM) e quanto contém mais de uma ligação dupla é designado como ácido graxo poli-insaturado (AGPI) (COUTINHO, 2002; SEGURA, 2012). Os ácidos graxos com mais de vinte átomos de carbono e no mínimo três ligações duplas são denominados como ácidos graxos altamente insaturados (AGAI) (SARGENT *et al.*, 2002). No Anexo A são apresentados alguns exemplos de ácidos graxos.

Nos seres humanos alguns ácidos graxos poli-insaturados não são biossintetizados pelo organismo e sua única forma de obtenção é pela alimentação. Fazem parte deste grupo os ácidos graxos conhecidos como ômega 3 e ômega 6. O ácido eicosapentaenóico (EPA, 20:5  $\omega$ -3),  $\alpha$ -Linolênico (18:3  $\omega$ -3) (ALA) e ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6  $\omega$ -3) são exemplos de ácidos graxos essenciais da família ômega 3. Na família dos ômegas 6 temos os ácidos Linoléico (18:2  $\omega$ -6) (LA) e o Araquidônico (20:4  $\omega$ -6) (AA) (MORETTO e FEET, 1998; ANDRADE e CARMO, 2006; RIBEIRO *et al.*, 2013)

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo destes ácidos graxos essenciais contribui positivamente para a saúde humana atuando na prevenção de doenças como distúrbios no sistema cardiovascular, artrite, hipertensão, inflamações em geral e asma (WANG *et al.*, 2006, SIMOPOULOS, 1990; KINSELLA, 1990; SUÁREZ-MAHECHA *et al.*, 2002).

### 3.2.2.3 Vitaminas lipossolúveis

Vitaminas lipossolúveis são substâncias orgânicas solúveis em óleos e gorduras presentes em muitos alimentos em pequenas quantidades e indispensáveis ao funcionamento do organismo humano. Independentemente dos fatores ambientais, a maioria dos organismos animais é incapaz de sintetizá-las, razão pela qual precisam ser incluídas nas dietas. São classificadas em quatro grupos que são as vitaminas A, D, E e K (NELSON e COX, 2002).

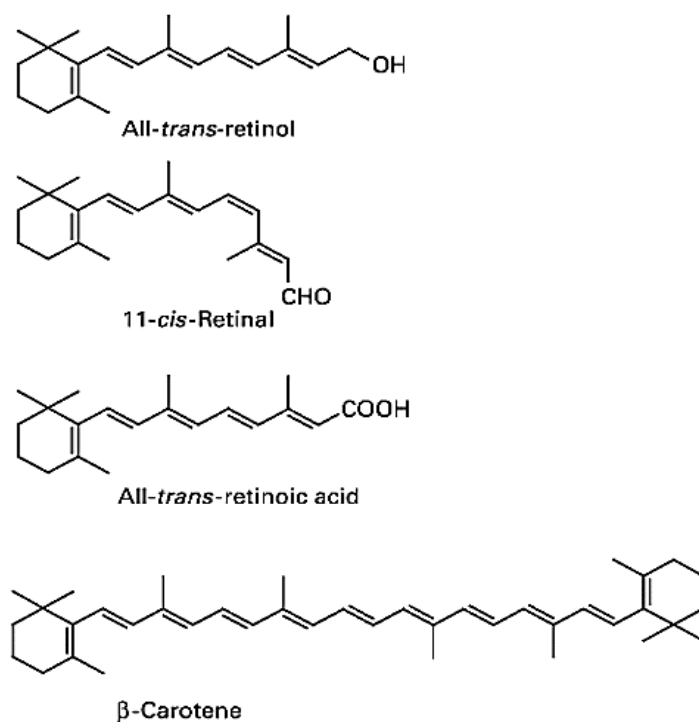
#### 3.2.2.3.1 Vitamina A

O termo genérico Vitamina A inclui dois grupos de compostos: vitamina A pré-formada e pró-vitamina A. O grupo das vitaminas A pré-formadas inclui compostos como o retinol, retinal, ácido retinóico e ésteres de retinilas, sendo o retinol o principal destas. Já o termo pró-vitamina A é usado para designar vários carotenoides que atuam como



precursores de vitamina A. Apesar de mais de 600 carotenoides terem sido isolados de fontes naturais, apenas cerca de 50 possuem atividades pró-vitamina A, sendo o  $\beta$ -caroteno o mais potente carotenoide precursor dessa vitamina (GUO *et al.* 2001; DEBIER & LARONDELLE, 2004; DURING & HARRISON, 2004; KARADAS *et al.* 2005) Na Figura 3.4 são apresentadas diferentes estruturas químicas da vitamina A.

A vitamina A (retinol) é encontrada somente em alimentos de origem animal como óleos de peixes, fígado, leite, queijo, manteiga, ovos e farinha de peixes. Vários vegetais, legumes, frutas e também os azeites de dendê e de buriti, possuem substâncias pró-vitamina A como o  $\beta$ -caroteno, que se convertem em vitamina A após absorção no organismo (DEBIER & LARONDELLE, 2004; VALDEZ *et al.*, 2000; FAO/WHO, 2004).

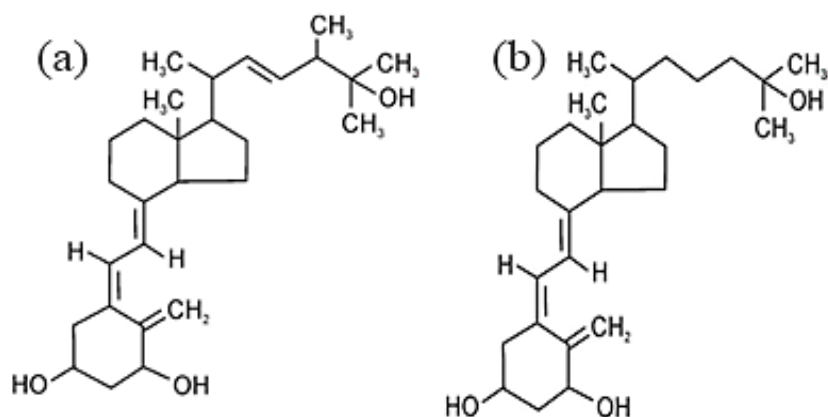


**Figura 3.4** – Estrutura química de diferentes formas da vitamina A. FONTE: DEBIER & LARONDELLE, 2004.

#### 3.2.2.3.2 Vitamina D

O termo vitamina D é utilizado para representar um grupo de vários hormônios esteroides. Suas duas formas principais são ergocalciferol (vitamina D2) e colecalciferol (vitamina D3). Na Figura 3.5 são apresentadas suas estruturas químicas (ALVES *et al.*, 2013; CAVALIER *et al.* 2014; MENA-BRAVO *et al.* 2015;). A vitamina D2 é encontrada

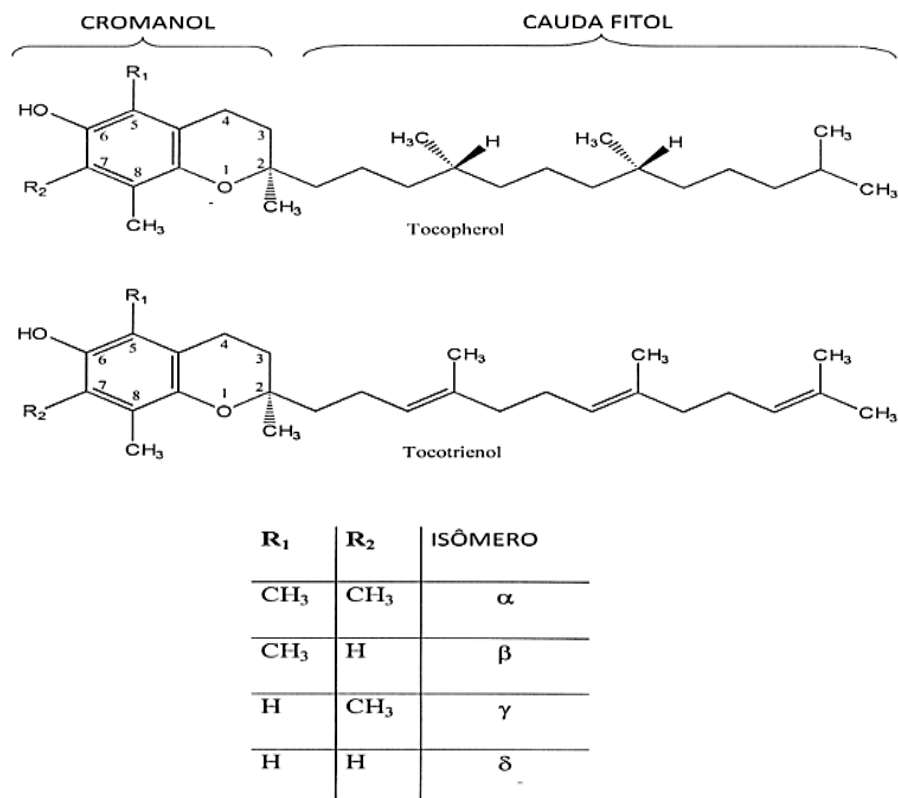
em plantas e leveduras, e a vitamina D3 é encontrada em gordura de peixe e ovo (JENAB *et al.*, 2010).



**Figura 3.5** – Estrutura química da (a) vitamina D2 (ergocalciferol) e (b) vitamina D3 (colecalciferol). FONTE: ALVES *et al.*, 2013.

#### 3.2.2.3.3 Vitamina E

O termo Vitamina E é utilizado para denominar oito diferentes compostos agrupados em dois grupos, os tocoferóis e tocotrienóis. Tanto o primeiro quanto o segundo grupo contemplam os quatro isômeros, Alfa, Beta, Gama e Delta, que se diferenciam na estrutura de acordo com o radical substituinte (TRABER e SIES, 1996; GUINAZI *et al.* 2009; RUPÉREZ *et al.*, 2001). Na Figura 3.6 são apresentadas suas estruturas.



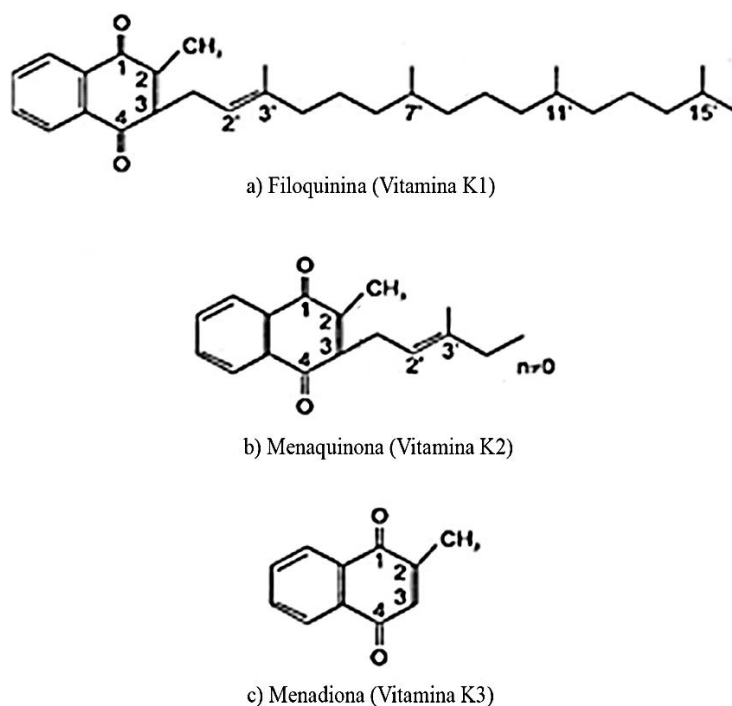
**Figura 3.6** - Estrutura química do tocoferol e tocotrienol. Fonte: RUPÉREZ et al. 2001

A vitamina E é encontrada na maioria dos óleos vegetais e pescados. Suas principais fontes são a soja, amendoim, algodão, girassol, manteiga, ovos, ervilhas, trigo, aveia e arroz integral. Os isômeros mais encontrados nestes alimentos são  $\alpha$ -tocoferol e  $\gamma$ -tocoferol (JIANG *et al.*, 2001; FERNANDES *et al.*, 2002; RAMALHO e JORGE, 2005). A vitamina E faz parte do grupo de nutrientes conhecidos como antioxidantes alimentares, sendo considerado o mais efetivo (SIRISHA *et al.*, 2010; RUPÉREZ *et al.*, 2001).

#### 3.2.2.3.4 Vitamina K

Vitamina K é o nome genérico dado a diversas substâncias do grupo das quinonas. As principais substâncias são a Filoquinona (vitamina K1), Menaquinona (vitamina K2) e Menadiona (vitamina K3). Na Figura 3.7 são apresentadas suas estruturas químicas (BOOTH *et al.*, 1994; GAST *et al.*, 2009; BOOTH, 2012). As vitaminas K estão presentes em legumes de folhas verdes, óleos vegetais e em produtos de origem animal como, carnes, ovos e queijos (BEULENS *et al.*, 2009; BOOTH, 2012). A vitamina K3, ao contrário das vitaminas K1 e K2, não é um composto naturalmente encontrado na natureza,

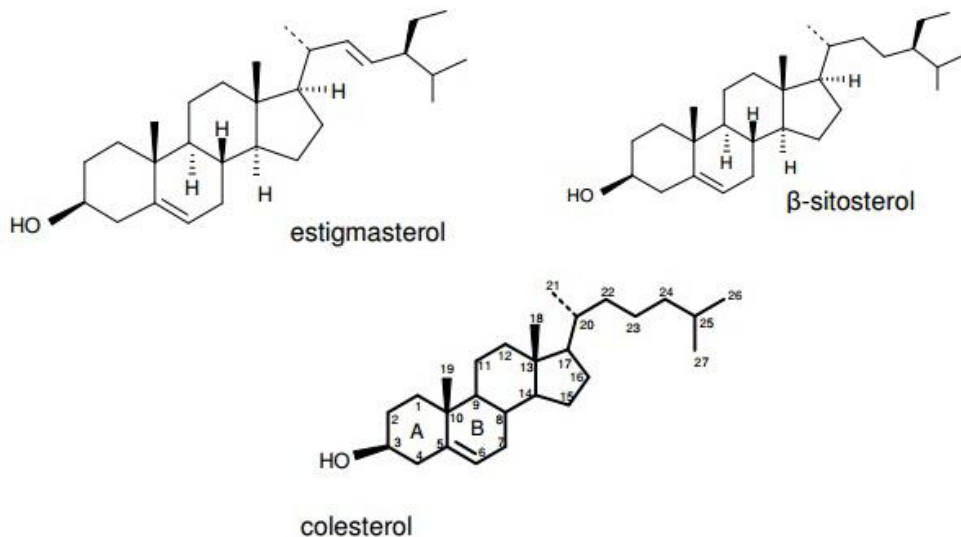
mas é facilmente convertida nos tecidos dos animais (SHEARE e NEWMAN, 2008; KNAPEN *et al.*, 2012)



**Figura 3.7** – Estruturas químicas das principais vitaminas K. FONTE: BEULENS *et al.*, 2009.

#### 3.2.2.4 Esteróis

Esteróis são substâncias orgânicas cuja estrutura básica é o ciclopentanoperidrofenantreno e são encontradas abundantemente em óleos e gorduras de origem animal (Colesterol) e vegetal (Fitoesterol). Os principais esteroides encontrados em óleos e gorduras animais são o Colesterol e em óleos e gorduras vegetais é o Estigmasterol e o  $\beta$ -sisterol. As estruturas químicas dos principais esteroides são apresentadas na Figura 3.8 (OLIVEIRA e BUENO, 1995; CLAYTON *et al.*, 1998; ALMEIDA, 2009).



**Figura 3.8** – Estrutura química dos principais esteróis. FONTE: OLIVEIRA e BUENO, 1995.

### 3.2.3 Aplicações de óleos e gorduras

A aplicação dos ácidos graxos poli-insaturados vem sendo explorado pela literatura com inúmeros estudos que demonstram seus benefícios farmacológicos à saúde humana (SIMONSON, 2004; HATANAKE & CURTI, 2007).

Os estudos de Manhezi *et al.* (2008) indicam que os ácidos graxos  $\alpha$ -linolênico (ômega 3) e linoléico (ômega 6) atuam como precursores nas sínteses dos ácidos graxos araquidônicos, eicosapentaenóico e docosahexaenóico, sendo estes, parte de funções celulares como a integridade e fluidez das membranas, atividades das enzimas de membrana e sínteses de prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. E por sua vez, possuem a capacidade de modificar reações inflamatórias e imunológicas.

No estudo de Padilha e Pinheiro (2004), os autores evidenciam os efeitos benéficos dos ácidos graxos essenciais na prevenção de câncer de mama. Segundo os autores, estudos experimentais têm indicado que os ácidos graxos poli-insaturados ômega 3 inibem a formação do câncer de mama, proporcionando redução de taxas de incidência de neoplasia mamária em países, cujo os consumos destes ácidos graxos são mais elevados, como é o caso dos países asiáticos. Em concordância com estes resultados, o estudo de Maillard *et al.* (2002) demonstra também o efeito dos ácidos graxos ômega 3 em mulheres com carcinoma mamário, sendo o resultado, uma relação inversa entre os níveis de ácidos graxos ômega 3 no tecido adiposo mamário e o risco de câncer, ou seja, gerando um efeito protetor ao risco de neoplasia mamária.

Cardoso *et al.* (2004) avaliaram em seu estudo a influência da administração tópica dos ácidos graxos essenciais  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$  3), linoléico ( $\omega$  6) e o ácido graxo não essencial oléico ( $\omega$  9) na cicatrização de feridas de ratos. Os autores observaram por análises microscópicas a evolução da cicatrização das feridas, e constataram que os ratos tratados com os ácidos linolênicos e oléicos apresentaram uma redução significativa da área do ferimento quando comparado com o grupo de controle.

Os estudos de Hatanaka e Curi (2007) evidenciam que a aplicação tópica dos ácidos graxos nos tratamentos de feridas é uma importante ferramenta terapêutica. Segundo eles, os ácidos graxos são substância de baixo custo, que proporcionam um curativo úmido oleoso que serve como barreira protetora contra microrganismos, evitado também a desidratação tecidual e mantendo a temperatura corpórea. Estes compostos também atuam no sistema imunológico conferindo um aumento da resposta orgânica contra determinados microrganismos.

Apesar de todos esses estudos terem demonstrados diversos benéficos farmacológicos dos ácidos graxos poli-insaturados a saúde humana, todos os autores convergem para a mesma opinião, onde mais estudos clínicos devem ser efetuados para esclarecer o seu mecanismo e eficiência na prevenção destes distúrbios.

#### 3.2.4 *Qualidade de óleos e gorduras*

A oxidação lipídica é a principal forma de deterioração de óleos e gorduras e depende principalmente do grau de insaturação dos ácidos graxos e da presença de fatores externos, como, exposição ao oxigênio, luz, íons metálicos ou altas temperaturas. (VANDAMME *et al.*, 2015; PAZHOUHANMEHR *et al.*, 2016). Óleos e gorduras que apresentam um maior teor de ácidos graxos insaturados são mais propensos a oxidação e apresentam maiores problemas de conservação (SHERWIN, 1976; PULLEN e SAEED, 2012).

A oxidação lipídica interfere diretamente no valor comercial dos óleos e gorduras levando ao desenvolvimento de compostos de aroma anormais e alterações químicas indesejáveis, resultando em diminuição do seu valor nutritivo e potenciais problemas de segurança alimentar (SILVA *et al.*, 1998; QI *et al.*, 2016). Tais mudanças podem ter sua origem na obtenção da matéria-prima, produção, processamento e armazenamento do óleo (BOBBIO & BOBBIO, 1992). Os principais fatores que favorecem ou inibem a oxidação de óleos e

gorduras são: alta proporção de ácidos graxos insaturados, altas temperaturas, Presença de resíduos de metais, água, enzima e a ausência de antioxidante

Diversos métodos são utilizados para avaliar a qualidade e a resistência a oxidação dos óleos e gorduras, também conhecido como a estabilidade oxidativa (EO). Estes métodos monitoram as alterações ocorridas na amostra mediante a análises como: índice de peróxidos, índice de acidez, análise sensorial, determinação de dienos conjugados, valor de carbonila, análise de voláteis, análise térmica entre outras, sendo que o índice de acidez e peróxidos são os mais usuais (DROZDOWSKI & SZUKALSKA, 1987, ANTONIASSI, 2001).

#### 3.2.4.1 Índice de Acidez

Segundo Morreto e Fett (1998) uma acidez alta indica a decomposição dos acilglicerídeos sendo acelerada por aquecimento e pela luz, e a rancidez é acompanhada pela formação de ácido graxo livre (AGL). Esta pode ser definida como a quantidade - em gramas - de ácido oléico livre para cada 100 g de óleo analisado. Este método acusa a formação em andamento de grupos carboxila ( $-\text{COOH}$ ), portanto a expressão do resultado indica uma ideia geral de acidez e não uma determinação específica de ácido oléico (MURGEL, 2010).

#### 3.6.4.2 Índice de Peróxido

O índice ou teor de peróxido é utilizado como um indicador do grau de oxidação do óleo ou gordura, sua presença aponta para indício de deterioração, que poderá ser verificada com a mudança do sabor e do odor característicos dos óleos (ESTEVEZ *et al.*, 1995; MEHTA *et al.*, 2015).

Este método é o mais comum para determinar o estado de degradação oxidativa de um óleo, entretanto, esta técnica só se aplica a determinação dos estágios iniciais de oxidação, já que está quantifica apenas os produtos primários da reação (ROSSEL *et al.*, 1983). O método mais utilizado é baseado na medida de iodo ( $\text{I}_2$ ) produzido por oxidação do iodeto de potássio (KI) pelos hidroperóxidos presentes no óleo, é geralmente expresso em termos de miliequivalentes de  $\text{O}_2$  por quilograma de óleo (AOCS, 2004).

### 3.6.4.3 Análise Térmica

As técnicas termoanalíticas vêm adquirindo importância crescente em todas as áreas de conhecimento na química básica e aplicada devido a disponibilidade de instrumentos controlados por microprocessadores, capazes de fornecer informações quanto ao comportamento térmico dos materiais de forma precisa e num tempo relativamente curto. Tendo ampla faixa de aplicação para medidas de propriedades físicas, estudo de reações químicas, avaliação da estabilidade térmica, determinação da composição de materiais e desenvolvimento de metodologia analíticas (OCHOCKA et al., 1990; WESOLOWSKI & ERECINSKA, 1998; FARIA et al., 2002). Na Tabela 3.2 é apresentado uma classificação das técnicas termoanalíticas, conforme a propriedade física mesurada.

