



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE TECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DAYENE LOUYSE LÍRIO DANTAS

BLENDS DE ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU E ÓLEO DE
LINHAÇA: PERFIL DE ÔMEGA-3, PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS E ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA

JOÃO PESSOA - PB

2018

DAYENE LOUYSE LÍRIO DANTAS

BLENDS DE ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU E ÓLEO DE
LINHAÇA: PERFIL DE ÔMEGA-3, PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS E ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA

JOÃO PESSOA - PB

2018

DAYENE LOUYSE LÍRIO DANTAS

BLENDS DE ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU E ÓLEO DE
LINHAÇA: PERFIL DE ÔMEGA-3, PROPRIEDADES FÍSICO-
QUÍMICAS E ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos, Centro de
Tecnologia, Universidade Federal da
Paraíba, em cumprimento aos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora - Prof.^a Dra. Antônia Lúcia de Souza

JOÃO PESSOA - PB

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

D192b Dantas, Dayene Louyse Lirio.
BLENDS DE ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU E ÓLEO DE LINHAÇA:
PERFIL DE ÔMEGA-3, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E
ESTABILIDADE TERMO-OXIDATIVA / Dayene Louyse Lirio
Dantas. - João Pessoa, 2018.
67 f.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/de Tecnologia.

1. blends de óleos. 2. propriedades funcionais. 3.
ômega-3. 4. estabilidade oxidativa. I. Título

UFPB/BC

DAYENE LOUYSE LÍRIO DANTAS

BLENDS DE ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU E ÓLEO DE LINHAÇA: PERFIL DE
ÔMEGA-3, PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E ESTABILIDADE TERMO-
OXIDATIVA

DISSERTAÇÃO aprovada em 05/04/2018

BANCA EXAMINADORA

Antonia Lucia de Souza

Prof.^a Dra. Antônia Lucia de Souza

Presidente da banca Examinadora

Jailane de Souza Aquino

Prof.^a Dra. Jailane de Souza Aquino

Membro externo

Graciele da Silva C. Borges

Prof.^a Dra. Graciele da Silva Campelo Borges

Membro interno

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que é a inteligência suprema do universo, o equilíbrio entre todas as forças da natureza. Sem Ele eu não estaria aqui.

À minha família, em especial, aos meus pais Jessenei Marta e José Dênio, que me ensinaram os princípios de humildade, perseverança, fé e gratidão. Sou imensamente grata pelo apoio que vocês me dão em todas as minhas decisões, por sonhar meus sonhos junto comigo. E a minha irmã Beatriz que, com seu jeitinho discreto, sempre vibra junto comigo minhas conquistas. Amo vocês!

À minha orientadora, Dra. Antônia Lúcia, por ter acolhido essa potiguar desconhecida com tanto respeito e dedicação. Cheguei no mestrado sem saber o que me esperava e encontrei uma professora que não mede esforços para ajudar o aluno a conseguir vencer. Obrigada pelo apoio, pela compreensão nos momentos difíceis, pelos desafios propostos, por ter me ensinado tanto! Trabalhar contigo me proporcionou crescimento profissional e pessoal.

À minha amiga, Andreza Moraes, companheira no desbravamento no mundo da química orgânica. Obrigada pelos muitos momentos compartilhados nesses dois anos: estudo, cansaço, medo, alegria e fé.

Aos meus amigos do LACOM, Fernando, Dona Jô, Gabrielly, Túlio, Rodrigo, Fernanda, Maristela, Anderson, Lorena, Renata, Jackson, Raquel, Izabela, Elizeu, Kelvy e Conceição, pelo convívio diário no laboratório, tornando o ambiente harmonioso e agradável de trabalhar. Também agradeço pela ajuda em alguns momentos de apertados nas minhas análises.

À profa^a Dra. Neide Queiroz pelas contribuições na escrita do artigo final da dissertação, bem como no apoio durante o processo seletivo do doutorado.

À minhas amigas, Aline, Camila, Elaine, Thayse e Winnie. Deus foi muito generoso em nos presentear com esse encontro na vida acadêmica, que se estendeu para a vida pessoal! Obrigada pela amizade de vocês!

As queridas professoras de graduação, Katya Anaya e Dinara Leslye que sempre acreditaram no meu potencial e me incentivaram a fazer o processo seletivo de mestrado.

À Universidade Federal da Paraíba (UFPB), especialmente a todos que compõem o Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Aos membros da banca, pelas contribuições e sugestões pertinentes na construção deste trabalho.

Aos colegas da turma de mestrado 2016.1, com os quais tive a satisfação de cursar as disciplinas e compartilhar momentos de aprendizado.

A todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste sonho que hoje se torna realidade e que torcem pelo meu sucesso, muito obrigada.

RESUMO

O óleo de fígado de bacalhau (OFB) e o óleo de linhaça (OL) são considerados alimentos funcionais pelo fato de conter quantidades elevadas de ômega-3. Enquanto OFB contém ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa, tais como ácido docosahexaenóico (DHA) e o ácido eicosapentaenoico (EPA), OL constitui uma das maiores fontes do ômega-3 α -linolênico (ALA), o qual pode ser convertido em EPA e DHA no organismo humano. Além dos ácidos graxos essenciais mencionados, OFB também é rico em vitamina D, sendo por isso indicado no tratamento de doenças como raquitismo e osteoporose. No presente estudo foram preparados *blends* contendo OFB e OL, em diferentes proporções dos dois óleos, objetivando obter novos óleos compostos com estabilidade oxidativa e perfil de ômega-3 melhorados. Os perfis de ácidos graxos dos óleos e *blends* foram determinados por Cromatografia Gasosa acoplada ao espectrômetro de massa (CG-EM) e de acordo com análise dos cromatogramas, CLO apresentou 22,59% de ômega-3, sendo 15,46% de EPA, 3,10% de DHA e 4,03% de ALA, enquanto LO apresentou 51,70% de ômega-3 ALA. O teor de ômega-3 nos *blends* variou de 26,11 a 46,53%, com EPA variando de 2,55 a 10,17%, e DHA de 1,28 a 3,10%. O percentual de ALA variou de 13,28 a 42,86%, e o blend com maior teor de ômega-3 foi BLE4 (20%CLO80%LO). Considerando os possíveis erros da CG-EM, o perfil graxo de CLO, LO, e *blends*, também foi avaliado por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H), uma técnica perfeitamente adequada à quantificação de ômega-3 em óleos e gorduras. Nesta técnica CLO apresentou 23,02% molar de ômega-3, sendo 10,12% molar de EPA e 12,90 % de DHA, e traços não mensuráveis de ALA. Para LO foi observado 52,2% molar de ALA, não sendo detectado EPA nem DHA, uma vez que estes não são encontrados em óleos vegetais. O perfil de ômega-3 nos *blends* variou de 27,94 a 46,45% molar e BLE4 foi o blend com maior teor de ômega-3, em concordância com os dados da CG-EM. Na avaliação da estabilidade oxidativa, método Rancimat, a 68 °C, CLO apresentou período de indução de $12,32 \pm 0,24$ h e LO apesar de conter maior percentual de ômega-3 foi mais estável ($26,46 \pm 0,07$ h). Os *blends* apresentaram maior estabilidade do que CLO, sendo BLE4 a mais estável ($23,12 \pm 12$ h), não havendo diferença significativa com o resultado obtido para BLE3 ($21,80 \pm 0,05$ h) em ($p < 0,05$). O estudo do perfil térmico de CLO e LO também foi feito empregando a Análise Termogravimétrica (TG) e de acordo com as curvas (TG/TGA) os óleos exibiram perfil térmico similar com temperatura *onset* de 303,20 °C e 305,16 °C respectivamente para a primeira etapa de perda de massa. A predição de vida de prateleira dos óleos e *blends*,

avaliada em 10 dias de estocagem nas condições do teste de Schaal, empregando espectroscopia de infravermelho (IV) indicou que durante o período de estocagem houve um aumento expressivo na quantidade de peróxidos em LO, indicando início do processo de degradação oxidativa. Em CLO, embora tenha sido evidenciado um decréscimo nos sinais de peróxidos, foi observado processo de isomerização, mostrando, que também ocorreu degradação do óleo. Nos *blends* foi observado processos de isomerização, com observação de bandas indicativas de ligações *trans*, porém não foram observados produtos da oxidação secundária nas amostras. Estes dados sugerem que CLO, LO e *blends*, devem ser estocados à temperaturas inferiores 60 °C durante o período de estocagem, para que as propriedades funcionais sejam preservadas.

Palavras chave: *blends* de óleos, propriedades funcionais, ômega-3, estabilidade oxidativa.

ABSTRACT

Cod liver oil (CLO) and linseed oil (LO) are considered functional foods for containing high quantities of omega-3. While CLO contains long chain polyunsaturated fatty acids, as docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA), LO is considered as one of the biggest α -linolenic omega-3 (ALA) sources, which can be converted in EPA and DHA in the human organism. Beyond the fatty acids mentioned, CLO is also rich in D vitamin, being therefore indicated for the treatment of diseases such as rickets and osteoporosis. In this present study, blends containing CLO and LO were prepared in two different proportions of the two oils, with the aim of getting new compound oils with oxidative stability and omega-3 profile improved. The profile of fatty acids in the oils and blends were evaluated by Gas Chromatography Coupled to the Mass Spectrometer (GC-ME), and according to the chromatograms, CLO showed 22,59% of omega-3, 15,46% of EPA, 3,10% of DHA, 4,03% of ALA, whilst LO showed 51,70% of omega-3 ALA. The omega-3 content in the blends varied from 26,11 to 46,53% with EPA varying from 2,55 to 10,17%, and DHA from 1,28 to 3,10%. The ALA percentage varied from 13,28% to 42,86%, and the blend with highest omega-3 content was BLE4 (20%CLO80%LO). Considering possible mistakes on the GC-ME technique, the fatty acid profile of CLO, LO and blends, was also evaluated by Hydrogen Nuclear Magnetic Resonance (NMR ^1H), a perfectly adequate technique for omega-3 quantification in oils and fats. In this technique CLO showed 23,02% molar of omega-3, which 10,12% molar corresponds to the EPA, 12,90% to the DHA, with non-measurable traces of ALA. For LO was observed 52,2% molar of ALA. EPA and DHA was not detected, since these fatty acids are not found in vegetable oils. The omega-3 profile in the blends varied from 27,46 to 46,45% molar, BLE4 showed highest omega-3 content among the other blends, in agreement with GC-ME data. In the evaluation of oxidative stability, Rancimat method, in 68 °C, CLO showed $12,32 \pm 0,24$ h of induction period and LO, even though containing higher omega-3 percentage ($26,46 \pm 0,07$ h). The blends showed more stability than CLO, being BLE4 the most stable ($23,12 \pm 12$ h), not having significant difference with the result obtained for BLE3 ($21,80 \pm 0,05$ h) in ($p < 0,05$). The study of thermic profile of CLO and LO were also evaluated by Term gravimetric Analysis (TG) and according to TG/TGA curves, the oils displayed similar thermic profile with onset temperature of 303,20 °C and 305,16 °C, respectively, for the first step of mass loss. The prediction of shelf life for the oils and blends, evaluated in 10 days of stocking in Schaal test conditions, employing

infrared spectroscopy (IR), indicated that during the stocking period there was an expressive increase in peroxides quantities, denoting the start of oxidative degradation process. In CLO, although it has also been evidenced a decrease in the signal of the peroxides, was observed an isomeration process, showing that also occurred degradation in the oil. Isomeration processes was observed in the blends, through observation of indicative bands of Trans bounds, though were not observed oxidative secondary products in the samples. These data suggests that CLO, LO and blends must be stocked in temperatures below 60 °C during the stocking process, in order that functional properties be preserved.