A técnica de Calorimetria exploratória diferencial (DSC), segundo Rudnick (2001), vem sendo amplamente utilizada na caracterização térmica de óleos e gorduras, uma vez que, a reação de oxidação do óleo é uma reação exotérmica, ou seja, libera calor, assim tornando-se possível o emprego da técnica de DSC para investigar a estabilidade oxidativa (EO) de óleos e gorduras com grande potencial aplicação industrial (SIMON *et al.*, 2000; MICIC *et al.*, 2015).

**Tabela 3.1** - Técnicas Termoanalíticas classificadas conforme a propriedade física mensurada.

Propriedade física	Técnica derivada	Abreviatura
Massa	Termogravimetria	TG
	Análise de gás desprendido	EGD
Temperatura	Análise térmica diferencial	DTA
Entalpia	Calorimetria exploratória diferencial	DSC

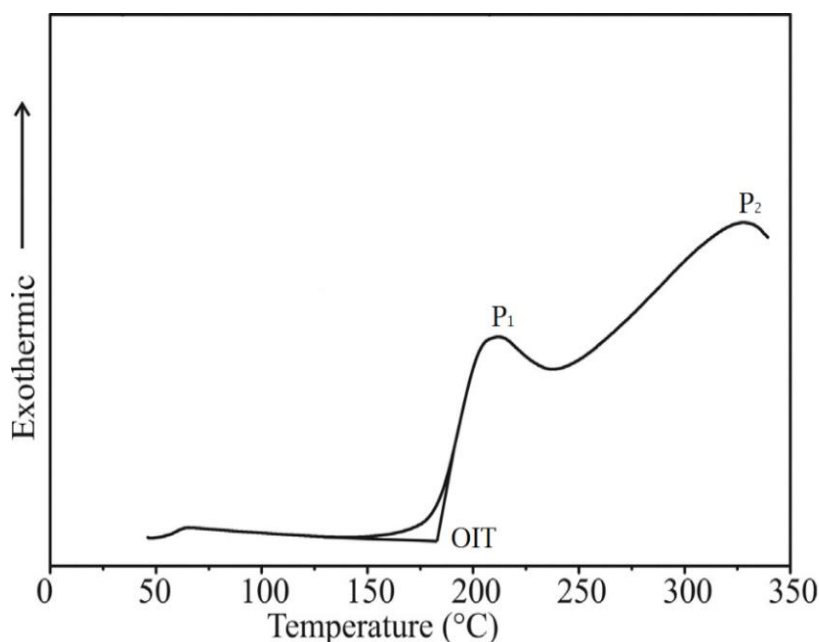
Fonte: BROWN, 1988.

A técnica de DSC consiste na medição de variação da diferença na taxa de fluxo de calor para a amostra em relação a uma amostra padrão de referência, enquanto são submetidos a um programa de temperatura controlado e exposto a um fluxo de gás controlado, sendo que este gás pode ser oxigênio ou nitrogênio (HÖHNE *et al.*, 2003).

Na Figura 3.9 é apresentado uma típica curva gerada pela técnica Calorimetria exploratória diferencial (DSC) na análise da oxidação de óleo.



O ponto onde ocorre o início da reação de oxidação pode ser visualizado pelo aumento da liberação de calor observado pela abrupta inclinação da curva, sendo este tempo denominado de tempo de indução oxidativa (OIT). O ponto  $P_1$  é conhecido como primeiro pico de oxidação, onde ocorre a formação dos produtos primários da oxidação. De forma análoga o ponto  $P_2$  é conhecido como segundo pico de oxidação onde ocorre a formação dos produtos secundários da reação de oxidação (MICIC *et al.*, 2015).



**Figura 3.9** - Exemplo de análise térmica pela técnica Calorimetria explotória diferencial (DSC). FONTE: MICIC *et al.*, 2015.

O período de indução chamado também de índice de estabilidade oxidativa é um parâmetro comparativo muito utilizado para controle de qualidade de óleos e gorduras, usado para se avaliar a resistência a oxidação de diferentes tipos de óleos e investigar a eficiência de adição de antioxidantes (SIMON *et al.*, 2000).

#### 3.6.4.4 Viscosidade

A viscosidade é uma propriedade de um fluido correspondente a quantidade de transporte de movimento, caracterizado pela resistência que um fluido tem a escoar. A transferência do momento em líquidos ocorre predominantemente em virtude das forças intermoleculares que as moléculas exercem entre suas vizinhas, ao passo que o aumento da temperatura geralmente diminui a viscosidade dos líquidos (BIRD *et al.*, 2002).

A viscosidade é afetada por diversos fatores, incluindo propriedades físicas e químicas dos óleos, tais como composição química e grau de insaturação. O aumento do grau de insaturação presente em uma molécula de ácido graxo provoca uma diminuição na viscosidade. O processo de oxidação de óleos e gorduras gera, dentre outros fatores, a quebra dessas insaturações nas moléculas de ácidos graxos, o qual conseqüentemente acarretará em um aumento da viscosidade (ALLEN *et al.*, 1999; IGWE, 2004; CORSINI *et al.*, 2008)

Allen *et al.* (1999) validaram um modelo matemático que descreve a viscosidade de uma mistura de ácidos graxos (óleo) como sendo um somatório das viscosidades individuais de cada fração mássica de ácido graxo presente no óleo. Desta forma, se amostras de óleos obtidos a diferentes condições de extrações provenientes da uma mesma matriz apresentarem um valor de viscosidade similar a uma dada temperatura e pressão indicará que provavelmente esses óleos possuem composição química similar.

### **3.3 Métodos de Extração**

Dada a diversidade dos tecidos que armazenam as substâncias graxas, como vegetais que armazenam óleo em suas sementes, polpa e animais com órgãos específicos, não existe um processo único de extração de óleos e gorduras. No entanto, é possível identificar alguns métodos usualmente utilizados em extração de óleo, como a prensagem mecânica e extração por solvente. Mais recente, tem-se a extração com fluído supercrítico (SFE), sendo que esta técnica vem conquistando um lugar de destaque no cenário industrial, já que apresenta vantagens em relação aos sistemas convencionais, melhor preservando as características e componentes presentes nos óleos e gorduras (MAUL, 1999; RAMALHO e SUAREZ, 2012).

#### *3.3.1 Extração mecânica*

O método de extração mecânica por prensagem é o método mais popular para a obtenção de óleo de oleaginosas no mundo (MREMA e MCNULTY, 1985 citado por SINGH e BARGALE, 1999).

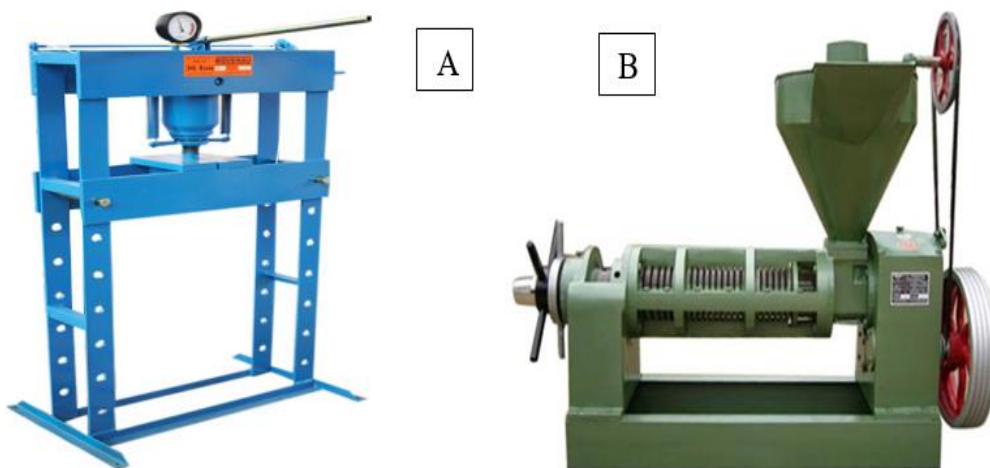
A extração mecânica efetua a separação de compostos líquidos de sólidos pela aplicação de forças de compressão, geralmente esta força é gerada por uma prensa hidráulica. Dependendo da natureza do material a ser extraído são necessários tratamentos prévios de despulpamento, redução de tamanho e aquecimento antes da separação do

líquido para aumentar o rendimento. (BRENNAN *et al.*, 1990; RAMALHO & SUAREZ, 2012).

A denominação extra virgem, é dada a um óleo quando este é extraído por prensagem mecânica a temperatura ambiente, e de óleo virgem, quando o mesmo processo é realizada a uma temperatura aproximadamente de 70°C. A diferença de qualidade entre o óleo extra virgem e virgem está relacionada diretamente com a temperatura do processo de extração, onde altas temperaturas favorecem a oxidação do óleo (RAMALHO & SUAREZ, 2012).

Para Moretto e Fett (1998) o método de extração mecânica, quando comparado à extração com solvente, gera um produto final com propriedades naturais mais preservadas. A extração por prensagem mecânica, por ser uma técnica amplamente difundida e utilizada industrialmente, conta com equipamentos desde os rudimentares até instalações industriais complexas. Para operações pequenas que não justificam equipamentos muito sofisticados utilizam-se as prensas hidráulicas. Para operações mais complexas e de maior capacidade opta-se por prensas contínuas tipos expeller (CARVALHO, 2011).

São apresentas na Figura 3.10 ilustrações de uma prensa hidráulica (A) e contínua tipo expeller (B).



**Figura 3.10** – Prensa hidráulica (A) e contínua do tipo expeller (B)

Segundo Singh & Bargale (1999), o método de extração mecânica é o método mais popular de extração de lipídios. A principal razão para a popularidade do tipo de extração é estes equipamentos de são simples, robusto, não utilizam solvente orgânico e pode facilmente ser operado. Além disso, o processo é vantajoso sobre o processo de extração com solvente pois não utiliza solventes orgânicos, reduzindo assim, os danos ambientais.

### *3.3.2 Extração com solvente*

A extração por solvente é uma operação de transferência de massa amplamente utilizada para extrair o óleo de sementes. Após terem seu tamanho reduzido, estas sementes são colocadas em contato com o solvente de maneira que ocorra a transferência do óleo da fase sólida para a fase líquida (PERRY & CHILTON, 1986).

O processo de extração com solventes é indicado para oleaginosas que contém pouco óleo, como é o caso da soja e do algodão que tem menos de 20% do peso dos grãos em material lipídico (RAMALHO e SUAREZ, 2012).

O hexano é o solvente mais utilizado neste tipo de extração por satisfazer várias exigências durante o processo, como a facilidade de dissolver o óleo sem agir sobre outros componentes da oleaginosa, possui baixa e estreita faixa de temperatura de ebulição, é imiscível em água, com a qual, não forma azeótropos. No entanto, suas principais desvantagens são o risco de alta inflamabilidade e custo elevado (MORETTO e FETT, 1998; RAMALHO e SUAREZ, 2012).

Na extração com solventes o processo pode ser realizado em leito fixo ou móvel, sendo o último o mais empregado para produção de óleos vegetais de sementes oleaginosas. Neste tipo de extração, a suspensão extraída resulta em um composto de soluto e solvente, o qual pode conter algumas partículas sólidas, que são retiradas por filtração ou centrifugação. Para a remoção do solvente é necessária uma operação adicional de evaporação (GEANKOPLIS, 2003).

Apesar dos benefícios, a extração com hexano apresenta alguns inconvenientes. Primeiramente, o processo de manufaturamento do óleo com hexano resulta em gases efluentes para atmosfera contendo grande quantidade de poluentes. Tem-se também acréscimos gerados, como a periculosidade no ambiente de produção, impacto ambiental e com altos custos de processamento. Por último, os óleos vegetais são importantes fontes de produtos com alto valor agregado, o que por este processo, pode ocasionar degradação e perdas de componentes de forma parcial ou totalmente, devido o tempo e a alta temperatura empregada neste tipo de extração (BOSS, 2000).

### *3.3.3 Extração com fluido supercrítico*

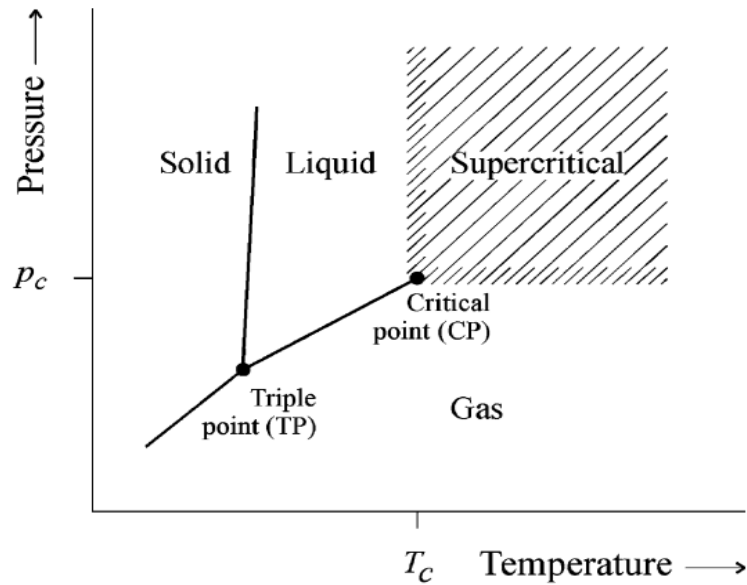
Os métodos de extração de óleos mais tradicionais são os convencionais por prensagem, porém, devido às altas temperaturas utilizadas, provocam degradação térmica

de determinados componentes do óleo, o que diminui a qualidade do mesmo. Por outro lado, a extração por solvente apresenta outra restrição, quanto ao uso de solventes tóxicos, já que os óleos essenciais são utilizados em alimentos, em produtos farmacêuticos e cosméticos. Estes fatores contribuíram para o surgimento de novas operações de extração, como a extração supercrítica, que trabalha em temperaturas mais brandas e com solventes atóxicos (MAUL, 1999; STEFFANI, 2003).

A extração supercrítica em escala industrial teve seu início na Alemanha nos anos 70, no processo de remoção da cafeína do café, sendo o grande destaque na época, como uma alternativa de solvente não tóxico aos processos tradicionais daquele período (MAUL, 1999).

O princípio desta técnica de extração é o aproveitamento das propriedades físicas dos fluídos em seu estado supercrítico. A densidade do fluido no estado supercrítico é semelhante à de um líquido, oferecendo maior capacidade de dissolução para várias substâncias. Também conta com a semelhança de viscosidade com a dos gases, promovendo um coeficiente de difusão maior que o dos líquidos, o que torna a extração das substâncias facilitada (MARAN e PRIYA, 2015).

O diagrama apresentado na Figura 3.11, mostra as três curvas consideradas para o processo de extração supercrítica: curva de sublimação, fusão e ebulição. Estas curvas definem as regiões correspondentes a cada estado, e os pontos sobre as curvas caracterizam os estados de equilíbrio entre duas fases. A curva entre os estados de gases e líquidos terminam num ponto que é denominado ponto crítico, qualquer substância acima deste ponto crítico é considerada em seu estado supercrítico (FILIPPIS, 2011).



**Figura 3.11** - Diagrama de fases genérico para fluido supercrítico monocomponente (Fonte: BRUNNER, 2005).

Para um fluido monocomponente encontra-se em seu estado supercrítico, é necessário que o mesmo seja submetido a temperaturas e pressões acima do ponto crítico. A definição de temperatura crítica é, a temperatura acima da qual não é possível liquefazer um gás por compressão isotérmica. Já a pressão crítica é, a pressão acima da qual não é possível liquefazer um gás por resfriamento isobárico (BRUNNER, 2005).

São apresentadas na Tabela 3.3 as propriedades físicas do ponto crítico de alguns fluidos monocomponentes. O dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) é o solvente mais comum utilizado na extração supercrítica para aplicações alimentares, isso ocorre devido à suas propriedades físicas e químicas, sendo totalmente dissipado quando o extrato (óleo) é exposto à pressão atmosférica evitando, assim, a necessidade de um tratamento de refinamento posterior.

**Tabela 3.2** - Propriedades físicas críticas de fluidos.

Fluido	Temperatura crítica (°C)	Pressão crítica (bar)
Nitrogênio	-147,00	33,934
Metano	-82,49	46,407
Dióxido de carbono	31,03	73,800
Metanol	79,90	240,200
Propano	96,85	42,557
Amônia	132,40	112,998
Dióxido de enxofre	157,50	79,841

Hexano	243,20	29,600
Água	374,40	226,800

Fonte: MAUL, 1999.

A temperatura crítica para o CO<sub>2</sub> é relativamente baixa, aproximadamente 31°C, não oferecendo perigo as propriedades organolépticas e químicas dos extratos oleosos. Em processos industriais uma pressão de 73,8 bar é facilmente obtida. Por ser considerado inerte, o CO<sub>2</sub> não oferece risco de reações secundárias como, oxidações, reduções, hidrólises e degradações químicas da matéria-prima. Além disso, ele é reativamente barato a nível industrial, disponível em alto grau de pureza, não é tóxico e nem inflamável (MAUL *et al.*, 1996; MAUL, 1999; BRUNNER, 2005; MARAN e PRIYA, 2015).

De uma forma geral, o dióxido de carbono é indicado para extrações de composto lipofílicos tais como hidrocarbonetos, éteres, ésteres, cetonas. O seu poder de solvente para composto de baixo peso molecular é elevado, e diminui com o aumento molecular. Ele não é indicado para extração de substâncias polares como açúcares, polissacarídeos, aminoácidos, proteínas, fosfatídeos, glicosídeos e sais orgânicos (MAUL, 1999; BRUNNER, 2005).

Segundo Santos (2014), a concentração final de vitamina E em óleo de crambe obtido pelo método de extração subcrítica com propano como solvente e pelo método de Soxhlet com Hexano como solvente apresentou diferenças significativas. As extrações supercríticas apresentaram maiores concentrações de tocoferóis do que as extrações por Soxhlet.

Entretanto alguns autores destacam que a extração por fluido supercrítico ainda apresenta um alto custo operacional devido aos valores dos equipamentos. Assim, produtos de baixo valor agregado e baixo rendimento não são economicamente viáveis neste processo de extração (MAUL *et al.*, 1996).

McMullin (1968) utilizou o método de extração com metanol como e Méndez *et al.* (1998) utilizou o método de extração com contato indireto com água (98 °C) para a obtenção do óleo do corpo gorduroso de rã-touro. Um método de extração alternativo ao método de para o óleo de rã-touro, como a extração mecânica por prensagem ou o uso da extração supercrítica com CO<sub>2</sub>, não são relatados na literatura.

### 3.4 Considerações finais

É importante salientar que o termo lixo e resíduos sólidos têm significados distintos. O primeiro não possui qualquer tipo de valor econômico, enquanto o segundo possui valor econômico agregado e possibilitam reaproveitamento no próprio processo produtivo (DEMAJORIVIC, 1995).

A revisão bibliográfica apresenta as principais características de óleos e gorduras, como os teores de ácidos graxos e vitaminas lipossolúveis, sendo que estas também podem ser encontradas no óleo de rã-touro. Raros são os trabalhos científicos citados na literatura que caracterizam o corpo gorduroso e seu em sua total composição e constituintes. Até o momento poucos trabalhos caracterizaram o óleo de rã-touro e estes apenas utilizaram processos com solvente orgânico. Como já mencionado o uso deste tipo de extração pode provocar a degradação de seus constituintes presentes no óleo, como por exemplo, os ácidos graxos poli-insaturados ( $\omega$ -3) e as vitaminas lipossolúveis.

A extração de óleos e gorduras com fluido supercrítico apresenta-se como uma alternativa aos métodos tradicionais de extração (prensagem e solvente). Sendo que na literatura não há menção a estudos da extração do óleo de vísceras de rã empregado dióxido de carbono supercrítico.

Desta forma, o presente trabalho consistiu na caracterização da matéria-prima (corpo gorduroso) por meio da determinação dos seguintes parâmetros: teor de umidade, teor de lipídios, teor de proteínas e o teor de cinzas. Além disso, avaliou o efeito da temperatura no processo de extração do óleo do corpo gorduroso por: (i) prensagem mecânica (extração convencional); (ii) por extração supercrítica quanto ao rendimento de extração e a qualidade do óleo obtido. A qualidade do óleo obtido foi caracterizada por meio da determinação dos seguintes parâmetros: (i) índice de acidez; (ii) índice de peróxido; (iii) composição de ácidos graxos; (iv) estabilidade oxidativa; (v) viscosidade; (vi) FT-IR.



## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1 Matéria-prima**

O órgão corpo gorduroso da rã utilizado neste estudo, é proveniente da espécie rã-touro, os mesmos foram doados pela Associação Goiana de Ranicultura – GOIASRÃ, localizada na cidade de Goiânia. As amostras foram coletadas após o processo de abate da rã, e posteriormente congeladas. As mesmas foram armazenadas em caixa de isopor com gelo e transportadas até a UNIOESTE *Campus* de Toledo-PR, onde permaneceram em *freezer* convencional a -20°C até sua utilização.

### **4.2 Caracterização da Matéria-prima**

A matéria-prima (corpo gorduroso) foi caracterizada quanto ao teor de umidade, quantidade total de lipídios, teor de proteínas e o teor de cinzas na amostra *in natura*.

#### *4.2.1 Umidade*

A determinação da umidade foi realizada pelo método de secagem direta a 105 °C, conforme descrito no manual de métodos Analíticos Instituto Adolfo Lutz (2008). Foram

pesados em cápsula de porcelana, previamente tarada, cerca de 5 g de amostra. Posteriormente a cápsula foi aquecida em estufa à 105°C por 3 horas. Retirou-se a amostra da estufa e resfriou-se a mesma em dessecador até temperatura ambiente. Pesou-se, e repetiu-se esta operação de aquecimento e resfriamento até obter peso constante da amostra.