Keywords: blends of oils, functional properties, omega-3, oxidative stability

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido α -linolênico
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOCS	<i>American Oil Chemists' Society</i>
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massa
DHA	Ácido docosahexaenoico
DPA	Ácido docosapentaenoico
DTA	Análise Térmica Diferencial
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
CLO	<i>Cod liver oil</i>
LO	<i>Linseed oil</i>
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
OL	Óleo de linhaça
OFB	Óleo de Fígado de Bacalhau
PI	Período de Indução
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
TAG	Triglicerídeo
TG	Termogravimetria

LISTA DE SÍMBOLOS

$\omega-3$	Ômega-3
$\omega-6$	Ômega-6
$\omega-9$	Ômega-9
α	Alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura dos ácidos graxos essenciais	23
Figura 2 - Esquema do mecanismo da auto-oxidação lipídica	29
Figura 3 - Etapas do desenvolvimento experimental deste estudo	31

ARTIGO

Figure 1 - ¹ H NMR spectra of cod liver oil (CLO) and linseed oil (LO) recorded in CDCl ₃	57
Figure 2 - Partial ¹ H NMR spectra of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl ₃ . The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8).	58
Figure 3 - Fourier transform infrared spectra of the CLO and LO sample	59
Figure 4 - Partial ¹ H NMR spectra of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl ₃ . The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The red line matches the unheated sample	63
Figure 5 - Partial FTIR of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl ₃ . The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The black line matches the unheated samples, red	64
Figure 6 - Partial FTIR of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl ₃ . The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The black line matches the unheated samples, red.	64
Figure 7 - Partial infrared spectra of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl ₃ . The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The black line matches the unheateds.	65

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Resumo das avaliações realizadas por órgãos internacionais sobre os limites de segurança da ingestão de EPA e DHA.	25
Tabela 2 - Formulações dos blends com óleo de fígado de bacalhau (OFB) e óleo de linhaça (OL)	34

ARTIGO

Table 1 - Acid and iodine values of linseed oil, cod liver oil and blends.	52
Table 2 - Fatty acid profile of CLO, LO e blends por GC-MS.....	54
Table 3 - Composition parameters of Cod Liver Oil, Linseed Oil and blends obtained from ¹ H NMR.	56
Table 4 - Induction period (IP) of the LO, CLO and blends by the Rancimat method 68 °C. 60	

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS	21
3.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS.....	22
3.3 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3	24
3.3.1 Consumo e recomendação do ácido graxo ômega-3.....	25
3.4 ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU E ÓLEO DE LINHAÇA COMO FONTE DE ÔMEGA-3	26
3.5 PARÂMETROS DE ESTABILIDADE DOS ÓLEOS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3	27
4 MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1 REAGENTES E SOLVENTES	31
4.2 ÓLEOS.....	32
4.3 PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS.....	32
4.3.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS)	32
4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ¹H)	33
4.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	33
4.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	33
4.4.1 Índice de acidez e índice de iodo	33
4.5 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E TÉRMICA.....	33
4.6 FORMULAÇÕES DOS <i>BLENDS</i>	34
4.7. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS BLENDS	35
4.8. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DOS BLENDS.....	35
4.9. PRECONIZAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA	35
5 RESULTADOS	45
5.1 ARTIGO	45

1 INTRODUÇÃO

Os lipídios são macronutrientes essenciais ao bom funcionamento do organismo humano. São componentes da membrana celular, participam da formação e do desenvolvimento do cérebro, têm função de isolante térmico e atuam como reserva energética, entre outras funções no organismo (BARBOSA; SINIOSSOGLU, 2017). Um considerável número de estudos tem mostrado que o alto consumo de gorduras saturadas está associado a doenças cardiovasculares e obesidade (CARRILO et al, 2011; HARIRI; GOUGEON; THIBAUT, 2010; HOWARD et al, 2006). Por outro lado, pesquisas têm revelado que a ingestão regular de ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) está relacionada a diversos benefícios à saúde (HONGJIAN et al., 2013; INNIS, 2005; MONNIER; COLETTE, 2011; VIZUETE, 2013; VALENTIM-SILVA, 2014).

Nas pesquisas empregadas em relação ao consumo adequado de AGPI para os diferentes ciclos de vida e para as diversas enfermidades, os dados têm revelado que a suplementação de ômega-3 (ω -3) na gravidez contribui positivamente para a formação e desenvolvimento cerebral do feto, bem como na prevenção do surgimento de doenças neurodegenerativa. A ingestão de alimentos ricos em ômega-3 também está associada ao controle e prevenção da síndrome metabólica, conjunto de doenças caracterizado por estar associado à hiperinsulinemia, resistência à insulina, obesidade, distúrbios lipídicos e hipertensão, doenças coronarianas, diabetes tipo 2, Doença de Alzheimer e de doenças inflamatórias, como asma e artrite (AL-NOZHA et al, 2016; AKERELE; CHEEMA, 2016; HONGJIAN et al., 2013; SICIŃSKA et al, 2015; YATES; CALDER; ED RAINGER, 2014; WU et al, 2015).

Os principais ácidos graxos da família ômega-3 são o ácido α -linolênico (ALA, C18:3, n-3), o ácido eicosapentaenoico (EPA, C20:5, n-5) e o ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6, n-6). ALA está presente em fontes vegetais, como óleo de linhaça e óleo de chia. Já os ácidos DHA e EPA são encontrados em alimentos de origem animal, como os óleos de peixe e de fígado de bacalhau (GUILLÉN, 2008; HU; JACOBSEN, 2016; JORGE, 2009;).

O óleo de fígado de bacalhau há décadas é considerado um medicamento, sendo considerado eficaz no tratamento de doenças como a tuberculose e o raquitismo. Reportando aos conceitos de nutracêutico e de alimentos funcionais, o óleo passou a ser considerado como suplemento nutricional por ser uma fonte tanto das vitaminas lipossolúveis A e D como dos ácidos EPA e o DHA (LENTJES, 2014). O óleo é comercializado em cápsulas, na forma de emulsões e aditivado com saborizantes como geleia real e suco de laranja.

O óleo de linhaça, por sua vez, é considerado uma das principais fontes vegetais do ALA, contendo cerca de 50% deste ácido graxo. É facilmente encontrado no comércio tanto em cápsula como na forma líquida, sendo amplamente utilizado como alimento funcional, no tratamento de pré-diabéticos e atividade contra células tumorais (DIKSHIT; HALES; HALES, 2017; HUTCHINS et al, 201; KOSTIK, MEMETI, & BAUER, 201; LIANG et al., 2016; SIMOPOULOS, 2002).

Devido à presença de insaturações nas cadeias dos AGPI, os óleos de fígado de bacalhau e de linhaça são mais vulneráveis ao processo de auto-oxidação, podendo ter suas composições alteradas e comprometimento do valor nutricional durante a estocagem. Deste modo, tem-se buscado delinear estudos que não somente demonstrem os benefícios do ômega-3 no organismo humano, mas também que busquem alternativas tecnológicas para torná-los mais disponíveis e menos susceptíveis à oxidação.

Neste contexto, este estudo desenvolveu *blends* com o óleo de fígado de bacalhau e óleo de linhaça, a fim de obter óleos não processados com composição de ácidos graxos omega-3 e estabilidade oxidativa melhorada em relação aos óleos puros.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o uso do óleo de fígado de bacalhau e do óleo de linhaça na formulação de *blends* de óleos não processados, contendo diferentes proporções de ômega-3 e estabilidade oxidativa melhorada.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de ácidos graxos dos óleos de fígado de bacalhau e do óleo de linhaça;
- Determinar as propriedades físico-químicas do óleo de fígado de bacalhau e do óleo de linhaça;
- Analisar a estabilidade térmica e oxidativa dos óleos do óleo de fígado de bacalhau e do óleo de linhaça;
- Elaborar sete *blends* de diferentes proporções (m/m) do óleo de fígado de bacalhau e óleo de linhaça;
- Determinar o perfil de ácidos graxos dos *blends*;
- Avaliar o comportamento térmico e oxidativo dos *blends*;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS

De acordo com a Resolução nº 18 e nº 19 de 30 de abril de 1999, alimento funcional é “todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999). Ou seja, um alimento funcional deve levar benefícios a uma ou mais funções alvo no organismo, além de possuir os adequados efeitos nutricionais (ROBERFROID, 2002). Estes alimentos contêm moléculas biologicamente ativas, como estratégia para corrigir distúrbios metabólicos, resultando na redução dos riscos de doenças e manutenção da saúde (ANJO, 2004; WALZEM, 2004).

Desta forma, os alimentos funcionais devem apresentar as seguintes características: a) serem alimentos convencionais e consumidos na dieta normal/usual; b) Apresentar componentes naturais, algumas vezes, em concentração elevada; c) Ter efeitos positivos além do valor básico nutritivo, que pode aumentar o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental; d) Ter embasamento científico com relação à propriedade funcional; e) pode ser um alimento natural ou um alimento no qual um componente tenha sido removido; g) pode ser um alimento onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada; h) pode ser um alimento no qual a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada (ROBERFROID, 2002).

Os nutracêuticos, por sua vez, são alimentos ou parte de um alimento que proporciona benefícios médicos e de saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Tais produtos podem abranger desde os nutrientes isolados, suplementos dietéticos na forma de cápsulas e dietas até os produtos benéficamente projetados, produtos herbais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas (ANDLAUER & FÜRST, 2002; KWAK & JUKES, 2001a; ROBERFROID, 2002; HUNGENHOLTZ, 2002). Podem ser classificados como nutracêuticos: fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas antioxidantes e outros antioxidantes (glutathione, selênio) (ANDLAUER; FÜRST, 2002).

As razões que diferenciam significativamente os alimentos funcionais dos nutracêuticos é que, ao passo que a prevenção e o tratamento de doenças são relevantes aos nutracêuticos, apenas a redução do risco da doença (e não a prevenção e tratamento da doença) estão envolvidos com os alimentos funcionais. Outro ponto, diz respeito à forma como devem ser consumidos na dieta; enquanto que os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum (KWAK; JUKES, 2001b). Portanto, os nutracêuticos não podem ser verdadeiramente classificados como alimentos, sendo este termo criado pela *Foundation for Innovation in Medicine* dos Estados Unidos, em 1989/1990 com a junção dos termos “nutrientes” e “farmacêuticos” que definiu nutracêutico como: “Uma substância que pode ser um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios medicinais, incluindo prevenção ou tratamento de doenças” (GULATI; OTTAWAY, 2006).

3.2 ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS

Os lipídios são definidos quimicamente como compostos insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos, tais como etanol clorofórmio, hexano, entre outros. Os lipídios triglicerídeos presentes em óleos e gorduras são ésteres de ácidos graxos esterificados ao glicerol (FENEMMA, 2010). No organismo exercem a função de alimento, principalmente como fonte de energia, mas também como compostos bioativos que exercem propriedades funcionais. Os ácidos graxos podem apresentar de 4 a 36 átomos de carbono em sua cadeia, podendo ser saturados (apenas ligações simples na cadeia carbônica), monoinsaturados (uma dupla ligação carbono/carbono) ou poli-insaturados (duas ou mais duplas ligações carbono/carbono). A presença desta dupla ligação tem influência nas propriedades dos óleos e gorduras; pois quanto maior o número de insaturações, menor o ponto de fusão (RAMALHO; SUAREZ, 2013).

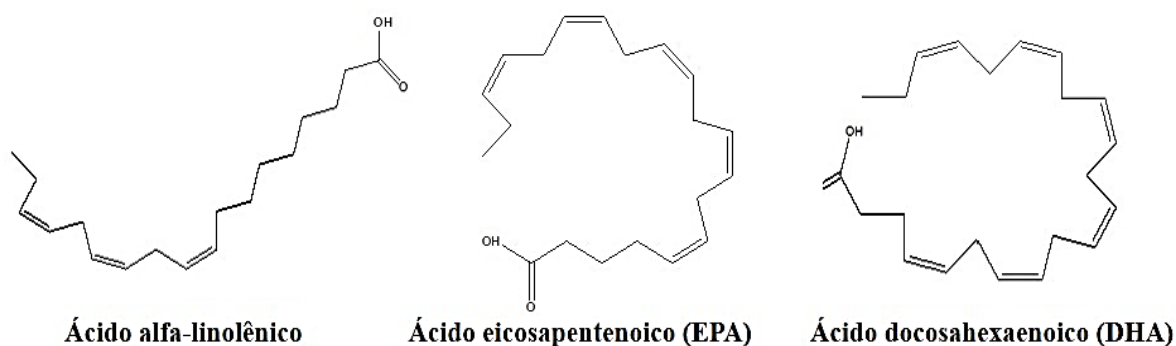
As gorduras são sólidas em condições ambientais e geralmente são de origem animal (manteiga de leite, sebo de vaca, banha suína, etc.), no entanto também existem gorduras de origem vegetal, como a manteiga de cacau, manteiga de coco e de abacate. No caso dos óleos, estes são líquidos à temperatura ambiente e, geralmente, são ricos em ácidos graxos insaturados (HU & JACOBSEN, 2016).