#### 4.2.2 *Quantidade total de lipídeos.*

O teor total de lipídeos foi determinado pelo método de extração direta em Soxhlet, conforme metodologia descrita no manual de métodos Analíticos Instituto Adolfo Lutz (2008). Foram pesados 2 a 5 g de amostra em cartucho de Soxhlet ou em papel de filtro. Transferiu-se a amostra para o aparelho extrator tipo Soxhlet. Acoplou-se o extrator ao balão de fundo chato previamente tarado a 105°C. Adicionou-se éter em quantidade suficiente para um Soxhlet e meio. O sistema foi mantido sob aquecimento em chapa elétrica a 90°C. O processo de extração foi mantido de forma contínua por um tempo de pelo menos 8 a 16 horas. Decorrido o tempo de extração, retirou-se o cartucho ou o papel filtro, destilou o éter e transferiu-se o balão com o resíduo extraído para estufa a 105°C, manteve-se por cerca de uma hora. Posteriormente, resfriou-se o balão em dessecador até a temperatura ambiente. Pesou-se e repetiu-se as operações de aquecimento e resfriamento até peso constante, não excedendo o tempo máximo de duas horas.

#### 4.2.3 *Quantidade total de proteínas.*

A quantidade total de proteínas na matéria-prima foi determinada pelo método de digestão Kjeldahl modificado descrito no manual de métodos Analíticos Instituto Adolfo Lutz (2008). Pesou-se 100 mg de amostra previamente seca em estufa a 55°C por 72 horas, conforme anexo B. Colocou-se em tubo de ensaio juntamente com 5 mL da solução digestora. Levou-se o tubo ao bloco digestor aquecendo-o de 50°C até 450°C nas rampas de temperaturas apresentadas na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1** – Rampas de temperatura do bloco digestor.

TEMPERATURA [°C]	TEMPO [min]
50	30
100	30

150	30
250	30
350	30
450	30

Após a digestão, esperou-se a amostras esfriar e adicionou-se 15 mL de água destilada. Adicionou-se 10 mL de ácido bórico em um Erlenmeyer de 125 ml. Acoplou-se o tubo de ensaio com a amostra digerida no equipamento destilador. Colocou-se 20 ml de hidróxido de sódio 18 N no aparelho de digestão. Efetuou-se a destilação até que o volume do Erlenmeyer atinge-se cerca de 75 mL. Titulou-se com ácido sulfúrico 0,02 (mol L<sup>-1</sup>) até o momento que a coloração verde tornou-se rosa.

Para o cálculo da porcentagem de Proteína Bruta foi utilizado a Equação (4.1).

$$\% \text{ de Proteína Bruta} = \frac{(V \ N \ F \ 1400) \ f}{P} \quad (4.1)$$

Em que:

V = Volume de consumido ácido na titulação (mL);

F = Fator do ácido (mg mL<sup>-1</sup> N<sup>-1</sup>);

N = Normalidade do ácido (N);

f = é o fator de conversão empírico para conversão do número de g de nitrogênio para g de proteínas, utilizou-se o valor genérico de 6,25 conforme a metodologia;

P = Massa da amostra (mg).

#### 4.2.4 Quantidade cinzas

O teor de cinzas foi determinado conforme metodologia adaptada do manual de métodos Analíticos Instituto Adolfo Lutz (2008). Pesou-se 2 g de amostra em um cadinho, previamente seco em mufla a 105°C, resfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. Colocou-se o cadinho com a amostra na mufla e elevou-se a temperatura até 550°C por 4 h até queima total da matéria orgânica. A quantidade da porcentagem de cinzas na amostra foi calculada conforme a Equação (4.2).

$$\% \text{ de cinza} = \frac{(M1 \ 100)}{M2} \quad (4.2)$$

Em que:

M1 = Massa do cadinho em g, após as 4 h a 550°C.

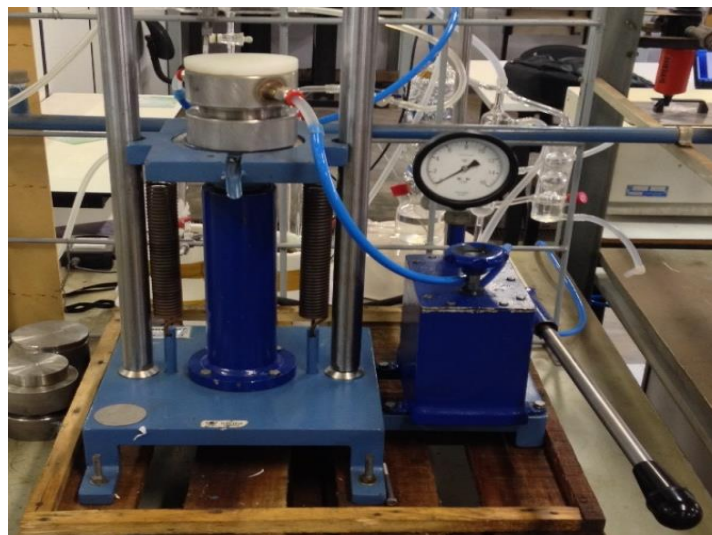
M2 = Massa do cadinho em g, seco a 105°C.

### 4.3 Extração do Óleo

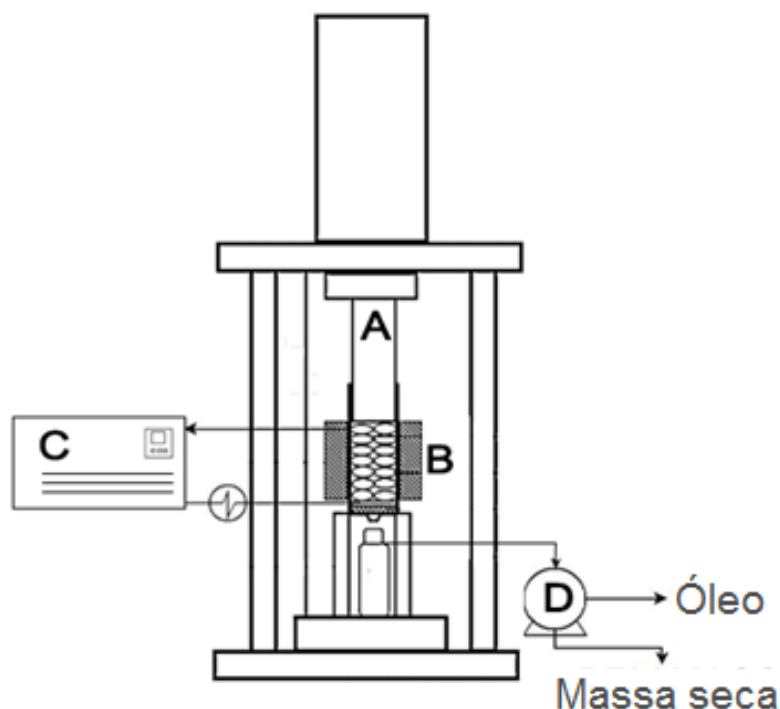
#### 4.3.1 Extração mecânica

A extração mecânica por prensagem foi realizada com uma prensa hidráulica juntamente com um compartimento de alimentação encamisado que permitiu o aquecimento. Na Figura 4.1 apresenta-se o módulo de extração utilizado, e na Figura 4.2 apresenta-se o fluxograma do processo.

O módulo era constituído por uma prensa hidráulica da marca Tecnal, modelo TE-097, um banho termostático acoplado com uma bomba centrífuga da marca Tecnal, modelo TE-184, por um cilindro de aço inox bipartido e encamisado, utilizou-se a bipartição com o intuito de separar a amostra inicial do óleo extraído pós-prensagem e o encamisamento permitiu a circulação da água aquecida no cilindro para o aquecimento indireto da amostra na temperatura desejada.



**Figura 4.1** - Módulo de extração convencional com aquecimento.



**Figura 4.2** - Fluxograma do processo de extração por prensagem.

As extrações por prensagem mecânica foram realizadas nas temperaturas de 30°C, 40°C, 50°C, 60°C, 70°C, 80°C e 90°C com duas toneladas de pressão. Conforme metodologia adaptada do estudo de Lopes *et al.* (2010). Sendo que a menor temperatura foi escolhida por ser a que se mais próxima da temperatura ambiente, e a maior temperatura foi selecionada pelas limitações de aquecimento do equipamento.

O processo de extração por prensagem consistiu em ligar o banho termostático juntamente com a bomba de recirculação da água. Aguardou-se até o módulo atingir a temperatura desejada para extração, neste momento as vísceras, ainda congeladas, e cortadas em pedaços, com tamanho médio entre 1 cm a 2 cm, foram adicionadas na parte superior do cilindro de inox, esperou-se vinte minutos para que a massa atingisse a temperatura de extração. Em seguida aplicou-se duas toneladas de pressão por cinco minutos. Ao final a pressão foi reduzida a zero, posteriormente na parte inferior do cilindro de inox foi retirado o óleo bruto extraído. Na sequência o óleo bruto foi centrifugado em tubos do tipo falcon em centrífuga da marca SPINLAB, SL-5M a 3000 RPM por 5 minutos, para a retirada de impurezas e separação das fases.

#### 4.3.2 Extração supercrítica

As extrações supercríticas foram conduzidas conforme fluxograma apresentado na Figura 4.3, as quais foram conduzidas nas temperaturas de 40°C, 60°C e 80°C a 150 bar por 180 minutos, segundo metodologia adaptada do estudo de Santos (2014).

O equipamento era constituído por um leito de extração encamisado com 2 cm de diâmetro interno e 17 cm de altura. Uma bomba seringa da marca ISCO, modelo 500D operada pelo controlador ISCO *D-Series* alimentada por um cilindro de dióxido de carbono. Dois banhos termostáticos, o primeiro da marca Julabo, modelo FP-50, utilizado para resfriar o fluido contido na bomba seringa e o segundo banho termostático da marca Marconi, modelo MA-184, utilizado para manter o leito de extração aquecido na temperatura desejada. O módulo constituiu-se ainda, de uma válvula micrométrica de expansão aquecida por termorregulador da marca Tholz, modelo MSC-04E, o termorregulador foi utilizado para evitar o congelamento da saída da válvula de expansão e consequentemente a sua obstrução. Por último, um ponto de coleta na saída da válvula restritora, no qual realizou-se a coleta em frasco de vidro âmbar.

O fluido supercrítico utilizado como solvente foi o dióxido de carbono. Na Figura 4.4 apresenta-se o fluxograma de operação do processo de extração supercrítica, o qual constituiu-se em ligar o banho refrigerado para o resfriamento da bomba. Abriu-se a válvula 1 e 2 para a alimentação da bomba com o CO<sub>2</sub> do cilindro. Fechou-se as válvulas 1 e 2 quando a alimentação se completou. Acionou-se a bomba pelo controlador até atingir a pressão desejada. Após atingir a pressão, abriu-se a válvula 3 para o solvente percolar no leito. Quando o solvente flui para o leito ocorre uma queda de pressão na bomba sendo esta acionada automaticamente pelo controlado para estabilizar a pressão ao nível desejado. Após a estabilização da pressão abriu-se a válvula 4 e a válvula de expansão micrométrica. O recipiente coletor foi pesado em uma balança Shimadzu, modelo AY2200, em um intervalo de 10 minutos até o final do processo.

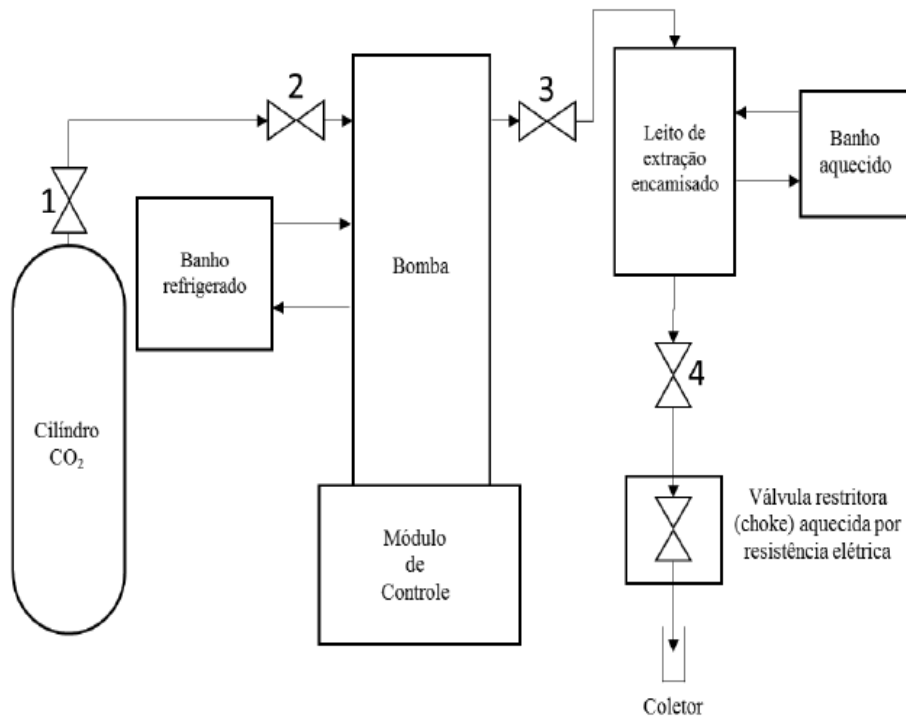


Figura 4.3 - Fluxograma do módulo de extração supercrítica.

#### 4.4 Caracterização do óleo de rã

As amostras de óleo de rã obtidas pelos métodos de extração por prensagem foram caracterizadas quanto ao índice de acidez, índice de peróxido, composição de ácidos graxos totais e estabilidade térmica. Ao passo que as amostras de óleo obtidas pela extração supercrítica foram caracterizadas quanto à composição de ácidos graxos totais e estabilidade térmica.

##### 4.4.1 Índice de acidez

Para a determinação do índice de acidez, foram pesados 2 g de amostra em um Erlenmeyer de 125 mL. Adicionou-se 25 mL de solução de éter etílico e álcool etílico (2:1) neutralizada, agitou-se até a completa dissolução da suspensão. Cinco gotas de solução de fenolftaleína foram adicionadas à suspensão, posteriormente titulou-se com solução de NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup> até a coloração rósea persistir por 30 segundos. Foi realizada a prova de um procedimento em branco para testar os reagentes empregados, conforme metodologia proposta por manual de métodos Analíticos Instituto Adolfo Lutz (2008).

Para o cálculo do índice de acidez foi utilizada a Equação (4.3).

$$\text{Índice de acidez} = \frac{(VFC100 28,2)}{P} \quad (4.3)$$

Em que:

V = volume de solução de hidróxido de sódio 0,1 N gastos na titulação (mL);

FC = fator de correção da solução de hidróxido de sódio 0,1 N;

P = Massa da amostra (g).

O índice de acidez é expresso como o nº de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos graxos livres de 1,0 g da amostra, tendo como base o peso molecular do ácido oleico. O método de preparo das soluções e a padronização dos reagentes encontram-se no anexo C.

#### 4.4.2 Índice de Peróxido

Para a determinação do índice de peróxido, pesou-se aproximadamente 5 g de amostra em Erlenmeyer de 250 mL. Adicionou-se 30 mL de uma solução de ácido acético e clorofórmio, na proporção de 3:2 e acrescentou-se 0,5 mL da solução de iodeto de potássio saturada. Agitou-se até a completa dissolução da suspensão. O Erlenmeyer foi coberto com papel alumínio, e deixado em repouso por aproximadamente 1 minuto em um local protegido contra luz. Logo após, adicionou-se 30 mL de água destilada e agitou-se vagarosamente. Posteriormente foram adicionados 1 mL de indicador amido à suspensão, agitou-se e aguardou-se a mudança de coloração para azul. Procedeu-se então com a titulação. Titulou-se com solução de tiosulfato de sódio 0,01 M até o completo desaparecimento da coloração azul. Realizou-se um procedimento em branco com a mistura de clorofórmio, ácido acético e indicador amido para testar os reagentes empregados, esta metodologia foi realizada conforme proposto por manual de métodos Analíticos Instituto Adolfo Lutz (2008).

O índice de peróxido em *mEq* de O<sub>2</sub> por 1000 g de gordura foi calculado pela Equação (4.4).

$$\text{Índice de peróxido} = \frac{(V1-V2) M F 1000}{P}$$

(4.4)

Em que:

V1 = Volume gasto do tiosulfato de sódio 0,01 (mol L<sup>-1</sup>) gasto na titulação da amostra (mL);

V2 = Volume gasto de tiosulfato de sódio 0,01 (mol L<sup>-1</sup>) gasto na titulação do branco (mL);



M = Molaridade da solução do tiosulfato de sódio ( $\text{mol L}^{-1}$ );

P = Massa de gordura (g);

1000 = Fator de conversão em miliequivalente.

O índice de peróxido é expresso em termos de miliequivalentes de  $\text{O}_2$  por quilograma de óleo. O método de preparo de soluções e a padronização dos reagentes encontram-se no Anexo D.

#### 4.4.3. Análise da composição de ácidos graxos

A análise da composição de ácidos graxos totais foi realizada em cromatógrafo a gás com espectrômetro de massas tipo quadrupolo linear modelo 5975 fabricado pelo Agilent, equipado com uma coluna HP-5MS (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano). Esterificou-se as amostras com metanol em meio básico. Utilizou-se uma rampa de temperatura para leitura da amostra, sendo a temperatura inicial de  $70^\circ\text{C}$  por 2 minutos, posteriormente elevou-se a temperatura em  $20^\circ\text{C}$  por minuto até  $230^\circ\text{C}$  permanecendo por 20 minutos. A temperatura do injetor foi de  $250^\circ\text{C}$  e do detector  $280^\circ\text{C}$ . A razão de Split de 1:100, sendo o gás de arraste utilizado foi Hélio (99,9999) a uma vazão de  $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ . O volume de injeção foi de  $1 \mu\text{L}$ . Os espectros de massa foram obtidos com uma tensão de ionização de 70 eV e uma faixa de varredura de 33 – 500 daltons. Os compostos foram identificados comparando seus respectivos espectros de massa com a biblioteca de espectros de massa NIST11. As análises foram realizadas pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas em Campinas/SP.

#### 4.4.4 Análise térmica do óleo de rã-touro

A estabilidade do óleo de rã-touro foi determinada pela técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC). A técnica de DSC consiste na oxidação do óleo submetido a um fluxo constante de oxigênio. Foram pesados 5 mg de óleo em um cadinho de alumínio sem tampa, e este foi colocado no equipamento. Um segundo cadinho vazio foi utilizado como referência. Os tempos de indução oxidativa foram obtidas pela curva de oxidação não-isotérmica com uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C min}^{-1}$ , segundo a metodologia de Micic *et al.* (2015).

#### 4.4.5 Viscosidade cinemática

Os procedimentos experimentais foram realizados em viscosímetro capilar cinemático do tipo Cannon-Fenske (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) de vidro (Nº300) em uma incubadora a temperatura constante (Solab, model SL-221), em acordo com a metodologia ASTM D 445. O tempo de escoamento foi medido manualmente com um cronometro digital. Com o tempo do escoamento, a viscosidade cinemática foi calculada a partir da Equação (4.5).

$$v = C t \quad (4.5)$$

Onde  $v$  é a viscosidade cinemática ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-1}$ ),  $C$  é uma constante específica para o viscosímetro ( $\text{mm}^2 \text{s}^{-2}$ , para o Nº 300 é 0.25) e  $t$  é o tempo (s) de escoamento.

#### 4.4.6 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Os óleos obtidos por extração mecânica e extração supercrítica foram analisados por espectroscopia FTIR (Thermo Scientific) (Perkin Elmer, Paragon 1000 model). Os espectros de FTIR foram obtidos entre 4000 e 650  $\text{cm}^{-1}$  em uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , acumulando 32 varreduras.

## 5. Resultados e Discussão

Neste capítulo serão apresentando os resultados da caracterização físico-química da matéria prima, bem como os resultados obtidos nas extrações do óleo pelo método de prensagem e pelo método de extração com fluido supercrítico. Também serão apresentados os resultados da caracterização dos óleos quanto aos teores de ácidos graxos totais, índices de acidez, índices de peróxidos e análises térmicas.

### 5.1 Caracterização Físico-Química da Matéria-Prima

Os resultados obtidos da caracterização da matéria-prima nas determinações do teor umidade, teor de proteína total, teor de cinzas e teor de lipídio do corpo gorduroso *in natura* são apresentados na Tabela 5.1.

**Tabela 5.1** – Caracterização do corpo gorduroso da rã-touro.

Análise	Média (%)	Desvio Padrão
Umidade	4,32	0,22
Proteínas	2,98	1,00
Cinzas	0,18	0,03
Lipídios (amostra <i>in natura</i> )	92,52	2,97

Estes resultados estão em consonância com os estudos desenvolvidos por Zancanaro *et al.* (1996) e Wright *et al.* (2011). Segundo estes trabalhos o corpo gorduroso é o principal depósito de gordura dos anfíbios, contendo basicamente lipídios, principalmente na forma de triglicerídeos. Milone *et al.* (1983) estudaram as mudanças sazonais na porcentagem de lipídios de gordura corporal em outra espécie de rã, a *Rana esculenta*. O melhor resultado de porcentagem de lipídios obtido do corpo gorduroso foi de  $55 \pm 17$  (%) no mês de março, ao passo que em julho o teor de lipídios foi de  $41 \pm 32$  (%) e outubro de  $39 \pm 30$  (%).

Na indústria de processamento de peixe o fígado é um subproduto significativo, onde este é utilizado na produção de óleo e farinha de peixe. Bechtel e Oliveira (2006)

estudaram a composição físico-química o fígado de salmão rosa (*Oncorhynchus gorbuscha*). Os autores relatam que o fígado deste peixe contém  $18,61 \pm 1,29$  (%) de proteína,  $76,60 \pm 1,86$  (%) de umidade,  $1,50 \pm 0,05$  (%) cinza e  $3,30 \pm 0,94$  (%) de lipídios. Rubio-rodríguez *et al.* (2012) obtiveram óleo a partir de resíduos de merluza e fígado de lula gigante. O teor de lipídio (%) encontrado foi, respectivamente, de  $4,0 \pm 0,1$  e  $8,0 \pm 3,0$  e o teor de umidade,  $79 \pm 1,0$  e  $70 \pm 1,0$ .

Comparando estes resultados com o do presente trabalho observa-se que o corpo gorduroso da rã-touro contém 28 vezes mais lipídios que o fígado de salmão, 23 vezes mais lipídios que resíduos de merluza e 11 vezes mais lipídios de fígado de lula gigante, subprodutos muito utilizados na produção de óleo de peixe. Outro fator que favorece o corpo gorduroso da rã-touro é o baixo teor de umidade quando comparado com os resíduos de peixes, onde segundo Rubio-rodríguez *et al.* (2008) níveis de umidade acima de 20% afeta diretamente o rendimento da extração supercrítica, necessitando de um tratamento prévio de secagem. Estes resultados demonstram que o corpo gorduroso pode ser um subproduto significativo na produção de óleo de rã-touro, apresentado alto teor de lipídios e não necessitando de etapas prévias de secagem.

## 5.2 Extração de óleo do corpo gorduroso da rã-touro

### 5.2.1 Extração mecânica

As extrações mecânicas por prensagem foram realizadas em diferentes temperaturas (30 a 90 °C). As extrações foram realizadas em duplicata, sendo os rendimentos de óleo obtidos apresentados na Tabela 5.2. A partir dos testes estatísticos ANOVA, a um nível de significância 5% (p-valor <0,05), foi verificado que os valores do rendimento, para as diferentes temperaturas de extração, não são estatisticamente diferentes.

**Tabela 5.2** - Rendimento de óleo extraído na prensagem mecânica.

Experimento	Temperatura (°C)	Rendimento* (%)	Rendimento disponível** (%)
1	30	$62,78 \pm 0,44$	$67,85 \pm 0,48$
2	40	$65,84 \pm 0,04$	$71,16 \pm 0,04$
3	50	$68,54 \pm 1,80$	$74,08 \pm 1,94$
4	60	$65,99 \pm 3,37$	$71,32 \pm 3,64$
5	70	$66,33 \pm 0,26$	$71,69 \pm 0,28$

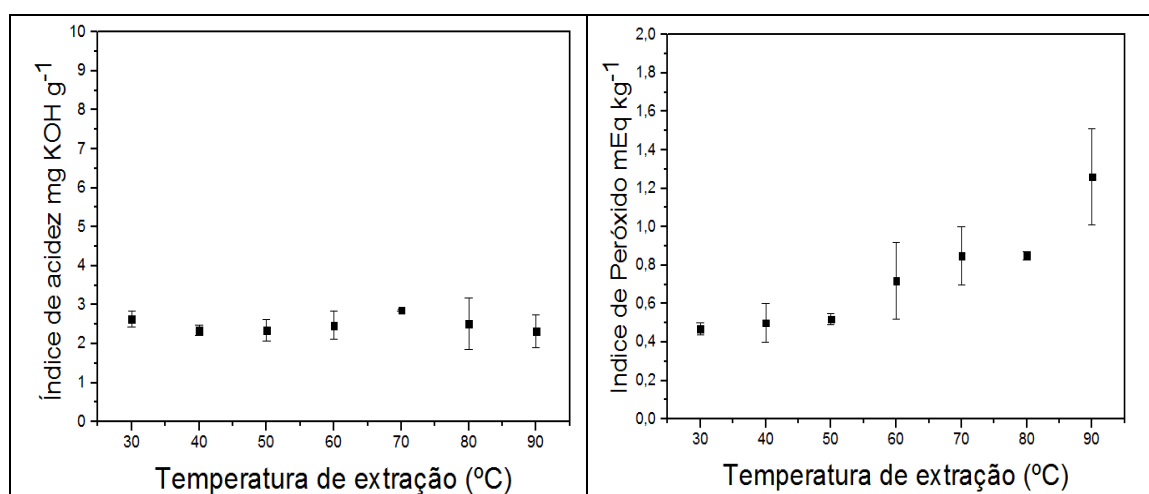
6	80	65,09 ± 6,53	70,35±7,05
7	90	68,17 ± 0,05	73,68±0,05

\* Rendimento foi calculado através da equação  $R(\%) = \frac{M_o}{M_c}$ , em que R(%) é o rendimento percentual; M<sub>o</sub> = massa de óleo final; M<sub>c</sub> = massa do corpo gorduroso;

\*\* Rendimento disponível foi calculado através da equação  $Rd(\%) = \frac{100}{92,51} * R(\%)$ , em que Rd(%) é o rendimento sobre a quantidade de óleo na amostra; R(%) é o rendimento percentual; M<sub>o</sub> = massa de óleo final; M<sub>c</sub> = massa do corpo gorduroso;

Observa-se a partir destes resultados que o rendimento nas diferentes temperaturas de extração, não apresentaram valores significativamente discrepantes, que justifiquem o gasto de energia dispendido nas temperaturas mais elevadas, avaliadas no estudo. Verifica-se também que há viabilidade de extração por prensagem, o que é positivo, pois esse tipo de processo utiliza equipamentos simples, robusto, não empregam solvente orgânico.

Na Figura 5.1 são apresentados os valores dos índices de acidez e peróxido para as amostras de óleo obtidas nas diferentes condições de temperatura. Foi verificado, a partir do teste estatístico ANOVA, a um nível de significância 5% (p-valor <0,05), que os valores de índice de acidez, para as diferentes temperaturas de extração, não são estatisticamente diferentes. Entretanto, para o índice de peróxido o teste ANOVA comprovou que os valores obtidos são estatisticamente diferentes.



**Figura 5.1** – Índice de Acidez e de Peróxido em função da temperatura de extração por prensagem.

Na literatura não existe um trabalho referente a análise físico-químicas relacionada as qualidades do óleo rã-touro, desta forma optou-se em comparar estes resultados com óleo de oliva extra virgem e óleo de peixe. O primeiro é devido a sua semelhança quanto ao teor de ácidos graxos insaturados e o segundo é quanto a fonte de obtenção do óleo.

ANTONINI *et al.* (2015) avaliaram, dentre outros parâmetros, os índices de acidez e peróxido de óleo de oliva extra virgem de produtores italianos. Segundo o autor, o menor

índice de acidez obtido foi de 0,21 mg KOH g<sup>-1</sup> e o maior de 0,51 mg KOH g<sup>-1</sup>. Já para o índice de peróxido, o menor obtido foi de 4,71 mEq kg<sup>-1</sup> e o maior foi de 8,17 mEq kg<sup>-1</sup>.

SEGURA (2012) avaliou a qualidade de óleos extraídos pela técnica de congelamento das vísceras de peixes de água doce. Os peixes avaliados foram a Truta Arco-íris, Pacu e Curimatá. O autor relata que o índice médio de acidez para o óleo de Truta Arco-íris foi de 6,06 mg KOH g<sup>-1</sup>, de Pacu foi de 4,92 mg KOH g<sup>-1</sup> e para o Curimatá foi de 4,12 mg KOH g<sup>-1</sup>. Com relação ao índice de peróxido o autor obteve 7,26, 6,81 e 27,27 mEq kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Comparando os índices de acidez do óleo de rã-touro com óleo de oliva extra virgem observa-se valores obtidos ficaram, em média, 6,94 vezes maiores e o índices de peróxidos foram 5 vezes menor em média.

Os resultados óleo de rã-touro quando comparado com os óleos de peixe da água doce apresentou níveis de acidez, em média, 2,2 vezes menor e de peróxido até 21,64 vezes menor. Segundo SEGURA (2014), esses altos valores do índice de peróxido e principalmente os índices de acidez, quando comparado com os resultados do óleo de oliva, podem estar relacionados ao método de coleta, transporte e tempo de armazenamento.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.2 e na Figura 5.1, perceber-se que a temperatura não apresentou efeito significativo sobre o rendimento da extração e o índice de acidez, entretanto, apresentou efeito significativo sobre o índice de peróxido. Comparando o rendimento obtido pelo método de extração por prensagem mecânica com o método de Soxhlet observa-se que os resultados obtidos por prensagem mecânica foram menores do os obtidos por Soxhlet. Entretanto, deve-se ressaltar que o tempo total gasto pela metodologia Soxhlet foi 19,20 vezes superior e desta forma maximizando os riscos de oxidação lipídica como a exposição prolongada ao oxigênio, luz e altas temperaturas (VANDAMME *et al.*, 2015; PAZHOUHANMEHR *et al.*, 2016). Além disso, o processo de Soxhlet utiliza *n*-hexano, onde este solvente possui uma volatilidade elevada e é considerado tóxico para animais e humanos em concentrações relativamente baixa (Ahangari and Sargolzaei, 2012).

### 5.2.2 Extração supercrítica

Foram realizadas extrações do óleo do corpo gorduroso da rã-touro, utilizando CO<sub>2</sub> supercrítico, na pressão de 150 bar e em três diferentes temperaturas (40, 60 e 80 °C). As extrações foram realizadas por um tempo de 180 min. Na Tabela 5.3 são apresentados os valores dos rendimentos, viscosidade do solvente ( $\mu$ ) e das solubilidades ( $Y_s$ ) do óleo no solvente, para cada condição experimental investigada.

Os maiores valores de rendimento e solubilidade foram obtidos na temperatura de extração de 80 °C. Os resultados também demonstraram a influência direta do aumento da temperatura com o rendimento de óleo extraído, onde estes indicam uma competição entre o efeito da densidade e da pressão de vapor do soluto quando a temperatura de extração é elevada. A elevação da temperatura acarreta a redução na densidade do solvente, embora, não há uma redução no rendimento da extração. Este fato está relacionado a presença de dois efeitos contrários com o aumento da temperatura: (i) redução na densidade do solvente e conseqüentemente a diminuição da solubilidade do óleo no solvente; (ii) o aumento da pressão de vapor do soluto que conseqüentemente aumenta a solubilidade do óleo no solvente (MICHIELIN, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2007).

**Tabela 5.3** - Condições experimentais das extrações com dióxido de carbono supercrítico e rendimentos obtidos após 180 minutos de extração.

Experimento	T (°C)	P (bar)	$\rho_{\text{solvente}}$ (g cm <sup>-3</sup> )	$\mu_{\text{solvente}}^{**}$ (kg m <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> x 10 <sup>5</sup> )	$Y_s$ (g <sub>óleo</sub> g <sub>solvente</sub> <sup>-1</sup> )	Rendimento* (%)
1	40	150	0,7808	6.83	0,0136	17,24
2	60	150	0,6046	4.65	0,1581	31,78
3	80	150	0,4275	3.29	0,3105	52,61

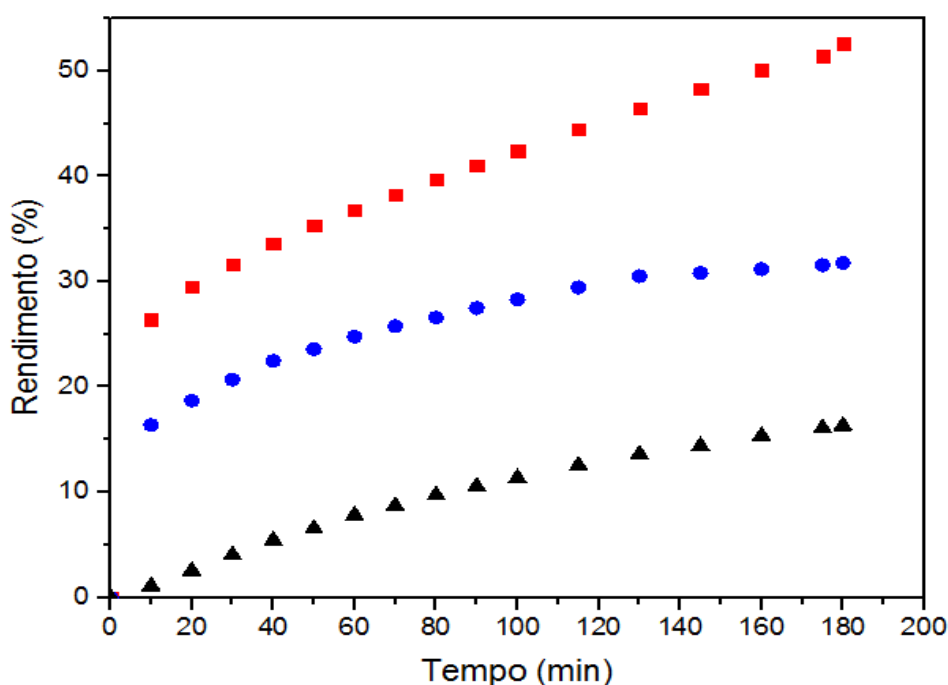
\* Rendimento foi calculado através da equação  $R(\%) = \frac{M_o}{M_c}$ , em que R(%) é o rendimento percentual; M<sub>o</sub> = massa de óleo final; M<sub>c</sub> = massa do corpo gorduroso;  
\*\* Viscosidade do solvente calculado conforme correlação de Ouyang (2011).

Na Figura 5.2 são apresentados os dados experimentais da cinética de extração do óleo de rã-touro. De acordo com a cinética de extração pode-se perceber três períodos de extração. O primeiro período é o mais rápido, entre 0 a 5 min, devido à elevada taxa de extração da fração de óleo exposta diretamente ao solvente. Na segunda etapa, a fração de

óleo disponível na superfície das células começa a se esgotar passando a ocorrer transferência de massa por difusão juntamente com a convecção. Ao final do processo de extração, começa a esgotar o óleo de fácil remoção por convecção, sendo assim predominante o mecanismo de transferência de massa por difusão. Nesta etapa a extração do óleo depende da eficiência do solvente em acessar a parte interna do corpo-gorduroso.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.3 e na Figura 5.2, perceber-se que a temperatura apresentou efeito significativo sobre o rendimento da extração. No entanto, comparando-se o rendimento obtido pelo método de extração supercrítica com o método de extração por prensagem mecânica observa-se que os resultados obtidos pela extração supercrítica foram menores em todas as condições investigadas.

Rubio-Rodriguez *et al.* (2012) estudaram a extração supercrítica empregando CO<sub>2</sub> como solvente na obtenção de óleo a partir de subprodutos de quatro espécies aquáticas, resíduos de merluza (M), salmão (S), peixe relógio (OR) e de fígado de lula gigante (L). As extrações supercríticas foram realizadas sob as condições de ótimas (40°C, 250 bar) encontrados em um estudo prévio de Rubio-Rodríguez *et al.* (2008). Na Figura 5.3 são apresentados os rendimentos obtidos em comparação com os obtidos neste trabalho.

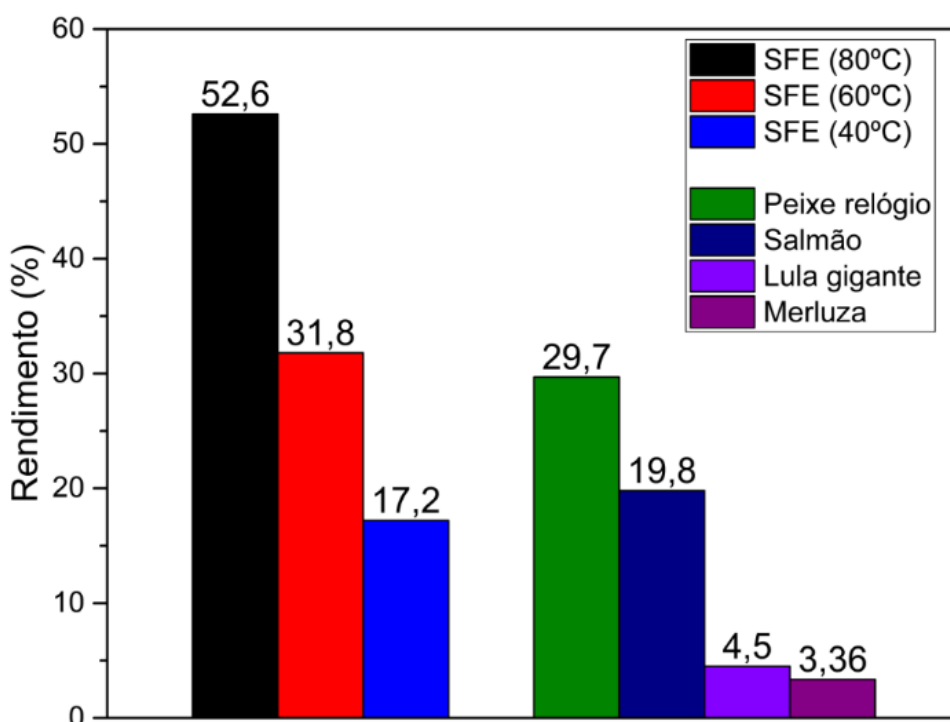


**Figura 5.2** - Curvas cinéticas experimentais das extrações de óleo de rã-touro com dióxido de carbono supercrítico em função da temperatura: ■ (80°C, 150 bar); ● (60°C, 150 bar); ▲ (40°C, 150 bar).



Este resultado comparado com a extração a 40°C (experimento 1) observa-se que os rendimentos obtidos por OR e S foram maiores, no entanto, quando comparado com as extrações a 60 e 80°C (experimento 2 e 3) todos os rendimentos foram menores. Assim, os rendimentos obtidos nas extrações supercríticas do óleo rã-touro possivelmente serão maiores com o aumento da pressão para 250 bar, entretanto, não foi possível atingir, devido aos limites operacionais.

Os rendimentos inferiores da extração supercrítica quando comparado com a extração por prensagem podem estar relacionados com a utilização de CO<sub>2</sub> como fluido supercrítico, pois este não é um bom solvente para compostos de alto peso molecular, como os ácidos graxos. Uma possível alternativa é a utilização de propano como solvente (SCHWARZ *et al.*, 2015). Outra alternativa, segundo Rubio-Rodríguez *et al.* (2008), seria realizar as extrações supercríticas a uma pressão de 250 bar.



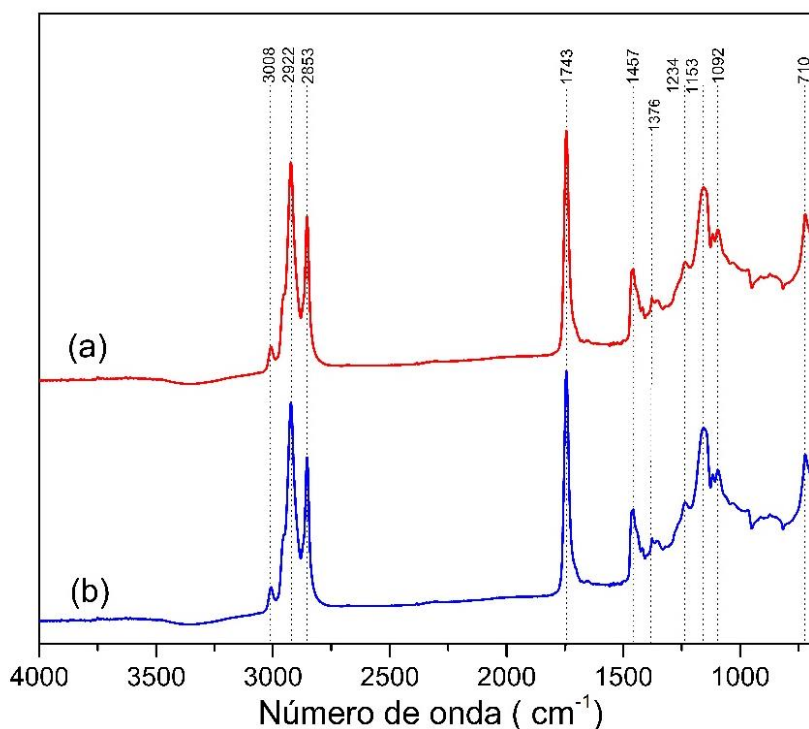
**Figura 5.3** – Comparação entre os rendimentos obtidos na extração supercrítica neste trabalho com os obtidos por Rubio-Rodríguez *et al.* (2008) na extração supercrítica de óleo de peixe a partir de resíduos.

### 5.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

Na figura 5.4 são apresentados os espectros vibracionais de infravermelho, obtidos na região de 4000 a 650  $\text{cm}^{-1}$ , das amostras de óleo de extração mecânica (40°C) e extração supercrítica (80°C). No presente trabalho utilizou análises de infravermelho para comparar a qualidade dos óleos obtidos em ambos processos. Uma forte correlação foi obtida entre os dois espectros dos óleos analisados ( $R^2 = 0,98$ ), sugerindo que os óleos possuem composição similar.

Wójcicki *et al.* (2015) avaliaram a oxidação de óleos comestíveis utilizando espectroscopia de infravermelho. Segundo os autores, as modificações oxidativas acarretam na deterioração na banda 1743  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde ao grupo carbonila, e nas bandas relativas as duplas ligações (710 e 3008  $\text{cm}^{-1}$ ). Ao mesmo tempo, eles relatam que houve um aumento na banda 3500  $\text{cm}^{-1}$  atribuídos aos hidroperóxidos formados.

Em comparação com os espectros apresentados na Figura 5.6, observa-se que as bandas 1743, 710 e 3008  $\text{cm}^{-1}$  não apresentaram redução significativa, sugerindo que não houve redução das duplas ligações presentes ambos os óleos. Não foi possível a detecção da banda 3500  $\text{cm}^{-1}$ , sugerindo uma baixa concentração de hidroperóxidos em ambas amostras.