Os ácidos graxos poli-insaturados (AGPI) são ácidos carboxílicos de cadeia alifática contendo duas ou mais insaturações, com a configuração *cis*. A nomenclatura dos AGPI dar-se-á pela a letra ômega (ω), ou “n”, que se atribui a posição da primeira instauração. Como regra, estes ácidos devem apresentar suas duplas ligações separadas por um grupo metileno ($-\text{CH}_2-$). A classificação destes ácidos graxos pode ser definida por várias formas, sendo a mais comum a que agrupa os ácidos graxos conforme o número do carbono onde ocorre a primeira dupla ligação, contando-se a partir do grupo metílico (HU; JACOBSEN, 2016; JORGE, 2009).

A definição da família ômega-3 de ácidos graxos é dada pela primeira insaturação localizar-se-á no terceiro carbono da extremidade “ômega” da molécula. Um ácido graxo é composto por vários átomos de carbono ligados juntos a uma cadeia de um grupo funcional "ácido" $[\text{COOH}]$ em seu átomo de carbono inicial. O grupo ácido é facilmente identificado pelo fato de ser o único grupo de ácidos graxos que contém átomos de oxigênio (YONGGANG, LYNDSEY, HALADE, 2012).

Os ácidos graxos da família ômega-3 são o alfa-linolênico (ALA, $\text{C}_{18}:3$ - 18 carbonos e 3 insaturações, o ácido eicosapentanoico (EPA, $\text{C}_{20}:5$ - 20 carbonos e 5 insaturações, e o ácido docosahexaenoico (DHA, $\text{C}_{22}:6$ - 22 carbonos e 6 insaturações) (MORAES et al., 2006; PESCADOR, 2006), conforme estão apresentados na **Figura 1**.

Figura 1- Estrutura dos ácidos graxos essenciais



Fonte: SHAHIDI; ZHONG, 2010, com adaptações.

3.3 ÁCIDOS GRAXOS ÔMEGA-3

Os seres humanos não podem converter os ácidos graxos ômega-3 e ômega-6 entre si e, além disso, os ômegas-3 não funcionam da mesma maneira nem todos os ácidos graxos ômega-3 são biologicamente iguais (YONGGANG, LYNDSEY, HALADE, 2012). Desta forma, estes ácidos graxos devem ser adquiridos na dieta e, por este fato, são chamados de “essenciais”.

De acordo com Lima de Souza (2010) a dieta ocidental é demasiadamente rica em ácidos graxos da série ômega-6 e pobre em ômega 3 em razão do alto consumo de gorduras vegetais fontes de ômega-6. Sabe-se que é possível a obtenção dos AGPI por ação das enzimas delta-9 e delta-15 (MARTIN, 2006). As principais fontes destes ácidos graxos essenciais são peixes e óleo de peixe de águas frias e profundas a exemplo do salmão, arenque, atum e sardinhas; bem como em fontes vegetais como canola, linhaça e chia (MARTIN et al., 2006; MORETTO, 1998; RÊGO, 2012; TRUCOM, 2006).

Os ácidos graxos poli-insaturados possuem diversas propriedades benéficas para a saúde humana; desde participação na formação e desenvolvimento inicial do cérebro, no comportamento e aspectos neuroquímicos relacionados a transtornos, podendo ser utilizado como suplementação dietética (BERNARDI, 2012; HONGJIAN, 2013).

Os benefícios da suplementação de AGPI, especificamente o ômega-3 também podem ser visto em pacientes com doenças cardiovasculares. Estudos demonstram que o consumo de dietas com alto conteúdo de ômega-3, em torno de 12-28% do valor calórico total, aumenta a concentração de HDL (*High Density Lipoproteins*) e diminuiu a razão LDL (*Low Density Lipoproteins*): HDL no organismo (GILMORE et al., 2011; SANTOS et al., 2013). Em óleos de peixe, fontes de ômega-3 EPA e DHA, estudos mostram diversos efeitos positivos contra doenças cardiovasculares e inflamatórias, impedimento do declínio cognitivo e outros (CALDER, 2013; VKM, 2011). As quantidades destes ácidos graxos em óleos de peixe dependem da matéria-prima selecionada, isto é, espécies de peixes, idade e parte do peixe; dieta dos peixes (dieta natural ou aquicultura / alimento para peixes); e do processo de produção (USYDUS et al., 2007).

O ácido α -linolênico, outro tipo de ômega-3 que está presente em fontes vegetais como óleo de semente de linhaça e óleo de semente de chia, foi associado ao tratamento de doenças inflamatórias, cardiovasculares, aterosclerose e dor artrítica (SIMOPOULOS, 2008; LIANG et al., 2016; MOZGHAN, 2016).

3.3.1 Consumo e recomendação do ácido graxo ômega-3

Estudos apontam diversos efeitos da ingestão de ômega-3, tais como efeitos cardiovascular, em artrite e doenças neurodegenerativas (STANLEY et al. 2013; LANDS 2012), bem como efeitos metabólicos (WARENSJO ET AL. 2006). No entanto, ainda não há um consenso no que tange a recomendação diária, o que dificulta a definição de limites de segurança para esses nutrientes, bem como a identificação dos grupos populacionais de risco. No quadro 1 estão apresentados os limites de segurança de ingestão de EPA e DHA de acordo com os principais órgãos internacionais.

Na dieta humana ancestral, a proporção recomendada seria 1:1, no entanto, esta proporção tem aumentado na sociedade industrializada, alcançando valores superiores a 25:1, principalmente nos países ocidentais. Em uma dieta típica moderna, a razão ω -6/ ω -3 é superior a 10:1, devido às fontes limitadas ω -3 (HAMMEN, 2005; LOEF; WALACH, 2013; LONG et al, 2013). A Organização Mundial de Saúde (OMS) sugere uma proporção de 1:1, 5:1 para ácidos saturados: mono-: poli-insaturados e 1:5-10 ácido alfa linolênico (ômega-3): ácido linoleico (ômega-6) na ingestão de alimentos. Para isto, define-se três fatores importantes para a avaliação nutricional de óleos: 1) presença de antioxidantes, 2) relação de saturado, mono e poli-insaturados e 3) relação de ácidos graxos essenciais (OMS, 2008).

Para gestantes as doses recomendadas variam entre 200 e 600 mg, e para lactentes, as fórmulas devem conter 0,2 a 0,5% de seu total de lipídios. Ressaltando, que no caso de crianças, especialmente nos primeiros cinco anos de vida, a ingestão de ômega-3 é imprescindível (CARVER et al, 2001; CARLSON et al, 2013; OZYURT et al., 2007).