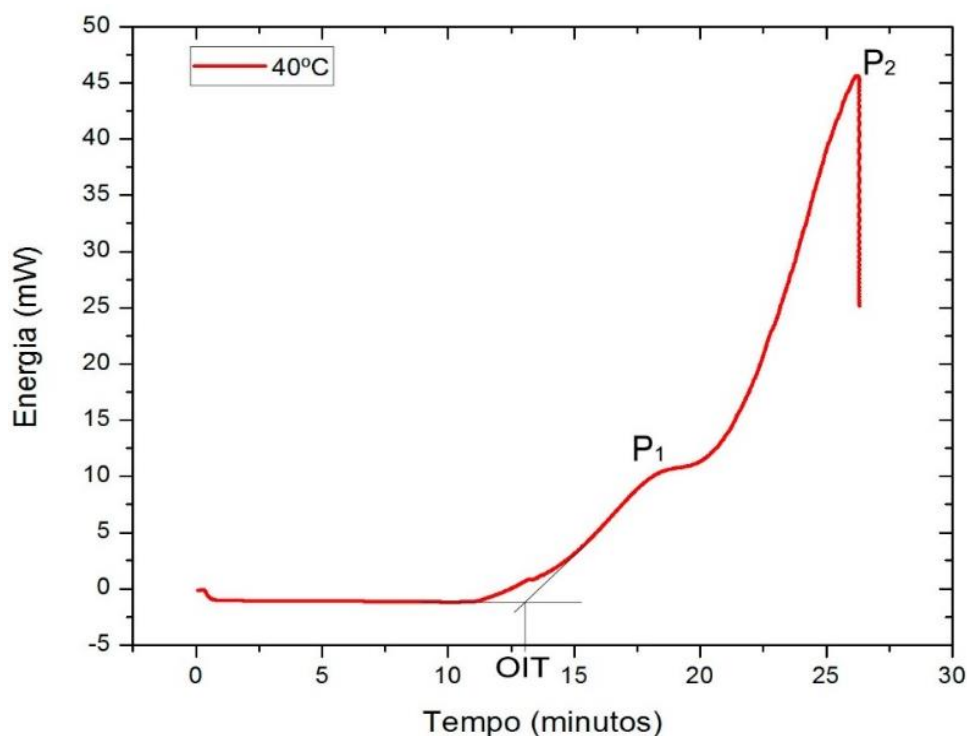


**Figura 5.4** – Espectros FTIR: (a) Extração mecânica (40°C); (b) Extração supercrítica (80°C)

#### 5.4 Análise Térmica - DSC

Foram realizadas análises térmicas para todas as amostras de óleo, obtidas por extração mecânica e supercrítica, com a finalidade de comparar a estabilidade oxidativa das amostras. Na Figura 5.5 é apresentado o termograma não-isotérmico, obtida por calorimetria exploratória diferencial (DSC), para a amostra de óleo obtido por prensagem mecânica a 40°C. O tempo de indução oxidativa (OIT) (ver Fig. 5.3) foi obtido conforme metodologia apresentada por SALDAÑA & MARTÍNEZ-MONTEAGUDO (2013) e MICIC *et al.* (2015). Na Tabela 5.4 são apresentados os tempos e temperaturas de indução oxidativa de todas as amostras. Os demais termogramas são apresentados no apêndice A deste trabalho. Foi verificado, a partir do teste estatístico ANOVA, a um nível de significância 5% (p-valor <0,05), que os valores de tempo e temperatura de indução oxidativa, para as diferentes temperaturas de extração investigadas, são estatisticamente diferentes.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 5.5, observa-se que a temperatura influencia na estabilidade oxidativa do óleo de rã-touro. Este efeito pode ser melhor visualizado comparando-se os experimentos de 40°C e 50°C com os experimentos de 80°C e 90°C. Entretanto, quando se compara a extração por prensagem a 30°C com as demais extrações mecânicas, aquela apresentou o menor tempo de oxidação.



**Figura 5.5** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro submetido ao fluxo de oxigênio de 50 ml min<sup>-1</sup>

Comparando as diferentes metodologias de extração, observa-se que os óleos obtidos por extração mecânica apresentam maiores valores de tempos e temperatura de indução oxidativa (OIT) em relação aos óleos obtidos por extração supercrítica. Estes resultados sugerem que as amostras de óleos obtidos por extração supercrítica apresentam estágios de oxidação mais avançados do que os óleos obtidos por extração mecânica. A oxidação lipídica depende principalmente de fatores como a exposição ao oxigênio, luz, altas temperaturas e do grau de insaturação dos ácidos graxos, resultando na diminuição do seu valor nutritivo, potenciais problemas de segurança alimentar e, conseqüentemente, interferindo diretamente em seu valor comercial (VANDAMME *et al.*, 2015; PAZHOUHANMEHR *et al.*, 2016; QI *et al.*, 2016).

O fato das amostras de óleo obtidas por extração mecânica apresentarem maiores tempos e temperaturas de indução oxidativa quando comparados com os óleos obtidos por extração supercrítica, pode estar relacionado ao tempo de extração de cada processo e, conseqüentemente, quanto tempo adicional que estas amostras de óleo ficaram expostas ao oxigênio atmosférico e a luz. O processo de extração mecânica ocorreu em vinte e cinco minutos enquanto o processo de extração supercrítica ocorreu em cento e oitenta minutos, ou seja, um contato com o oxigênio atmosférico de 7,2 vezes maior que o primeiro processo.

**Tabela 5.4** - Tempo e temperatura de indução oxidativa obtidos por termogramas não-isotérmicos

Experimento	Tempo de indução oxidativa (OIT) [minutos]	Temperatura de indução oxidativa [°C]	Produto [minutos x °C]
30°C	11.32 ± 0.04	138.12 ± 0.42	1676,72
40°C	13.17 ± 0.05	156.27 ± 0.48	2058,08
50°C	13.06 ± 0.05	155.50 ± 0.47	2030,83
60°C	12.76 ± 0.05	152.75±0.46	1949,09
70°C	13.00 ± 0.05	154.99±0.47	2014,87
80°C	12.87 ± 0.05	153.38 ± 0.47	1974,00
90°C	12.05 ± 0.04	150.16 ± 0.47	1869,68
SCF 40°C	10.62 ± 0.04	141.49 ± 0.43	1502,62
SCF 60°C	10.81 ± 0.04	143.26 ± 0.44	1548,64
SCF 80°C	10.65 ± 0.04	141.83 ± 0.43	1510,49

SCF = Extração supercrítica (150 bar); 30°C -  $\bar{X}$  = média da triplicada da análise a 30°C;

Existe também a possibilidade de que os óleos obtidos nas diferentes metodologias de extração apresentem a composição de ácidos graxos diferentes, sendo óleos com maior grau de insaturação, principalmente os poli-insaturados são mais suscetíveis à oxidação (PARDAUIL *et al.*, 2011). Embora, as análise de FT-IR sugerem que os espectros vibracionais de ambas as técnicas de extração empregadas são similares e segundo Follegatti-Romero *et al.* (2009) e Uribe *et al.* (2011) as faixas investigadas de temperatura das extrações em ambas os métodos empregados não deveriam influenciar na composição de ácidos graxos do óleo obtido.

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 5.4, percebe-se que as temperaturas investigadas apresentaram efeitos significativos sobre a estabilidade oxidativa. As metodologias empregadas nas extrações dos óleos também apresentaram efeitos significativos, sendo que a extração mecânica apresentou melhores resultados quanto a estabilidade oxidativa do que a extração supercrítica. Na extração mecânica

observa-se que dentre as temperaturas investigadas, a temperatura de 40°C apresentou o maior tempo e temperatura de indução oxidativa, o que é uma vantagem, pois o gasto energético é inferior quando comparado a temperaturas de 50°C a 90°C.

## 5.5 Composição de Ácidos graxos

A composição de ácidos graxos das amostras de óleo de rã-touro obtidos por extração mecânica à 40°C e por extração supercrítica à 80°C e 150 bar são apresentados na Tabela 5.5. Os cromatogramas obtidos são apresentados nos anexos E. Estas amostras foram selecionadas para análise da composição de ácidos devido aos seguintes fatores: (i) Segundo Follegatti-Romero *et al.* (2009) e Uribe *et al.* (2011) a temperatura de extração, na faixa investigada, não influencia na composição de ácidos graxos do óleo obtido; (ii) na condição de 80°C e 150 bar foi obtido o maior rendimento para o processo de extração supercrítica e (iii) na condição de 40°C foi obtido baixos valores de índice de acidez e peróxido e maior tempo de indução oxidativa (DSC) para o processo de extração mecânica.

O teste estatístico *t-student*, a um nível de significância 5% ( $p$ -valor  $<0,05$ ), foi aplicado para avaliar a diferença entre a composição de ácidos graxos das amostras. Segundo este teste estatístico, a composição de ácidos graxos destas amostras não apresenta diferenças significativas.

Na tabela 5.6 são apresentados a composição de ácidos graxos obtido por McMullin *et al.* (1968) e Méndez *et al.* (1998) em comparação com os obtidos neste trabalho pela técnica de prensagem (40°C) e extração supercrítica (80°C). McMullin *et al.* (1968) obtiveram o óleo da rã-touro pelo processo de extração com metanol como solvente. Na caracterização da composição do óleo de rã-touro os autores relataram que a composição é de 20,9% de ácidos graxos saturados e 79,1% de ácidos graxos insaturados, sendo 56,8% de ácidos graxos monoinsaturados e 22,2% de poli-insaturados. Méndez *et al.* (1998) obtiveram óleo da rã-touro pelo processo de aquecimento das amostras com contato indireto com água (98°C), onde os autores relataram que a composição foi de 30,1% de ácidos graxos saturados e 69,9% de ácidos graxos insaturados, sendo 47,0% de ácidos graxos monoinsaturados e 23,0% de poli-insaturados. Esta diferença entre os resultados apresentados na Tabela 5.5 em comparação com os autores citados anteriormente pode ser explicado segundo Coutinho (2002), onde o autor relata que fatores como fonte de alimentação, peso e sexo influenciam na composição de ácidos graxos da rã-touro.

**Tabela 5.5** - Composição de ácidos graxos do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica e supercrítica.

Ácido Graxo	Nomenclatura	Prensagem 40°C (%)	Supercrítica 80°C (%)
C 14:0	Mirístico	1,83	2,43
C 15:0	Pentadecanóico	0,37	0,40
C 16:1	Palmitoléico ( $\omega$ -9)	11,87	12,27
C 16:0	Palmítico	18,23	18,77
C 17:0	Margaríco	0,29	0,34
C 18:2	Linoleico ( $\omega$ -6)	19,75	18,89
C 18:1	Oleico ( $\omega$ -9)	37,73	37,75
C 18:0	Esteárico	2,61	2,56
C 20:5	Eicosanopentenóico EPA ( $\omega$ -3)	1,20	1,35
C 22:6	Docosahexaenóico DPA ( $\omega$ -3)	1,99	2,30
$\Sigma$ Ácidos graxos saturados		24,34	25,24
$\Sigma$ Ácidos graxos monoinsaturados		51,74	51,10
$\Sigma$ Ácidos graxos poli-insaturados		23,95	23,20
$\Sigma$ $\omega$ -3		3,33	3,76
$\Sigma$ $\omega$ -6		20,60	19,46
$\Sigma$ $\omega$ -9		51,74	51,54

Na tabela 5.7 são apresentados a composição ácidos graxos do óleo da rã-touro quanto a ao número de duplas ligações (saturado, monoinsaturado e poli-insaturado) e quanto a denominação série ômega ( $\omega$ -3,  $\omega$ -6 e  $\omega$ -9) em comparação a óleos de peixes obtidos a partir de resíduos de tilápia (Chen et al., 2013), salmão (Sun et al., 2006) e de merluza (Rubio-Rodríguez et al., 2012). O óleo da rã-touro, dentre os citados, foi o que apresentou o menor teor de ácidos graxos saturados e o maior teor de ácidos graxos monoinsaturados. Ao passo que o teor de ácido graxos poli-insaturado foi maior que o óleo de tilápia, entretanto, foi menor que o óleo de merluza e o de salmão. Quanto aos teores da série ômega 3, o óleo da rã-touro apresentou teor similar ao do óleo de tilápia e menor que o óleo de salmão e merluza. Entretanto, quanto aos teores de ácidos graxos das series ômega 6 o óleo de rã-touro foi superior de 3,65 até 6,23 vezes e em relação ao ômega 9 de 1,68 a 2,14 vezes.

**Tabela 5.6** – Comparação entre a composição de ácidos graxos da rã-touro na literatura e neste trabalho.

A (%)	Méndez <i>et al.</i>	McMullin	Neste trabalho	
	(1998)	(1968)	Prensagem 40°C	Supercrítica 80°C
C 14:0	2.7	3.6	1.83	2.43

C 15:0	0.5	1.4	0.37	0.40
C 16:0	18.1	13.5	18.23	18.77
C 16:1	8.0	17.1	11.87	12.27
C 16:2	ND	1.5	ND	ND
C 17:0	ND	ND	0.29	0.34
C 18:0	4.1	1.9	2.61	2.56
C 18:1	31.7	39.6	37.73	37.75
C 18:2	12.9	6.3	19.75	18.89
C 18:3	1.4	8.6	ND	ND
C 20:0	ND	0.5	ND	ND
C 20:2	ND	1	ND	ND
C 20:3	ND	0.5	ND	ND
C 20:4	ND	0.5	ND	ND
C 20:5	1.5	1	1.2	1.35
C 22:02	ND	0.5	ND	ND
C 22:6	3.6	1.6	1.99	2.30
$\Sigma$ AGS	30.0	20.9	24.34	25.24
$\Sigma$ AGM	47.0	56.8	51.74	51.10
$\Sigma$ AGP	23.0	22.2	23.95	23.20

ND = Não detectado; AGS = Ácidos graxos saturados; AGM = Ácidos graxos monoinsaturados; AGP = Ácidos graxos poli-insaturados.

De acordo com os resultados apresentados nesta seção perceber-se que as metodologias de extração investigadas não apresentaram efeitos significativos sobre a composição de ácidos graxos no óleo final.

**Tabela 5.7** – Comparação da composição de ácidos graxos do óleo de rã-touro com óleos de vísceras de peixes.

Ácido Graxo	Neste trabalho		Tilápia (Chen <i>et al.</i> , 2013)	Salmão (Sun <i>et al.</i> , 2006)	Merluza (Rubio-Rodríguez <i>et al.</i> , 2012)
	Prensagem 40°C (%)	Supercrítica 80°C (%)			
$\Sigma$ AGS	24,34	25,24	53,30	31,73	28,24
$\Sigma$ AGM	51,74	51,10	38,50	36,05	46,22
$\Sigma$ AGP	23,95	23,20	7,80	32,22	25,38
$\Sigma$ $\omega$ -3	3,33	3,76	3,72	22,47	22,18
$\Sigma$ $\omega$ -6	20,60	19,46	3,79	5,47	3,19



$\sum \omega-9$	51,74	51,54	28,06	24,11	30,79
AGS = Ácidos graxos saturados; AGM = Ácidos graxos monoinsaturados; AGP = Ácidos graxos poli-insaturados.					

## 5.6 Viscosidade cinemática

Na Figura 5.5 são apresentados os valores da viscosidade cinemática das amostras de óleo obtidas a diferentes temperaturas por extração mecânica. A viscosidade do óleo foi medida em duas temperaturas (20 e 30°C) e, em uma mesma temperatura de medição, a partir da aplicação do teste ANOVA não foi observado diferenças significativas (5% de significância).

Allen et al. (1999) relataram ser possível calcular a viscosidade do óleo em função da composição de seus ácidos graxos. A viscosidade é afetada por diversos fatores, inclusive o grau de insaturação dos ácidos graxos. A oxidação lipídica gera a quebra das ligações duplas e triplas que, conseqüentemente, altera a viscosidade do óleo (IGWE, 2004; CORSINI *et al.*, 2008)

Os resultados das análises de viscosidades em ambas condições (20°C e 30°C) não apresentaram valores estatisticamente diferente, assim, sugere-se que os óleos obtidos a diferentes temperaturas de extração mecânica apresentam composição similar de ácidos graxos. Observa-se também a relação indireta da viscosidade com o aumento de temperatura, onde observou-se uma redução de  $56,89 \pm 2,33$  (%) entre a viscosidade de 30°C e a 20°C. Isto é devido a incapacidade das moléculas de óleo em formar aglomerados estáveis com o aumento de temperatura (IGWE, 2004).

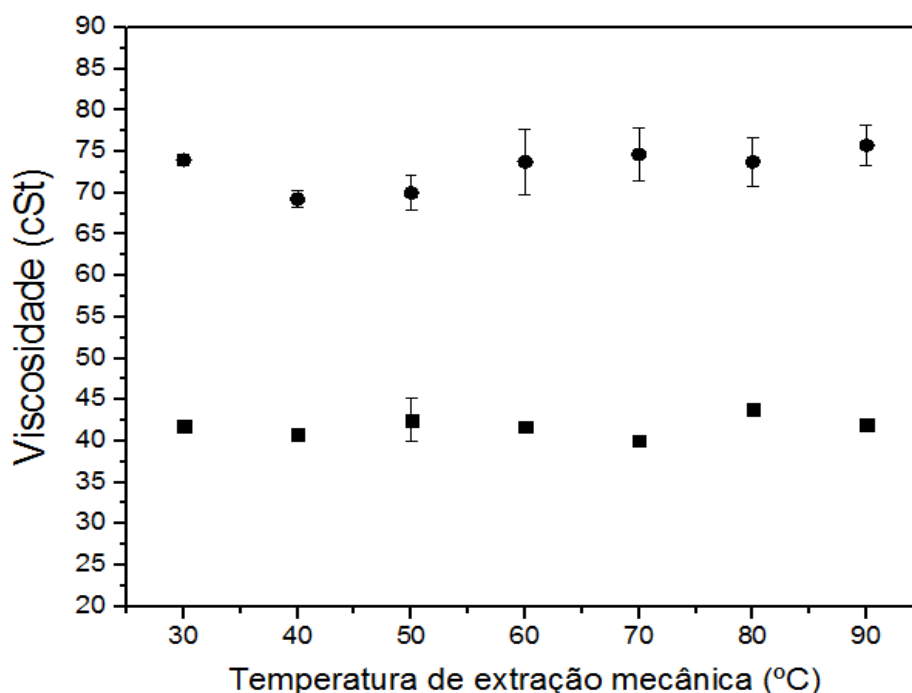


Figura 5.6 – Viscosidade do óleo de rã-touro obtidos em diferentes temperaturas de extração mecânica: ■ viscosidade medida a 30°C; ● viscosidade medida a 20°C.

## 5.7 Considerações finais

O corpo gorduroso da rã-touro pode ser utilizado como fonte alternativa de óleo, pois é constituído majoritariamente de lipídios. Assim, pode-se agregar valor comercial a este resíduo, onde até o presente momento não possui uma destinação consolidada, de modo igual ao que já é realizado na indústria pesqueira. O potencial da aplicação da extração mecânica na obtenção do óleo de rã-touro é justificado pelos elevados valores de rendimento e estabilidade oxidativa e pelos baixos valores de índice de acidez e peróxido verificados neste trabalho. Apesar dos valores de viscosidade cinemática sugerirem que os óleos obtidos nas diferentes temperaturas de extração mecânica investigadas apresentam composição química similar, é preferível o óleo obtido a 40°C pois este apresentou a maior estabilidade oxidativa juntamente com o menor índice de peróxido. O processo de extração supercrítica geralmente é empregado como proposta de obtenção de um produto de maior qualidade e valor agregado. Este processo, no entanto, não apresentou vantagens sobre a extração mecânica, apesar da análise de FT-IR e a análise cromatográfica indicar que os ambos processos geram óleos com composição química similar, os rendimentos obtidos neste trabalho foram inferiores. Além do mais, a análise térmica (DSC) indica que os óleos obtidos pela extração supercrítica apresentam estabilidades oxidativas menores que a

extração mecânica. Por fim, a análise cromatográfica gasosa indicou que em ambos os processos os óleos são obtidos com composição similar quanto ao teor de ácidos graxos e não foi possível detectar outros possíveis compostos, o que não justifica o custo elevado exigido na extração supercrítica

## 6. Conclusões

Neste presente trabalho foram realizados experimentos para verificar o potencial de obtenção de óleo de rã-touro pelo processo de extração mecânica e extração supercrítica empregando dióxido de carbono como fluido. A seguir são apresentadas as conclusões dos resultados obtidos no neste presente trabalho.

- Na caracterização do corpo gorduroso da rã-touro comprovou-se que este órgão é constituído majoritariamente de lipídios, sendo este valor de  $92,52 \pm 2,97$  %. Minoritariamente, este órgão é composto de  $4,32 \pm 0,22$  % de umidade,  $2,98 \pm 1,00$  % de teor proteico e  $0,18 \pm 0,03$  % de cinza;
- A análise estatística demonstrou que no processo de extração mecânica o efeito da temperatura não apresentou influência no rendimento, obtendo-se em média 66,10% de óleo em relação a massa inicial. O índice de acidez também não foi influenciado, sendo o valor de médio de  $2,52$  mg KOH g<sup>-1</sup>. O índice de peróxido, no entanto, foi influenciado diretamente com o aumento da temperatura, sendo o menor valor obtido de  $0,47$  mEq kg<sup>-1</sup> (30°C) e o maior de  $1,26$  mEq kg<sup>-1</sup> (90°C). A melhor condição neste processo, ou seja, aquela que apresentou melhores características do óleo, foi a de 40°C quando comparado o rendimento, índice de acidez, índice de peróxido, viscosidade cinemática e estabilidade oxidativa;
- As viscosidades medidas dos óleos obtidos nas diferentes condições de extração mecânica investigadas apresentaram viscosidade similar, desta forma, sugere-se que os óleos obtidos também apresentam composição similar;
- As extrações realizadas com dióxido de carbono supercrítico apresentaram influência da temperatura diretamente no rendimento de extração. A condição que apresentou o maior rendimento de óleo (52,61%) foi a de maior temperatura (80°C e 150 bar);
- Os rendimentos obtidos pela técnica de extração supercrítica foram menores que os rendimentos obtidos pela extração mecânica, sugerindo que o solvente utilizado não é favorável para a obtenção de óleo de rã-touro;
- A análise por espectrometrias FT-IR confirmaram a similaridade da composição dos óleos obtidos por extração mecânica e supercrítica.
- A análise estatística dos resultados de cromatografia gasosa demonstrou que os óleos obtidos pelos diferentes processos também não revelaram diferenças significativas quanto ao perfil dos ácidos graxos sendo 25% de ácidos graxos saturados e 75% de ácidos

graxos insaturados. Apresentou, em média, 51,64% de ácidos graxos Ômega-9, 20,03% de ácidos graxos Ômega-6 e 3,55% de ácidos graxos Ômega-3.

- Nas análises de estabilidade oxidativa, o óleo extraído mecanicamente apresentou maiores tempo de indução oxidativa do que a extração supercrítica. As análises de FT-IR e composição de ácidos graxos indicam que ambos processos resultam em óleos com composição similar. Assim, a diferença na estabilidade oxidativa em ambos os processos podem estar relacionados ao tempo total do processo e conseqüentemente a um maior tempo a exposição de O<sub>2</sub> atmosférico e a luz uma vez que esses fatores favorecem a oxidação lipídica e a extração supercrítica requereu um tempo de processo 7,2 vezes maior do que a extração mecânica.

Os resultados encontrados indicam que o corpo gorduroso da rã-touro é uma possível fonte alternativa de obtenção de óleo agregando valor a este resíduo, além de que, suas características o favorece perante os resíduos utilizados na produção de óleo de peixe. Quanto ao processo de obtenção de óleo, na faixa de temperatura investigada a extração por prensagem apresentou, até o momento, maior rendimento e melhor estabilidade oxidativa do que a extração supercrítica empregando CO<sub>2</sub> como solvente. Por último, o óleo de rã-touro, comparado com os óleos de tilápia, merluza e salmão, apresentou teor superior de ácidos graxos da família ômega 6 e 9.

## 7. Referências Bibliográficas

- ALLEN, C. A. W.; WATTS, K. C.; ACKMAN R. G.; PEGG M. J. **Predicting the viscosity of biodiesel fuels from their fatty acid ester composition.** Fuel. v.18, p.1319-1326, 1999.
- ALMEIDA, C. A. S. **Avaliação dos principais fitosteróis em óleos vegetais e azeite.** Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2009. 99 p. Dissertação (Mestrado).
- ALMEIDA, P. P.; FERREIRA, S. R. S. **Crossover pressure for supercritical fluid extraction of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil with pure CO<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> plus ethanol.** In: I Iberoamerican Conference on Supercritical Fluids (PROSCIVA). Foz do Iguaçu, Caderno de resumos do PROSCIBA, 2007.
- ALVES, M.; BASTOS, M.; LEITÃO, F.; MARQUES, G.; RIBEIRO, G.; CARRILHO, F. **Vitamina D – Importância da avaliação laboratorial.** Rev. Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo. v.8, n.1, p.32-39, 2013.
- AHANGARI, B., SARGOLZAEI, J. **Extraction of pomegranate seed oil using subcritical propane and supercritical carbon dioxide.** Theor. Found. Chem. Eng. n.46, p.258–265, 2012.
- ANTONIASSI, R. **Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras.** B.CEPPA, v.19, n.2, p.353-380, 2001.
- ANTONINI, E.; FARINA, A.; LEONE, A.; MAZZARA, E.; URBANI, S.; SELVAGGINI, R.; SERVILI, M.; NINFALI, P. **Phenolic compound and quality parameters of family farming versus protected designation of origin (PDO) extra-virgin olive oils.** Journal of Food Composition and Analysis. n.43, p.75-81, 2015.
- ANVISA. **Regulamento técnico para óleos e gorduras vegetais.** Brasília, 2004.
- AOCS. **Official methods and recommended practices of the American Oil Chemists Society.** Washington, 2004.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemist. **Official Methods of Analysis.** 16<sup>th</sup> ed. Gaithersburg: AOAC, 2005.
- BAGGIO SILVA, P.; BORDIGNON, A. C.; FERNANDA SILVA, L.; OLIVEIRA, L. P.; SILVA, G. H.; SOUZA OLIVEIRA, S. S.; TRENTIM, T. A. B. **Criação de Rã: Estudo de Viabilidade Econômica para Implantação de Ranário na Região de Mogi Mirim/SP – 2009.** Universitas, v.2, n°3, p.97-119, 2009.
- BAILEY, A. E.; **Industrial Oil and Fat Products.** 5 th ed New York: John Wiley. vol. 3, 1996.
- BELTRÃO, K. R. de A. **Dossiê Técnico: Ranicultura.** Centro de Apoio ao Desenvolvimento Tecnológico da Universidade de Brasília. Brasília, 2008.
- BELLUZZO, A. P.; RODRIGUES, C. A. G.; CRIBB, A. Y.; QUARTAROLI, C. F. **Distribuição espacial e áreas potenciais para a criação de Rã-touro (*Rana catesbeiana* SHAW, 1802) na região sudeste do Brasil.** CONGRESSO DE INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA; Campinas, SP, 2010.

- BEULEN, J. W. L. *Et al.* **High dietary menaquinone intake is associated with reduced coronary calcification.** *Atherosclerosis.* v.203, p.489-493, 2009.
- BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos.** 2ªed, São Paulo: Varela, 1992.
- BOSS, E. A. **Análise do desempenho de plantas de extração de óleo convencionais e de processos supercríticos.** Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000. 121 p. Dissertação (Mestrado).
- BOOTH, S. L. **Vitamin K: food composition and dietary intakes.** *Food & Nutrition research.* v.56, p.56-61, 2012.
- BOOTH, S. L.; DAVIDSON K. W.; SADOWSKI, J. A. **Evaluation of an HPLC method for the determination of Phylloquinone (Vitamin K1) in various food matrices.** *J. Agric. Food. Chem.* v.42, p.295-300, 1994.
- BRASIL. **Portaria Ibama Nº93, de 7 de julho de 1998.**
- BRASIL (2006), MAPA, Instrução Normativa nº 49, de 22 de dezembro de 2006. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos Vegetais Refinados; a Amostragem; os Procedimentos Complementares; e o Roteiro de Classificação de Óleos Vegetais Refinados,** Seção1, Página140. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Diário Oficial da União de 26/12/2006. Brasília, Brasil.
- BRENNAN, J. G.; BUTTERS, J. R.; COWELL, N. D.; LILLEY, A. E. V. **Food engineering operations.** Linton Road, England: Elsevier Applied Science, 1990.
- BROWN, M. E. **Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications.** London: Chapman and Hall, 211p. 1988.
- BRUNNER G. **Supercritical fluids: technology and application to food processing.** *Journal of Food Engineering,* n. 67, p. 21-33, 2005.
- CARDOSO, C. R. B.; SOUZA, M. A.; FERRO, E. A. V.; FAVORETO, S.; PENA, F. D. O. **Influence of topical administration of n-3 and n-6 essential and n-9 nonessential fatty acids on the healing of cutaneous wounds.** *The International Journal of Tissue Repairs and Regeneration.* v. 12, p. 235-243, 2004.
- CARRARO, K. C., **Ranicultura: um bom negócio que contribui para a saúde.** *Rev. FAE,* v.11, n.1, p.111-118, 2008.
- CARVALHO, L. T. **Diagnostico da competitividade na cadeia produtiva de carne de rã-touro no estado do rio de janeiro.** Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa. 2011, 114 p. Tese (Doutorado).
- CARVALHO, C. O. **Comparação entre métodos de extração de óleo *Mauritia flexuosa* L.f. (arecaceae – buruti) para o uso sustentável na reserva de desenvolvimento tupé: rendimento e atividade antimicrobiana.** Pós-graduação em biotecnologia e recursos naturais. - Universidade do Estado do Amazonas. 2011, 110 p. Dissertação (Mestrado).

- CAVALIER, E.; LUKAS, P.; CRINE, Y.; PEETERS, S.; CARLISI, A.; GOFF, C. L.; GADISSEUR, R.; DELANAYE, P.; SOUBERBIELLE, J. **Evaluation of automated immunoassays for 25(OH)-vitamin D determination in different critical populations before and after standardization of the assays.** Clinica Chimica Acta. v.431, p.60-65, 2014.
- CHEN, C., SUN, B., LI, X., LI, P., GUAN, W., BI, Y., PAN, Q. **N-3 essential fatty acids in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Quantification of optimum requirement of dietary linolenic acid in juvenile fish.** Aquaculture, n.416-417, p.99-104, 2013
- CLAYNTON, P. T.; WHITFIELD, P.; IYER, K. **The role of phytosterols in the pathogenesis of liver complications of pediatric parental Nutrition.** Nutrition, v.14, n.1, p.158-164, 1998.
- CORSINI, M. S.; JORGE, N. **Perfil de ácidos graxos e avaliação da alteração em óleos de frituras.** Quim. Nova, v.31, n.5, p.956-961, 2008.
- COUTINHO, C. M., **Teor de lipídeos e composição em ácidos graxos da gordura de Rã-Touro (*Rana catesbeiana*, SHAW, 1802).** Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Viçosa. 2002, 94 p. Tese (Doutorado).
- CRIBB, A. Y., AFONSO, A. M., MOSTÉRIO, C. M. F., **Manual técnico de ranicultura.** Embrapa. Brasília/DF, 2013.
- CRIBB, A. Y.. Embrapa Agroindústria de Alimentos. **Projeto objetiva fortalecimento tecnológico da cadeia de rã no Brasil.** Mai. 2009. Disponível em: <<http://www.agrolink.com.br/aviacao/NoticiaDetalhe.aspx?CodNoticia=89868>>. Acessado em Junho de 2015.
- CUNHA, E. R., DELARIVA, R. L., **Introdução da Rã-touro, *Lithobates catesbeianus* (SHAW, 1802): uma revisão.** SaBios: Rev. Saúde e Biol., v.4, n.2, p.34-46. 2009.
- DEBIER, C.; LARONDELLE, Y. **Vitamins A and E: metabolismo, roles and transfer to offspring.** British Journal of Nutrition, v.93, p.153-175, 2005.
- DEMAJORIVIC, J., **Da política tradicional de tratamento do lixo à política de gestão de resíduos sólidos: as novas prioridades.** Revista de Adm. De Empresas, v.35, n.3, p. 88-93. São Paulo, 1995.
- DROZDOWSKI, B.; SZUKALSKA, E. **A rapid instrumental method for the evaluation of the stability of fats.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v.64, n.7, p.1008-1011, 1987
- DURING, A.; HARRISON, E. H. **Intestinal absorption and metabolismo of carotenoids: insights from cell culture.** Archives of Biochemistry and Biophysics, v.430, p.77-88, 2004.
- DYSKEN, M. W.; SANO, M.; ASTHANA, S.; VERTREES, J. E.; PALLAKI, M.; et al. **Effect of Vitamin E and Memantine on Functional Decline in Alzheimer Disease.** Journal American Medical Association. v. 311, p. 33-44, 2014.



- ELDIN, A. K. **Methods to determine the extent of lipid oxidation in foods.** Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. p.181-195. 2010.
- ELISIA, I.; YOUNG, J. W.; YUAN, Y. V.; KITTS, D. D. **Association between tocopherol isform composition and lipid oxidation in selected multiple edible oils.** Food Research International. v.52, p.508-513, 2013.
- ESTEVES, W. GONÇALVES, L. e BARRARE-ARELLANO, D. **Metodologia padrão alemã: para análises de gorduras e outros lipídeos.** Seções A, B, C e F.
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). **Scientific Opinion on Fish Oil for Human Consumption.** EFSA Journal, v.8, n.10, p.1874-1992, 2010.
- FARIA, E. A.; LELES, M. I. G.; IONSASHIRO M; ZUPPA, T. O. ANTONIOSI FILHO, N. R. **Estudo da estabilidade térmica de óleos e gorduras vegetais por TG/DTG e DTA.** Eclet. Quím., v.27, 2002.
- FILIPPIS, F. M. **Extração com CO<sub>2</sub> supercrítico de óleos essenciais de Hon-sho e Ho-sho – Experimentos e Modelagem.** Dissertação (Programa de Pós-graduação em Engenharia Química). 2001, 114p, Porto Alegre/RS.
- FONSECA, H; GUTIERREZ, L. E. **Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais.** Anais da E. S. A., v.31, p.485-190, 1974.
- FRANKEL, E. N. **Lipid Oxidation: Mechanisms, Products and Biological Significance.** Journal of the American Chemistry's Society. v.61, n.12, p.1908-1917. 1984
- FRANKEL, E. N. **Recent advances in Lipid Oxidation.** Journal of the Science of Food and Agriculture. V.54, p.495-511, 1991.
- FREITAS, L.; BUENO, T.; PEREZ, V. H.; CASTRO, H. F. **Monoclicerídeos: produção por via enzimática e algumas aplicações.** Quimica Nova. v.31, n.6, p.1514-1512, 2008.
- FROST, D. R. **Amphibian species of the world: a taxonomic and geographical reference.** 1985. 247 p.
- FERNÁNDEZ, C. F.; FEBLES, C. S.; BERNABEU, A. S. TRIANA, B. E. G. **Funciones de la vitamina E. Actualización.** Artículos de revisión. Rev Cubana Estomatol, v.40, n.1, p. 28-32, 2002.
- FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; PIANTINO, C. R.; GRIMALDI, R.; CABRAL, F. A. **Supercritical CO<sub>2</sub> extraction of omega-3 rich oil from Sachainchi (Plukenetia volubilis L.) seeds.** The Journal of Supercritical Fluids, v.49, p.323-329, 2009.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION & WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO. **Vitamin and mineral requirements in human nutrition.** Food and Nutrition, 2ed., 2004.
- FURTADO, A. A. Embrapa Agroindústria de Alimentos. **Os mistérios e as delícias do patê de carne de rã.** Abr. 2006. Disponível em: <<http://www.paginarural.com.br/noticia/38627/brasil-os-misterios-e-as-delicias-do-pate-de-carne-de-ra>>. Acessado em Junho de 2015.

- GARCIA-MESA, J. A.; CASTRO, M. D. L.; VALCÁRCEL, M. **Factos affecting the gravimetric determination of the Oxidative Stability of Oils.** Journal of the American Oil Chemists' Society. v.90, n.3, p.245-247. 1993.
- GAST, G. C. M.; DE ROOS, N. M.; SLUIJS, I.; BOTS, M. L.; BEULENS, J. W. J.; GELEIJNSE, J. M.; WITTEMAN, J. C.; GROBBEE, D. E.; PEETERS, P. H. M.; VAN DER SCHOUW, Y. T. **A high menaquinone intake reduces the incidence of coronary heart disease.** Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases. v.19, p.504-510, 2009.
- GEANKOPLIS, C. J. **Transport processes and separations process principles.** 4th ed. New Jersey: Prentice Hall, 2003.
- GIOIELLI, Luiz Antonio. **Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia.** Rev. bras. farmacogn. [online]. v.5, n.2, pp. 211-232, 1996.
- GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; SIKORSKA, E.; KHMELINSKII, I.; SIKORSKI, M. **Tocopherol content in edible plant oils.** Polish journal of food and nutrition sciences. v.57, n.4, p.157-161, 2007.
- GORDON, M.; POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N. **Antioxidants in Food: Practical applications.** England: Woodhead publishing, 2001.
- GRAY, J. I.; **Measurement of Lipid Oxidation: A Review.** Journal of the American Oil Chemists' Society, v.55, p.539-546, 1978.
- GUINAZI, M.; MILAGRES, R. C. R. M.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M.; CHAVES, J. B. P. **Tocoferóis e Tocotrienóis em óleos vegetais e ovos.** Quimica Nova, 2009. v.32, Nº8, p. 2098-2103.
- GUINAZI, M. **Tocoferóis e tocotrienóis em hortaliças, ovos e óleos vegetais utilizados em restaurantes comerciais.** Pós-graduação em ciência da nutrição. Viçosa/MG. 2004, 108p, *Magister Scientiae* (Tese).
- GUNSTONE, F. D. **Vegetable Oils in Food Technology: Composition, properties and uses.** Wiley-Blackwell, 2ed, 2011.
- GUO, X.; NANUS, D. M.; RUIZ, A.; RANRO, R.; BOK, D.; CUDAS, L. J. **Reduced levels of retinyl esters and vitamin A in human renal cancers.** Cancer Research, v.61, p.2774-2781, 2001.
- HALLIWEL, B.; MURCIA, M. A.; CHIRICO, S.; ARUOMA, O. I. **Free Radicals and Antioxidants in Food and In Vivo: What They DO and How They Work.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition. v.35, n.1&2, p.7-20, 1995.
- HATANAKA, E.; CURI, R. **Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão.** Revista Brasileira de Farmacologia., 2007, v. 88, n. 2, p. 53-58.
- HENEGOUWEN, G. M. B. V.; JUNGINGER, H. E.; VRIES, H. **Hydrolysis of RRR- $\alpha$ -tocopheryl acetate (vitamin E acetate) in the skin and its UV protecting activity (an in vivo study with the rat).** Journal of Photochemistry and Photobiology. 1995. v. 29, p. 45-51.

- HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R. **Edible oil analysis by high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy: recent advances and future perspectives.** Trends in Food Science & technology, v.14, n.12, p.499-506, 2003.
- HUANG, H.; APPEL, L. J.; CROFT, K. D.; MILLER III, E. R., MORI, T. A.; PUDDEY, I. B. **Effects of vitamin C and vitamin E on in vivo lipid peroxidation: results of a randomized controlled trial.** The American Journal of Clinical Nutrition. v.76, p. 549 – 556. 2002.
- HÖHNE, G. W. H.; HEMMINGER, W. F.; FLAMMERSHEIM, H. J.; **Differential Scanning Calorimetry.** Springer-Berlag Berlin Heidelberg, 2<sup>a</sup>ed, 2003.
- IGWE, I. O. **The effects of temperature on the viscosity of oils in solution.** Industrial Crops and Products, v.19, p.185-190, 2004.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz.** v. 1: Método químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. Sao Paulo: IMESP, p. 25-26. 2008.
- IWANAGA, D.; GRAY, D. A.; FISK, I. D.; DECKER, E. A.; WEISS, J.; McCLEMENTS, D. J. **Extraction and Characterization of Oil Bodies from soy beans: A natural source of pre-emulsified soybean oil.** Journal of Agric. Food Chem. v.55, p.8711-8716, 2007.
- JENAB, M. *et al.* **Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study.** BMJ (Online), 2010.
- JIANG, Q.; CHRISTEN, S.; SHIGENAGA, M. K.; AMES, B. N. **Tocopherol, the major form of vitamin E in the US diet, deserves more attention.** Review Article. The American Journal of Clinical Nutrition. v.74, p. 714 – 713. 2001.
- JORGE, N.; RAMALHO, V. C. **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos.** Quimica Nova. v.29, n.4, p. 755-760, 2006.
- KARADAS, F.; SURAI, P. F.; SPARKS, N. H. C.; GRAMMENIDIS, E. **Effects of maternal dietary supplementation with three sources of carotenoids on the retinyl esters of egg yolk and developing quail liver.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part A. v.140, p.430-435, 2005.
- KARANI, M. PONNAMPALAM, E. N.; HOPKINS, D. L. **The effect of palm oil or canola oil on feedlot performance, plasma and tissue fatty acid profile and meat quality in goats.** Meat Science. v.94, p.165-169, 2013.
- KENAR, J. A.; MCELLIGOTT, J.; HWANG, H.; ERHAN, S. Z.; **A DSC Study of Z<sub>2</sub>- Z<sub>3</sub> Viscosity Blown Soybean Oil.** Journal of American Oil Chemistrys´ Society. v.19, n.11, p.1151-1155, 2002.
- KELLER, K. L.; FENSKE, N. A.; **Uses of vitamins A, C, and E and related compounds in dermatology: A review.** Journal American Academy Dermatology. 1998. v.39, p. 611-625.

- KINSELLA, J. E. **Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids and amelioration of cardiovascular disease: possible mechanisms.** The American Journal of Clinical Nutrition, v.52, p. 1-28, 1990.
- KNAPEN, M. H. J.; SCHOUGERS, L. J.; SHEARES, M. J.; NEWMAN, P.; THEUWISSEN, E.VERMEER, C. **Association of vitamin K status with adiponectin and body composition in health subjects: uncarboxylated osteocalcin is not associated with fat mass and body weight.** British Journal of Nutrition. v.108, p.1017-1024, 2012.
- KOLAKOWSKA, A.; SIKORSKI, Z. E.; **Chemical and functional properties of food lipids.** CRC PRESS, 2002.
- LAM, M. K.; TAN, K. T.; LEE, L. T.; MOHAMED, A. R. **Malaysian palm oil: surviving the food versus fuel dispute for a sustainable future.** Renewable and sustainable energy reviews. v.13, p.1456-1464, 2009.
- LOPES, V. S.; DANTAS, T. N. C.; CUNHA, A. F.; MOURA, E. F.; MACIEL, M. A. M. **Obtenção de um tensoativo aniônico a partir de óleo de *Rana Catesbeiana* SHAW, 1802).** Rev. de Ci. Vida. Seropédica, v.30, n. 2, p.85-97, 2010.
- Mc MULLIN, G. F.; SMITH, S. C.; WRIGHT, P. A. **Tissue fatty acid composition in four diverse vertebrate species.** Comparative Biochemistry and Physiology., v. 26, p. 211- 221, 1968.
- MAILLARD, V.; BOUGNOUX, P.; FERRARI, P.; JOURDAN, M.; PINAULT, M.; LAVILLONNIÈRE, F.; BODY, G.; FLOCH, O.; CHAJÈS, V. **N-3 and N-6 Fatty acids in breast adipose tissue and relative risk of breast cancer in a Case-Control Study in tours, France.** Journal International of Cancer. 2002, v.98, p.78-83.
- MANHEZI, A. C.; BACHION, M. M.; PEREIRA, A. L.; **Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas.** Revista Brasileira de Enfermagem. v. 61, n. 5, p. 620-629, 2008.
- MARAN, J. P.; PRIYA, B. **Supercritical fluid extraction of oil from muskmelon (*Cucumis melo*) seeds.** Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. v.47, p.71-78, 2007.
- MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, J. M.; **Fitting the Sovová's supercritical fluid extraction model by means of a global optimization tool.** Computers and Chemical Engineering. v.32, p.1735-1745, 2008.
- MAUL, A. A. **Fluídos supercríticos: Situação atual e futuro da extração supercrítica.** Biotecnologia: Ciência e Desenvolvimento. v.11, p. 42-46, 1999.
- MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. **Extração por fluido supercrítico.** Revista brasileira de farmacologia. v.5, n.2, p.185-200, 1996.