Quadro 1- Resumo das avaliações realizadas por órgãos internacionais sobre os limites de segurança da ingestão de EPA e DHA.

Instituição	Limite de segurança
Food and Drug Administration (2000)	3 g/dia de EPA e DHA para todas as fontes alimentares 2 g/dia de EPA e DHA para suplementos.
Institute of Medicine (2005)	Não estabelecido
National Health and Medical Research Council (2006)	3 g/dia de EPA, DHA e DPA
The Federal Institute for Risk Assessment (2009)	Não estabelecido
Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010)	2 g/dia de EPA e DHA
European Food Safety Authority (2012)	Não estabelecido

Fonte: BRASIL, 2014, com adaptações.

Em 2014, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou o Informe Técnico nº 63 sobre adição de ingredientes fontes de EPA e DHA em alimentos e bebidas. Além da recomendação de ômega-3, há também uma indicação para a proporção entre ômega-6 (ácido linoleico) e o ômega-3, o qual é denominada de razão ω -6/ ω -3. No Brasil, de acordo com o I Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia, o consumo de fontes adequadas de DHA no Brasil é extremamente baixo, pois além de grande parte dos peixes consumidos pela população são criados em cativeiros, não há uma regulamentação para suplementação de DHA na dieta dos mesmos (ALMEIDA, 2014).

3.4 ÓLEO DE FÍGADO DE BACALHAU E ÓLEO DE LINHAÇA COMO FONTE DE ÔMEGA-3

Desde o século XIX, o óleo de fígado de bacalhau é consumido como suplemento nutricional; seja em cápsulas ou em produtos alimentares enriquecidos. Os potenciais benefícios para a saúde são atribuídos aos ácidos ômega-3 EPA e DHA, e a vitamina D, sendo usado notoriamente como um dos medicamentos para curar raquitismo (RAJAKUMAR, 2003).

O óleo de fígado de bacalhau é constituído principalmente por ácidos graxos de cadeia longa, cerca de 8,54% de ácido eicosapentaenóico (EPA) e 9,55% de ácido docosahexaenóico (DHA). No entanto, estes percentuais podem variar de acordo com o local de captura do peixe, podendo apresentar quantidades superior ou inferior; com 21,97% de ácidos graxos saturados; 46,52% de ácidos graxos monoinsaturados e apenas 11,94% de ácidos graxos poli-insaturados, sendo deste 8,77% de DHA (ZENG et al., 2010; ROHMAN; CHE MAN, 2011; SIMOPOULOS, 2016).

Como citado anteriormente, o óleo de fígado de bacalhau também é fonte de vitamina D, e a combinação desta vitamina com o ômega-3 pode atuar em mecanismos de ação, tais como apoptose celular, inflamação, angiogênese e proliferação celular. Outros estudos consideram-no como uma excelente fonte de vitamina D e A. Também foram observadas correlações positivas entre o EPA e DHA presentes no óleo de fígado de bacalhau e ingestão de vitamina E ao avaliar biomarcadores num estudo de coorte (BATES, 2011; LENTJES, 2014). Contudo, mesmo sendo um óleo fonte de vitaminas lipossolúveis e de AGPI, o

consumo de suplementos a base de óleo de fígado de bacalhau ainda é considerado baixo e pode está associado a fatores como idade, tabagismo, classe social e educação (LENTJES, 2014; RIZOS, 2012).

A qualidade nutricional dos alimentos está relacionada à diversos fatores, no caso de oleaginosas está intimamente ligada a qualidade lipídica. A semente de linhaça (*Linum usitatissimum* L) contém cerca de 20-25% de proteínas, 20-25% de fibra, 1% de lignanas e 40-45% de lipídios (JORGE, 2009; SIMOPOULOS, 2002).

Um estudo clínico realizado com ratas sem ovários, as quais foram divididas em três grupos que receberam quantidade de linhaça diferentes na sua dieta (7,5, 15 e 22,5%) durante 120 dias. Observou-se que o consumo de linhaça é benéfico na redução do colesterol plasmático, principalmente para as ratas que receberam maior quantidade de linhaça na sua dieta (ARJMANDI; 2004)

A ingestão de linhaça também está associada a diminuição da glicemia e insulina em indivíduos com sobrepeso ou obesidade com pré-diabetes, sendo indicado o consumo diário de 13 g de linhaça (HUTCHINS et al, 2013). Em uma pesquisa recente, observou-se que o consumo de uma dieta suplementada com linhaça apresentou atividades moduladoras no cólon de camundongos, sugerindo que o consumo desta semente pode modificar a defesa microbiana e as respostas de doenças associadas ao intestino (POWER et al, 2016).

O óleo extraído da semente de linhaça é constituído na sua maior parte por AGPI, sendo mais de 50% do ômega-3 ALA, o qual vem sendo comumente associado ao tratamento de doenças inflamatórias, cardiovasculares, aterosclerose e dor artrítica (ABDULRAZAQ, 2017; LIU et al., 2016; SIMOPOULOS, 2002).

O consumo do óleo de linhaça está associado ao efeito hipocolesterolêmico, justamente pela presença do ALA, que atua através de uma regulação positiva da expressão do receptor de LDL e de uma aceleração do catabolismo, bem como a saída de colesterol. Além disso, observou-se que a suplementação contendo 25% de linhaça nas dietas de ratos saudáveis aumentaram os níveis de HDL e diminuiu os níveis de LDL e triglicerídeo (TAG), exercendo assim, o efeito cardioprotetor (DALEPRANE et al., 2010)