- McCORNICK, R. L.; RATCLIF, M. LAWRENCE, R. **Several factors affecting the stability of biodiesel in standard accelerated tests.** Fuel Processing Technology. v.88, n.7, p.651-657, 2007.
- MEHTA, B. M.; DARJI, V. B.; APARNATHI, K. D.; **Comparison of five analytical methods for the determination of peroxide value in oxidized ghee.** Food Chemistry, v.185, p.449-453, 2015.
- MENA-BRAVO, A.; FERREIRO-VERA, C.; PRIEGO-CAPOTE, F.; MAESTRO, M. A.; MOURINO, A.; QUESADA-GOMEZ, J. M.; LUQUE DE CASTRO, M. D. **Quantitative analytical method to evaluate the metabolism o vitamin D.** Clinica Chimica Acta. v.442, p.6-12, 2015.
- MEYER, W. H.. **Food fats and oils.** 4. ed. Institute of Shortening and Edible Oils, Inc. 1974, p. 1-18.
- MICHIELIN, E. M. Z. **Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico da oleoresina de cavalinha (*Equisetum arvense*).** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 105p., 2005. Dissertação (Mestrado).
- MICIC, D. M.; OSTOJIC, S. B.; SIMONOVIC, M. B.; KRSTIC, G.; PEZO, L. L.; SIMONOVIC, B. R. **Kinectis of blackberry and raspberry seed oils oxidation by DSC.** Thermochnica Acta. v.601, p.39-44, 2015.
- MILONE, M.; CALIENDO, M. F.; RATOGLI, R. K.; CHIEFFI, G. **Seasonal lipid composition in the liver, fat body and gonads of *Rana esculenta*.** Bolletino di zoologia, v. 50, p.227-234, 1983.
- MORETTO, E., FETT, R.. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos.** São Paulo, 1998.
- MURGEL, M.F. **Cápsulas De Óleo De Peixe: Percepção Da Dosagem E Finalidade De Consumo.** Programa de pós-graduação em Ciências na área de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, RJ. 2010, 86p, Dissertação (Mestrado).
- NAMIKI, M.; **Antioxidants/Antimutagens in food.** Food Science and Nutrition. v.29, n.4, p.273-300, 1990.
- NELSON, D.L., COX, M. M., **Lehninger Princípios de Bioquímica.** 3. Ed. São Paulo, 2002.
- OLIVEIRA, B. H.; BUENO, D. D. **Biotransformação de esteróis.** Química Nova. v.19, n.4, p.233-236, 1995.
- OTA, Y.; SASAGAWA, T.; SUZUKI, K.; TOMIOKA, K.; NAGAI, A.; NIIYAMA, G.; KAWANAKA, M. **Vitamin E Supplementation Increases Polyunsaturated Fatty Acids of RBC Membrane in HCV-Infected Patients.** Nutrition. Okayama, Japan. v. 20, p. 358-363, 2004.
- OUYANG L-B. **New correlations for predicting the density and viscosity of supercritical carbon dioxide under conditions expected in Carbon Capture and Sequestration operations.** The Open Petroleum Engineering Journal, n.4, p.13-21, 2011.

- PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. **O Papel dos Alimentos Funcionais na Prevenção e Controle do Câncer de Mama.** Revista Brasileira de Cancerologia. v. 50, n. 3, p. 251-260, 2004.
- PALACE, V.; WERNER, J. **Vitamins A and E in the maternal diet influence egg quality and early life stage development in fish: a review.** Scientia Marina. v.70, 41-57, 2006.
- PARDAUIL, J. J. R.; SOUZA, L. K. C.;MOLFETTA, F.; ZAMIAN, J. R.; FILHO, G. N. R.; DA COSTA, C. E. F. **Determination of the oxidative stability by DSC of vegetable oils from Amazonian area.** Bioresource Technology, v.102, p.5873-5877, 2011.
- PASTERIS, S. E., BÜHLER, M. I., NADER-NACÍAS, M. E. **Microbiological and histological studies of farmed-bullfrog (*Rana catesbeiana*) tissues displaying red-LED syndrome.** Aquaculture, v. 251, p.11-18, 2006.
- PAZHOUHANMEHR, S.; FARHOOSH, R.; SHARIF, A.; KENARI, R. E. **Oxidation kinetics of common Kilka (*Clupeonella cultiventris cáspia*) oil in presence of bene oil's unsaponifiable matter.** Food Chemistry, v.190, p.748-754, 2016.
- PERRY, R. H.; CHILTON, C. H. **Manual de engenharia química.** 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1986.
- QI, B; ZHANG, Q.; SUI, X.; WANG, Z; LI, Y.; JIANG, L. **Differential scanning calorimetry study – Assessing the influence of composition of vegetable oils on oxidations.** Food Chemistry, v.192, p.601-607, 2016.
- RAMALHO, Hugo F.; SUAREZ, Paulo A. Z. **A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino.** Revista Virtual de Química, Brasília, v. 5, n. 1, p.2-15, 9 nov. 2012.
- REVERCHON, E. **Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products.** Journal of Supercritical fluids. v.10, p.1-37, 1997.
- REVERCHON, E.; MARCO, I. **Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter.** Journal of Supercritical Fluids. v.38, p.146-166, 2006.
- RIBEIRO, V. A.; OLIVEIRA, A. C. M.; BECHTEL, P.; PRETICE, C.; **Evaluation of low temperature rendering of Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) liver oil.** Brazilian Journal of Food Technology. University of Alaska Fairbanks, Universidade federal do Rio Grande (FURG), 2013.
- ROSSEL, J. B.; ALLEN, J. C; HAMILTON, R. J. **Rancidity in Foods.** London: Applied Science, pg. 21-45, 1983.
- ROY, B. C.; GOTO, M.; HIROSE, T. **Extraction of Ginger Oil with Supercritical Carbon Dioxide: Experiments and Modeling.** Ind. Eng. Chem. Res., v.35, p.607-612, 1996.

- RUBINO, M. **Offshore Aquaculture in the United States: Economic considerations, Implications & Opportunities**. NOAA Technical Memorandum NMFS F/SPO-103. 263 f., Silver Spring, MD: U.S. Departamento of Commerce, 2008.
- Rubio-Rodríguez, N., De Diego, S.M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M.T., Rovira, J., **Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods**. J. Food Eng. N.109, p.238–248, 2012.
- Rubio-Rodríguez, N., de Diego, S.M., Beltrán, S., Jaime, I., Sanz, M.T., Rovira, J., **Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis*-*Merluccius paradoxus*) by-products: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality**. J. Supercrit. Fluids, n.47, p.215–226, 2008.
- RUDNICK, E.; SZCZUCINSKA, A.; GWARDIAK, H.; SZULC, A.; WINIARSKA, A. **Comparative studies of oxidative stability of linseed oil**. Thermochemica Acta, v.370, p.135-140, 2001.
- RUPÉREZ, F. J.; MARTÍN, D.; HERREAR, E.; BARBAS, C. **Chromatographic analysis of a-tocopherol and related compounds in various matrices**. Journal of Chromatography A. v.935, p. 45-69. 2001.
- SALDAÑA, M. D. A.; MARTÍNEZ-MONTEAGUDO S. I. **Oxidative Stability of Fats and Oils Measured by Differential Scanning Calorimetry for Food and Industrial Applications, Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry**. Dr. Amal Ali Elkordy (Ed.), 2013.
- SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K. TAN, Y. **Chemistry and biochemistry of palm oil**. Progress in lipid research. v.39, p.507-558, 2000.
- SANTOS, K. A.; **Extração do óleo de semente de Cambe (*Crambe abyssinica*) empregando propano subcrítico: caracterização do óleo e farelo**. Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Maringá, Toledo/PR, 2014, 121p, Dissertação (Mestrado)..
- SARGENT, J.R.; TOCHER, D. R.; BELL, J. G.. **The Lipids in fish Nutrition**. 3ed., Maryland Heights/MO, Cap 4, p. 181 – 257, 2002.
- SCHWARZ, C. E.; PAULSE, Q. H.; KNOETZE, J. H. **Phase equilibria of methyl esters in supercritical propane**. The Journal of Supercritical Fluids. v.99, p.61-67, 2015.
- SEGURA, J. G. **Extração e Caracterização de Óleos de resíduos de Peixes de Água doce**. Curso de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga/SP, 2012, 97p, Dissertação (Mestrado).
- SHEARE, M. J.; NEWMAN, P. **Metabolism and cell biology of vitamin k**. Schattauer GmbH, Stuttgart. 18 p., 2008.

- 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 (Portugal), v. 22, n. 1, p.94-103, 1998.
- SILVA, L.P.; MIYASAKA, C. K.; MARTINS, E. F.; LEITE, J. R. S. A.; LACAVAL, Z. G. M.; CURI, R.; AZEVEDO, R. B. **Effect of bullfrog (*Rana catesbeiana*) oil administered by gavage on the fatty acid composition and oxidative stress of mouse liver.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v.37, p.1491-1496, 2004.
- SIMON, P.; KOLMAN, L.; NIKLOVÁ, I; SCHIMIDT, S.; **Analysis of the Induction Period of Oxidation of Edible Oils by Differential Scanning Calorimetry.** Journal of the American Oil Chemists' Society. v.77, n.6, p.639-642, 2000.
- SIMOPOULOS, A. P. **Evolutionary aspects of ômega-3 fatty acids in the food supply.** The Center for Genetics, Nutrition and Health. Washington DC/USA, 2001. p.129-156.
- SIMONSON, W. **Vitamina E for Alzheimer's disease?.** Geriatric Nursing. Corvallis/OR USA, 2014. p.147-148.
- SINGH, J.; BARGALE, P. C. **Development of a small capacity double stage compression screw press for oil expression.** Journal of Food Engineering. 2000, n.43, p.75-82.
- SIRISHA, N.; SREENIVASULU, M.; SANGEETA, K.; MADHUSUDHANA, C. C. **Antioxidant Properties of Ficus species.** Review. International Journal of PharmTech Research. v.2, n.4, p. 2174-2182. 2010.
- SOCIEDADE NACIONAL DE AGRICULTURA. **Brasil é segundo na produção mundial de rãs.** Outubro, 2013. Disponível em: <<http://sna.agr.br/brasil-e-segundo-na-producao-mundial-de-ras/>>. Acessado em Setembro de 2015.
- SOVOVÁ, H. **Rate of the vegetable oil extractions with supercritical CO<sub>2</sub>- I. Modelling of extraction Curves.** Chemical engineering Science. v.49, n.3, p-409-414, 1994.
- STEFFANI E. **Modelagem Matemática do Processo de Extração Supercrítica de Óleo Essencial de Ho-Sho (*Cinnamomum camphora* Nees & Eberm var. *linaloolifera* Fujita) utilizando CO<sub>2</sub>.** Florianópolis: Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 92 p. Tese (Doutorado).
- SHERWIN, E. R.; **Oxidation and Antioxidants in Fat and Oil Processing.** Journal of the American Oil Chemists' Society. v.55, p.809-814. 1976

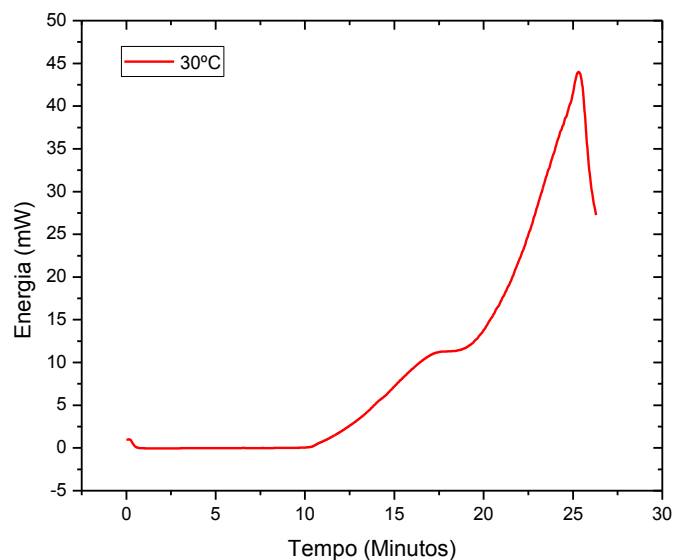


- SHREVE, R.N.; BRINK JR., J.A. **Indústrias de Processos Químicos**, 4ª Edição, Editora Guanabara, Rio de Janeiro, RJ, 1977.
- SUÁREZ-MAHECHA, H.; FRANCISCO, A.; BEIRÃO, L. H.; BLOCK, J. M.; SACCOL, A.; PARDO-CARRASCO, S. **Importância de ácidos graxos poliinsaturados presentes em peixes de cultivo e de ambiente natural para nutrição humana**. Boletim do Instituto de Pesca. São Paulo, v. 28, p. 101-110, 2002.
- SUN, T., XU, Z., PRINYAWIWATKUL, W. **FA composition of the oil extracted from farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) viscera**. JAOCS, J. Am. Oil Chem. Soc. n.83, p.615–619, 2006
- TAKASE, H. **Metabolismo f dacylycerol in humans**. Asia Pac. J. Clin. Nutr. v.16, n.1, p.398-403, 2007.
- TAN, C.; LIOU, D. **Modeling of desorption at Supercritical Conditions**. AIChE Journal. v.35, n.6, p.1029-1031. 1989.
- TAS, N. G.; GOKMEN, V. **Profiling triacylglycerolls, fatty acids, and tocoferol in hazelnut varieties grown in Turkey**. Journal of food composition and analysis. v.44, p.115-121, 2015.
- TRABER, M. G.; SIES, H. **Vitamin E in humans: Demand and Delivery**. Review. Rev. Nutr. University of California, Berkeley. v.16, p.321-347, 1996.
- TUTER, M.; AKSOY, H. A. **Solvent-free glycerolysis of palm and palm kernel oils catalyzed by comercial 1,3-specific lipase from *Humicola Lanuginosa* and composition of glycerolysis products**. Biotechnology Letters. v.22, p.31-34, 2000.
- UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA. **Laboratório de Ranicultura e Produtos da Aquicultura**. Disponível em: < <http://www.cchsa.ufpb.br/ranicultura/>>. Acessado em Junho de 2015.
- URIBE. J. A. R.; PEREZ, J. I. N.M; KAUIL, H. C.; RUBIO, G. R.; ALCO CER, C. G.; **Extraction of oil from chia seeds with supercritical CO<sub>2</sub>**. The Journal of Supercritical Fluids, v.56, p.174-178, 2011.
- VACLAVIK, V. A.; CHRISTIAN, E. W. **Essentials of food science**. 4 ed. New York: Springer, 2014.
- VALDEZ, C. C.; LOPEZ, C. Y.; SCHWARTZ, S.; BULUX, J.; SOLOMONS, N. W. **Sweet potato buds: the origins of a “designer” food to combat hypovitaminosis A in Guatemala. Processing, vitamin A content and preservation characteristics**. Nutrition Research. v.21, p.61-70, 20001.
- VANDAMME, J.; NIKIFOROV, A.; DUJARDIN, K.; LEYS, C.; COOMAN, L.; DUMER, J. V. **Critical evaluation of non-thermal plasma as na innovative accelerated lipid oxidation technique in fish oil**. Foor Research internationa. v.72, p.115-125, 2015.
- WANG, C.; HARRIS, W. S.; CHUNG, M.; LICHTENSTEIN, A. H.; BALK, E. M.; KUPELNICK, B.; JORDAN, H. S.; LAU, J.; **n<sub>3</sub> Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not <sub>-</sub>linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes**

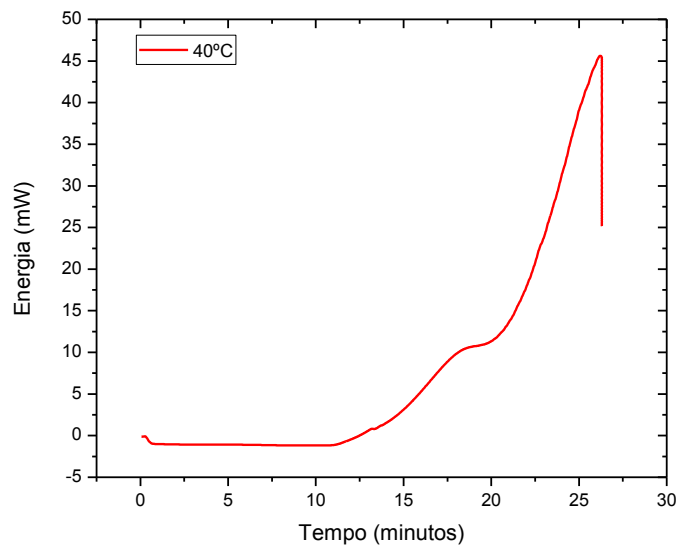
- in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review.** The American Journal of Clinical Nutrition. v.84, p.5-17, 2006.
- WENDLANDT, W. W.; **Thermal Analysis.** Third Edition, John Wiley & Sons, New York, 1986.
- WOJCICKI, K.; KHMELINSKII, I.; SIKORSKI, M.; SIKORSKA, E. **Near and mid infrared spectroscopy and multivariate data analysis in studies of oxidation of edible oils.** Food Chemistry, v.187, p.416-423, 2015.
- WRIGHT, M. L.; RICHARDSON, S. E.; BIGOS, J. M. The fat body of bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) tadpoles during metamorphosis: **Changes in mass, histology, and melatonin content and effect of food deprivation.** Comparative Biochemistry and Physiology. v.160, p.498-503, 2011.
- ZANCANARO, C.; MERIGO, F.; DIGITO, M.; PELOSI, G. **Fat Body of the Frog *Rana esculenta*: An Ultrastructural Study.** Journal of Morphology, v.227, p.321-334, 1996.

## APÊNDICE A

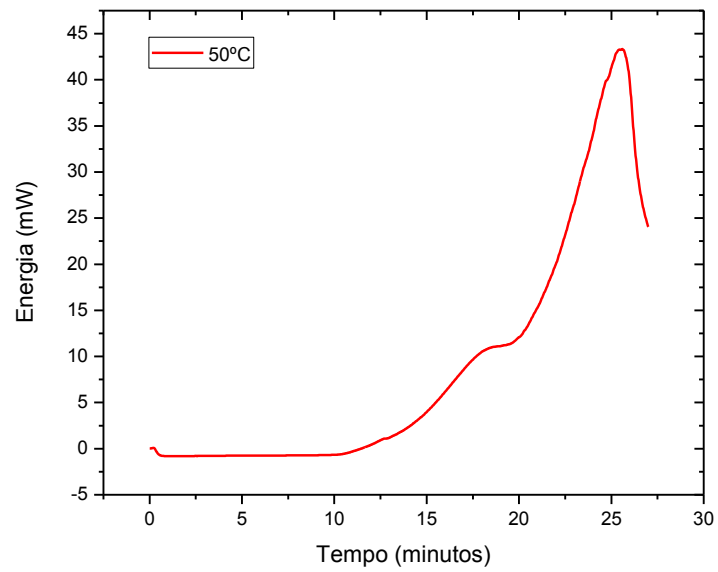
Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido pelo método de extração por prensagem em diferentes temperaturas submetido ao fluxo de oxigênio de  $50\text{ml min}^{-1}$



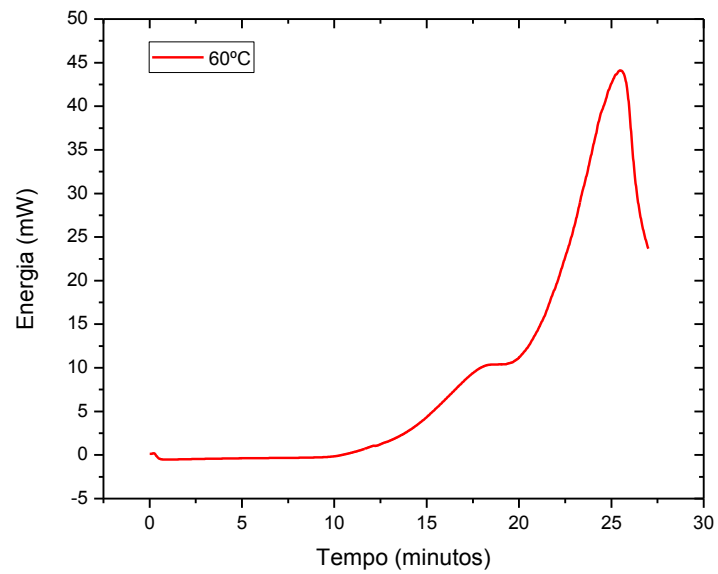
**Figura A.1** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 30°C submetido ao fluxo de oxigênio de  $50\text{ mL min}^{-1}$



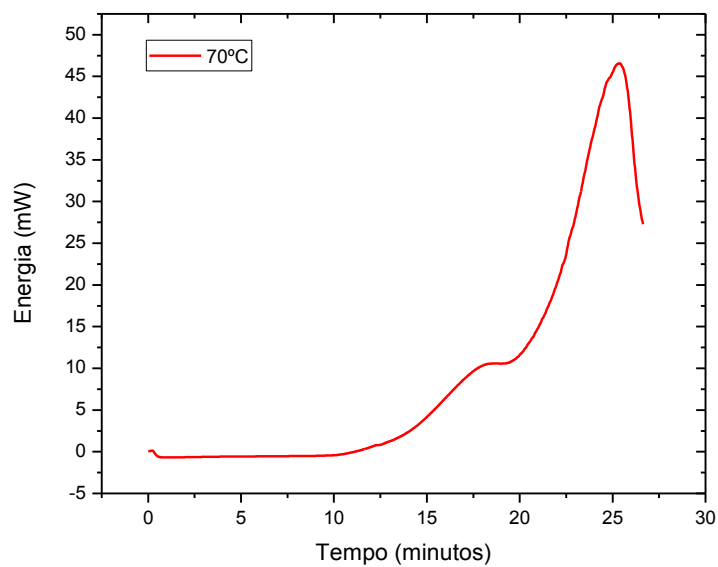
**FIGURA A.2** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 40°C submetido ao fluxo de oxigênio de  $50\text{ mL min}^{-1}$



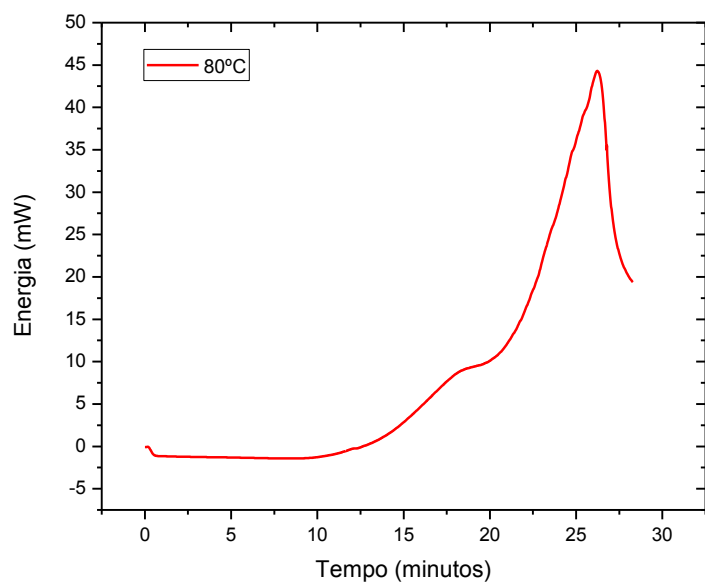
**Figura A.3** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 50°C submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>