3.5 PARÂMETROS DE ESTABILIDADE DOS ÓLEOS RICOS EM ÁCIDOS GRAXOS POLI-INSATURADOS ÔMEGA-3

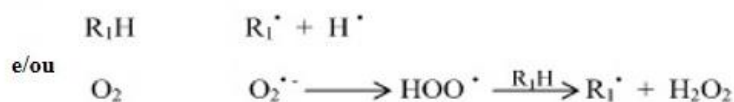
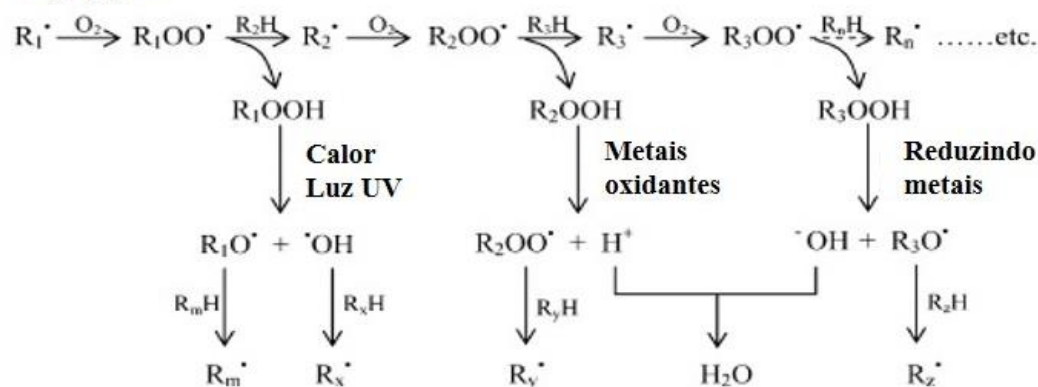
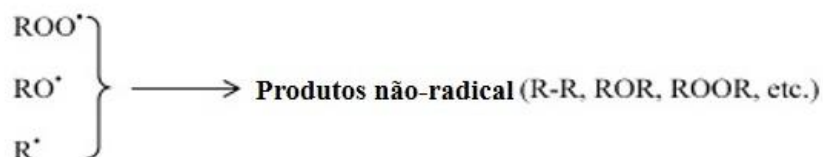
A estabilidade oxidativa de óleos e gorduras consiste num parâmetro global utilizado para avaliar sua qualidade dos produtos que os contêm (HU; JACOBSEN, 2016). Os óleos, por sua vez, estão sujeitos a reações que podem modificar sua estrutura química e ocasionando deterioração, podendo ocorrer em todas as fases de obtenção, processamento, distribuição armazenamento e utilização. Existem alguns fatores intrínsecos e extrínsecos que implicam na estabilidade à oxidação, incluindo a insaturação dos ácidos graxos, presença de compostos não glicerídeos (fosfolipídios, fitoesteróis, carotenoides e tocoferóis), condições ambientais, uso de antioxidantes, entre outros (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

Pelo fato de possuir ligações duplas na estrutura química, os óleos de fígado de bacalhau e de linhaça se tornam mais suscetíveis à processos oxidativos, causando a degradação dos ácidos graxos essenciais e comprometendo a qualidade nutricional, além do aparecimento de odores e sabores desagradáveis (SHAHIDI; ZHONG, 2010).

A oxidação lipídica é considerada uma das principais alterações que afetam os óleos e gorduras, ou em alimentos que os contêm. É um processo degradativo que ocorre quando o oxigênio atmosférico ou aquele que está dissolvido no óleo reage com os ácidos graxos insaturados presentes. As reações que ocorrem são complexas e geram produtos sensorialmente e nutricionalmente inaceitáveis em diferentes estágios da reação. O mecanismo da oxidação lipídica é descrito como uma reação em cadeia constituída por três fases: iniciação, propagação e terminação (FENEMMA, 2010).

Os óleos de peixe, alga e linhaça contêm uma grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados, como DHA, EPA e ALA que são mais facilmente oxidados que as gorduras animais, como porco e gordura de frango; e dos óleos vegetais, como óleos de soja, canola e milho. Assim, misturas de óleos contendo ácidos graxos n-3 com gorduras animais e / ou óleos vegetais podem ser um método eficaz para aumentar a estabilidade oxidativa e a vida útil de alimentos com baixa umidade (HU; JACOBSEN, 2016).

A auto-oxidação é o processo mais comum, sendo definido como um fenômeno espontâneo e inevitável dos óleos expostos ao oxigênio da atmosfera, que ocorre através de uma reação em cadeia de radicais livres. O hidrogênio *bis*-alílico dos ácidos graxos poli-insaturados requer uma menor energia de ativação para dar início à formação de radicais livres, em seguida o hidrogênio alílico. O hidrogênio alquil, no entanto, requer uma maior energia, logo considera-se sua sensibilidade atenuada (SHAHIDI; ZHONG, 2010) (**Figura 2**).

Figura 2 - Esquema do mecanismo da auto-oxidação lipídica**Iniciação****Propagação****Terminação**

Fonte: adaptado de SHAHIDI; ZHONG, 2010.

Existem algumas análises utilizadas para avaliar a estabilidade ou susceptibilidade a oxidação de óleos e gorduras. Na sua grande maioria são testes que submetem a amostra lipídica a condições padronizadas que aceleram o processo oxidativo: elevação de temperatura, adição de metais, aumento de pressão de oxigênio, estocagem sob luz, agitação e o aquecimento.

Os métodos mais utilizados para avaliar a estabilidade dos óleos, bem como a oxidação de alimentos lipídicos são: o teste de estufa (Schaal), que consiste na exposição do alimento a elevada temperatura por um tempo prolongado, no intuito de avaliar o estado de oxidação do produto por meio de outras análises como índice de peróxido, índice de acidez, infravermelho, Ressonância Magnética Nuclear, análise de voláteis, entre outros. Apesar de não haver padronização na quantidade de amostra e temperatura utilizada, o teste de estufa apresenta correlação com a vida útil do produto (HU; JACOBSEN, 2016).

Outro teste bastante utilizado para avaliar a qualidade de biocombustíveis (CARVALHO et al., 2016; FOCKE; WES THUIZEN; OOSTHUYSEN, 2016) e ao longo do tempo começou-se a utilizar na área de alimentos é o método Rancimat (RATUSZ et al., 2016; DAMANIK MURKOVIC, 2018; YANG et al., 2017). Atualmente este é o método oficial para determinar a estabilidade oxidativa, recomendado pela *American Oil Chemist's Society* (AOCS, 2009), os resultados são expressos em período de indução em horas e também apresenta correlação com a vida útil do produto.