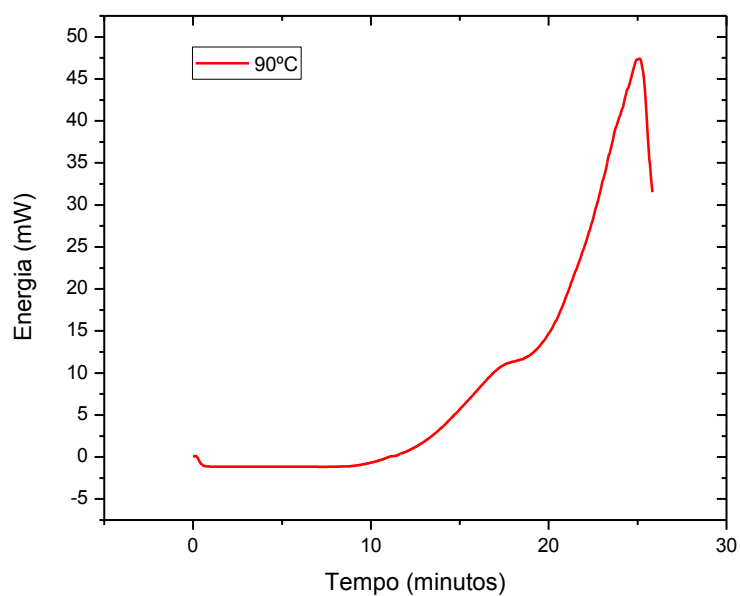
**FIGURA A.4** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 60°C submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>



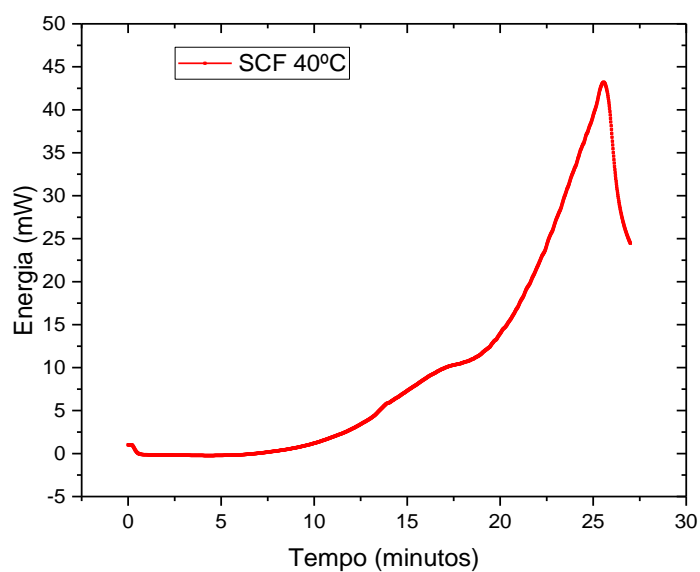
**Figura A.5** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 70°C submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>



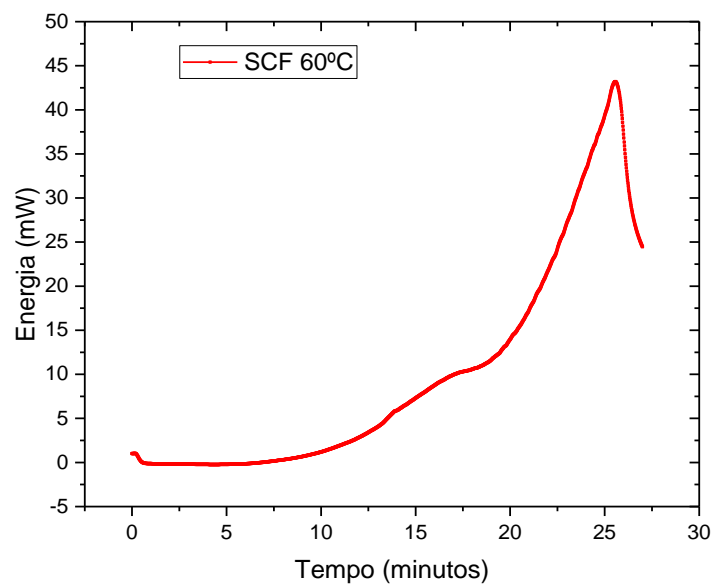
**Figura A.6** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 80°C submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>



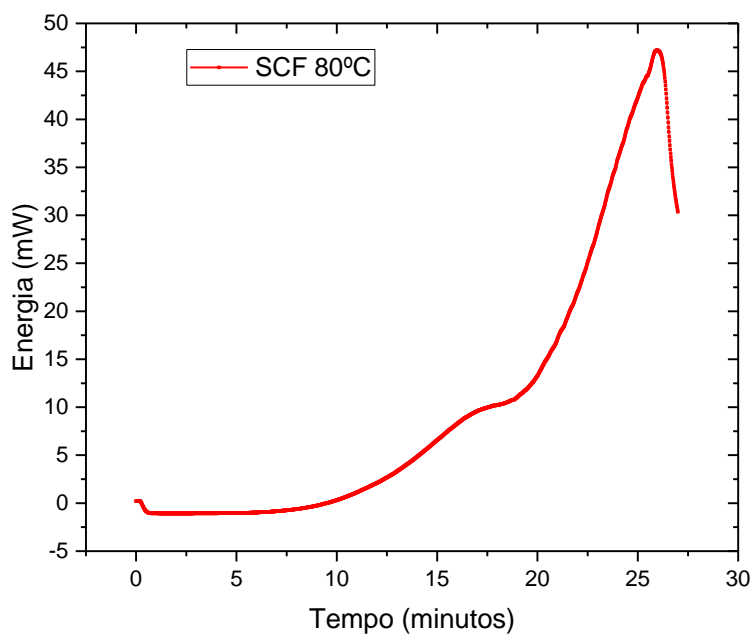
**Figura A.7** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 90°C submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>



**Figura A.8** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração supercrítica a 40°C e 150 Bar submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>



**Figura A.9** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração supercrítica a 60°C e 150 Bar submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>



**Figura A.10** - Curva de estabilidade oxidativa não-isotérmica do óleo de rã-touro obtido por extração supercrítica a 80°C e 150 Bar submetido ao fluxo de oxigênio de 50 mL min<sup>-1</sup>

## ANEXO A

Na Tabela A.1 são apresentados alguns exemplos de ácidos graxos.

**Tabela A.1** – Exemplo de ácidos graxos.

Abreviação	Fórmula estrutural	Nome sistemático	Nome Comum
12:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	Ácido n-dodecanóico	Ácido Láurico
14:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	Ácido n-tetradecanóico	Ácido Mirístico
16:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	Ácido n-hexadecanóico	Ácido Palmítico
18:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	Ácido n-octadecanóico	Ácido Estéarico
20:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	Ácido n-eicosanóico	Ácido araquídico
24:0	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{23}\text{COOH}$	Ácido n-tetracosanóico	Ácido Lignocérico
16:1 ( $\Delta^9$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido cis-9-hexadecenóico	Ácido Palmitoléico
18:1 ( $\Delta^9$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	Ácido cis-9-octadecenóico	Ácido Oléico
18:2 ( $\Delta^{9,12}$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CHOOH}$	Ácido cis-, cis-9, 12 - octadecadienóico	Ácido Linoléico
18:3 ( $\Delta^{9,12,15}$ )	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CHOOH}$	Ácido cis-, cis-, cis-9, 12, 15 -octadecatrienóico	Ácido $\alpha$ -Linolênico
20:4 ( $\Delta^{5,8,11,14}$ )	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{CHOOH}$	Ácido cis-, cis-, cis-, cis-5, 8, 11, 14 -icosatetraenóico	Ácido Araquidônico

\* Todos os ácidos têm suas formulas apresentadas na forma não ionizada.  
 \* O prefixo “n” indica uma estrutura na forma linear e não ramificada.  
 Fonte: NELSON E COX (2002)



## ANEXO B

### PRÉ-SECAGEM DE AMOSTRAS DE CORPO GORDUROSO PARA ANÁLISES DE QUANTIDADE DE PROTEÍNA.

#### B.1 Definição

Todos alimentos contêm água, seja em menor ou maior quantidade. Geralmente a umidade representa a água contida no alimento, classificada em água livre e água ligada. A primeira representa a umidade de superfície, aquela que é facilmente evaporada por estar na superfície do alimento. Já a segunda, representa a umidade absorvida e encontrada no interior do alimento, sem combinar quimicamente com o mesmo (LUTZ, 2008).

#### B.2 Método

Colocou-se placas de petri na estufa por aproximadamente 2 horas a 105°C. Colocou-se as placas de petri para resfriar em dessecador até temperatura ambiente. Pesou-se 20 g de corpo gorduroso *in natura*. Levou-se as placas de petri com amostras em estufa com ventilação forçada de ar por 72 horas a 55°C. Retirou-se as placas da estufa e colocou-se em dessecador até temperatura ambiente. Coletou-se as amostras, triturou-se em almofariz de pistilo e armazenou-se em recipientes fechados e devidamente identificado.

## ANEXO C

### PREPARO DAS SOLUÇÕES E PADRONIZAÇÃO DE REAGENTES PARA ANÁLISES DE ÍNDICE DE ACIDEZ

#### C.1 Preparo das soluções.

##### C.1.1 Solução de Éter etílico – Álcool etílico

Mistura-se 2 partes de éter etílico com 1 parte de álcool etílico, onde esta solução deve ser preparada momentos antes do uso.

##### C.1.2 Solução para titulação de hidróxido de sódio 0,1M

Pesa-se 4 g de hidróxido de sódio, em um béquer dissolver em água destilada em balão volumétrico de 1000 mL com água destilada recentemente fervida e resfriada

##### C.1.3 Solução de volumétrica padronizada de NaOH 0,1M

Pesa-se aproximadamente quatro gramas de hidróxido de sódio em um béquer, dissolver com água destilada. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume e homogeneizar.

#### C.2 Padronização

Para a padronização dos reagentes, pesa-se aproximadamente 0,400 gramas de Biftalato de Potássio, com peso molecular de  $204,22 \text{ g mol}^{-1}$ , seco em estufa a  $105^\circ\text{C}$  por 3 horas. Transfere-se para um erlenmeyer de 250 mL, dissolva-se com 75 mL de água destilada quente, ao esfriar a temperatura ambiente adiciona-se 4 gotas fenolftaleína a 1% e titula-se com solução de hidróxido de sódio 0,1M até o aparecimento de uma coloração persistente.

Para o cálculo da molaridade real da solução utiliza-se a Equação (C.1).

$$FC = \frac{P}{0,2042 V M} \quad (\text{C.1})$$

Onde:

P = Peso em gramas de biftalato de potássio usado na titulação.

M = Molaridade da solução.

V = Volume de NaOH gasto na titulação, em mL

## ANEXO D

### PREPARO DAS SOLUÇÕES E PADRONIZAÇÃO DE REAGENTES PARA ANÁLISES DE ÍNDICE DE PERÓXIDO

#### D.1 Preparo das soluções

##### D.1.1 Solução de Ácido Acético - Clorofórmio

Mistura-se 3 partes de ácido acético com 2 partes de clorofórmio.

##### D.1.2 Solução indicadora de Amido

Pesa-se 1 g de amido p.a. e transfere-se para um béquer de 250 mL. Adiciona-se 50 mL de água destilada e aquece até a ebulição. Esfria-se até temperatura ambiente. Transfere-se para um balão volumétrico de 100 mL e completa-se o volume com água destilada até a homogeneização.

##### D.1.3 Solução de Iodeto de Potássio Saturada

Adiciona-se 20 mL de água destilada fervida e fria em um béquer de 50 mL e adiciona-se continuamente KI p.a. até o ponto de saturação.

##### D.1.3 Solução de volumétrica padronizada de NaOH 0,1M

Pesa-se aproximadamente 4 gramas de hidróxido de sódio em um béquer, dissolver com água destilada. Transferir quantitativamente para balão volumétrico de 1000 mL e completar o volume e homogeneizar.

#### D.2 Padronização

Para a padronização da solução de tiosulfato de sódio 0,01M pesa-se 2,482g de tiosulfato de sódio p.a. previamente seco em estufa a 105°C por 2 horas. Dissolva-se em béquer com aproximadamente 100 mL de água destilada, fervida e resfriada a temperatura ambiente. Transfere-se quantitativamente para o balão volumétrico de 1000 mL e completasse o volume com a água destilada fervida e resfriada a temperatura ambiente. Homogeneíza-se e estoca-se em frasco âmbar.

Após o procedimento anterior, pesa-se exatamente 0,200 g de dicromato de potássio p.a. previamente seco em estufa a 105°C por 2 horas. Dissolva-se em béquer com aproximadamente 50 mL de água destilada, fervida e resfriada a temperatura ambiente, transfere-se quantitativamente para balão volumétrico de 200 mL, completa-se o volume com água destilada, fervida e resfriada a temperatura ambiente e homogeneíza-se. Pipeta-se 10 mL da solução de dicromato de potássio e transfere-se para erlenmeyer de 250 mL com tampa. Acrescenta-se aproximadamente 70 mL de água destilada, fervida e resfriada a

temperatura ambiente. Adiciona-se 2 g de KI e solubiliza-se. Adiciona-se 20 mL de ácido clorídrico 1 m. Tapa-se o erlenmeyer e o aguarde imediatamente ao abrigo de luz por 10 minutos. Acrescenta-se 1 mL da solução indicadora de amido 1%. Titula-se gotejando a solução de tiosulfato de sódio 0,01M até o desaparecimento da coloração azul.

Para o cálculo do fator de correção (padronização) utiliza-se a Equação (D.1).

$$FC = \frac{P}{49 V M} \quad (D.1)$$

Onde:

P = Peso do dicromato de potássio a alíquota, em mg.

M = Molaridade da solução de tiosulfato de sódio.

V = Volume gasto da titulação.

FC = Fator de correção.

49 = Unidade molar do dicromato de potássio (g/mol)

# ANEXO E

Cromatogramas de ambas análises de cromatográfica gasosa acoplada com espectro de massa.

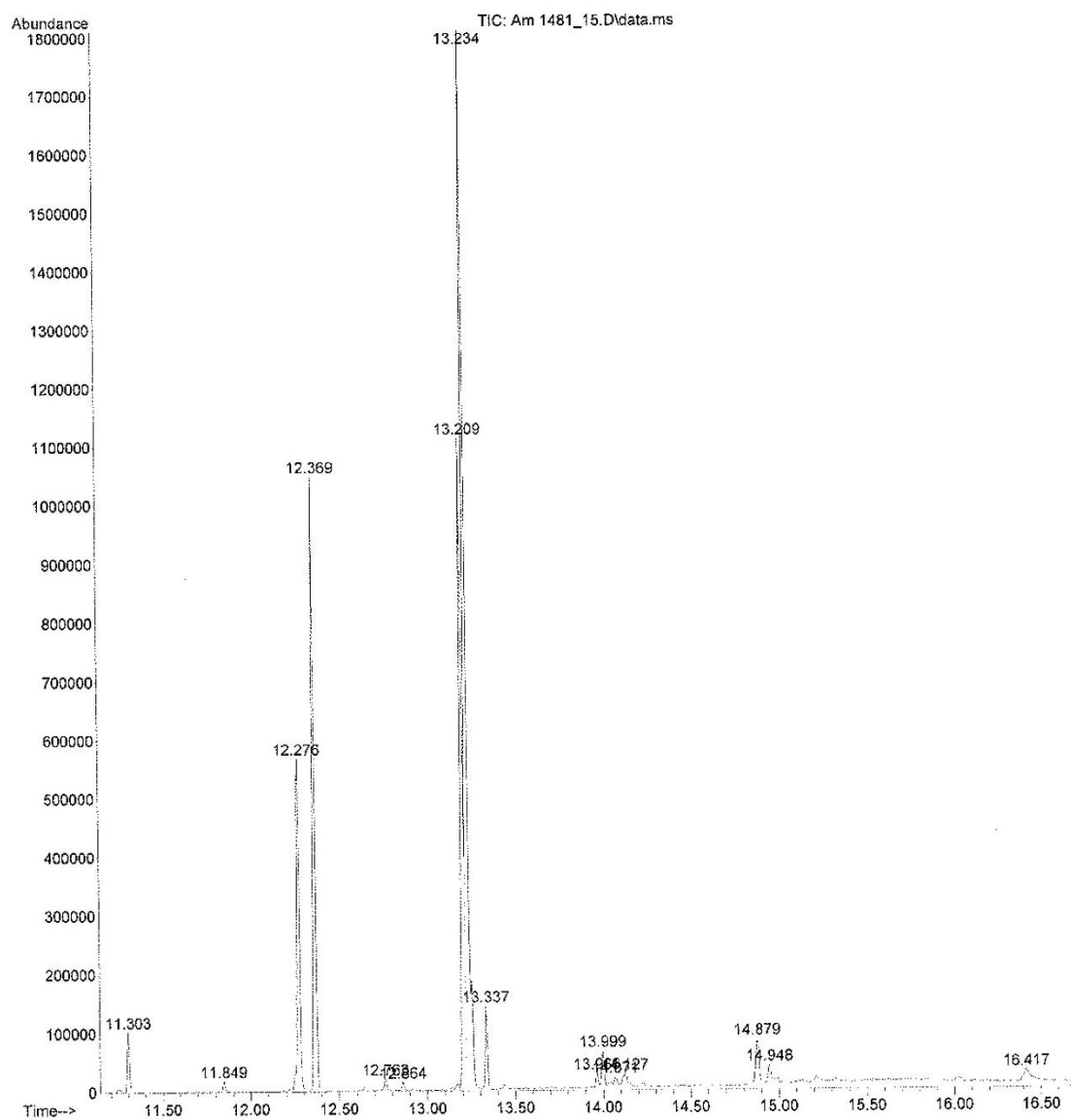
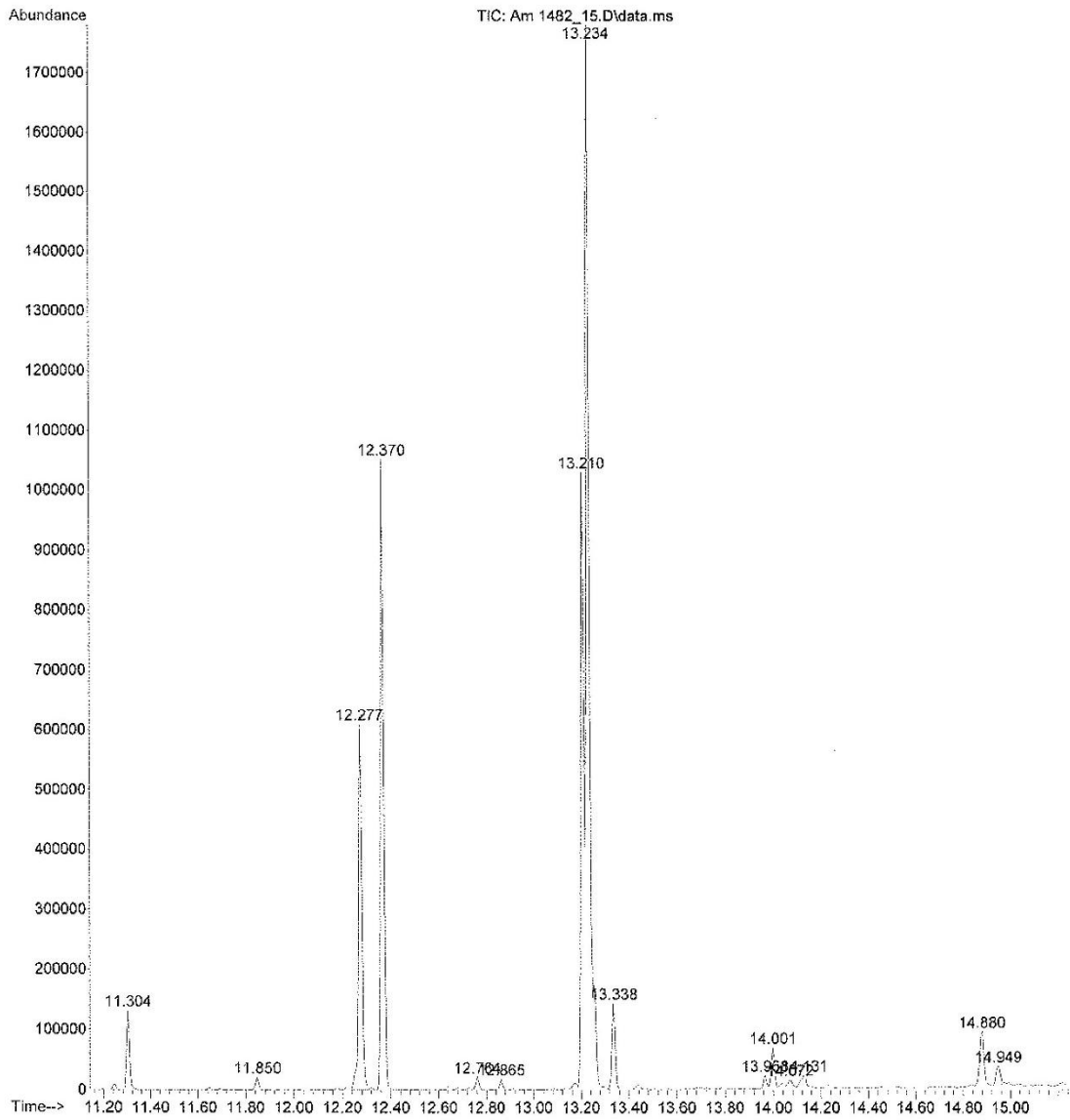


Figura E.11 – Cromatograma do óleo de rã-touro obtido por extração mecânica a 40°C



**Figura E.12** - Cromatograma do óleo de rã-touro obtido por extração supercrítica a 80°C e 150 Bar.