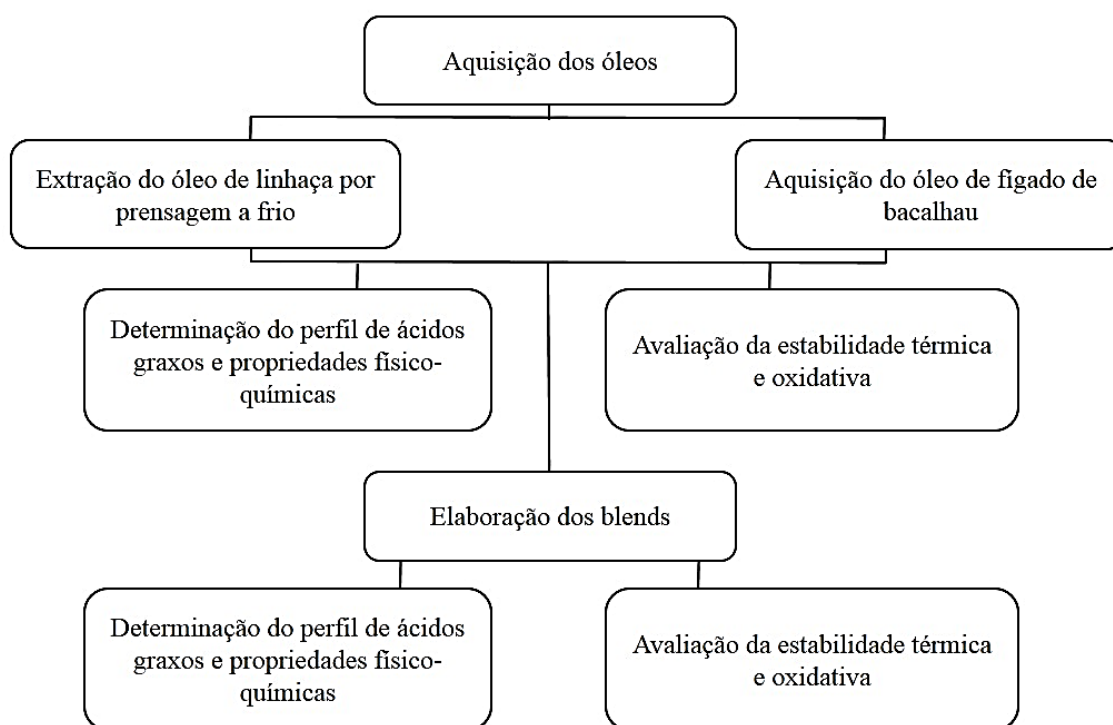
A estabilidade de um alimento também pode ser avaliada através da sua estabilidade térmica, que se define pela sua capacidade em manter suas propriedades durante o processamento térmico. Utiliza-se, portanto, a análise termogravimétrica (TG), que se baseia na variação de massa de uma amostra em função do tempo e temperatura (MOTHÉ; AZEVEDO, 2009).

Esta análise tem sido usada para acompanhar o comportamento da degradação de resíduos de alimentos (NINDUANGDEE et al., 2015), para avaliar a combustão de novos combustíveis (ELBAZ et al., 2015), cinética de oxidação térmica de alimentos (CHEN et al., 2017), assim como também para investigar a decomposição de matrizes oleosas (NYAKUMA; AHMAD; JOHARI; ABDULLAH, 2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

As análises experimentais deste estudo foram executadas nos laboratórios do Núcleo de Pesquisa e Extensão de Combustíveis e de Materiais (NPE – LACOM) e no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análises (LMCA), ambos pertencentes à Universidade Federal da Paraíba (UFPB). O Fluxograma apresentado na **Figura 3** ilustra os procedimentos realizados neste trabalho.

Figura 3- Etapas do desenvolvimento experimental deste estudo



4.1 REAGENTES E SOLVENTES

Os solventes n-hexano utilizado para as análises foi da marca Honeyweel. Também utilizou-se clorofórmio deuterado da marca Merck (0,03% em volume de TMS, 99,8% grau de deuteração). Os gases (oxigênio, ar sintético e hélio) utilizados foram adquiridos da White Martins, Brasil (99,8% de pureza).

4.2 ÓLEOS

4.2.1 Obtenção do óleo de linhaça *in natura*

O óleo de fígado de bacalhau, em cápsulas, usado no presente trabalho foi de fonte comercial, adquirido em supermercado da cidade de Viseu-Portugal. Todo óleo objeto do estudo pertenceu à mesma marca e lote.

4.2.2 Obtenção do óleo de linhaça

O óleo de linhaça, *in natura*, foi obtido a partir da prensagem das sementes, a frio, em nosso laboratório. As sementes de linhaça marrom (*Linum usitatissimum*) foram adquiridas no mercado central da cidade de João Pessoa-PB da mesma marca e lote. No processo de prensagem obteve-se um rendimento de aproximadamente 20%. Após a extração o óleo foi filtrado a vácuo e acondicionado em recipientes de vidro âmbar, permanecendo assim até a realização das análises e procedimentos posteriores.

4.3 PERFIS DE ÁCIDOS GRAXOS DOS ÓLEOS

4.3.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-MS)

Inicialmente foram preparados os ésteres de ácidos graxos de acordo com a metodologia descrita por Hartman & Lago (1973). Os ésteres obtidos foram secos em atmosfera inerte (N₂) para retirar os resíduos de solvente. A solução injetada na coluna cromatográfica foi preparada usando a proporção ésteres de ácidos graxos/hexano 2:1, no intuito de melhorar a resolução dos picos.

A quantificação dos ésteres de ácidos graxos foi feita através da curva de calibração com padrões de ésteres metílicos (Supelco® 37 Component FAME Mix), utilizando um CGMS-QP2010 (Shimadzu, Kyoto, Japan) equipado com uma coluna Durabound DB-23 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram fixadas em 230 °C e a temperatura da coluna em 90 °C. O gradiente de eluição na coluna foi de 90 a 150 °C (10 °C/min), 150 a 200 °C (2 °C/min), 200 a 230 °C (10 °C/min) em um tempo total de corrida de 39 minutos com um split de 100. O gás transportador foi o gás hélio.

4.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H)

Para esta análise, utilizou-se 30 mg de óleo dissolvidos em 0,6 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3). Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetro da Bruker (400 MHz). Tetrametilsilício (TMS) foi usado como padrão interno de referência. Para o tratamento dos espectros utilizou-se o software MestreNova e os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão (ppm).

4.3.3 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro com transformada de Fourier (modelo IR Prestige-21 da marca Shimadzu, Kyoto, Japão) e os ensaios realizados por reflectância utilizando acessório de Reflectância Total Atenuada (ATR). As análises dos espectros foram realizadas no software OriginPro 8.

4.4 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

4.4.1 Índice de acidez e índice de iodo

O índice de acidez foi determinado de acordo com o método descrito em IAL (2008) e o índice de iodo pelo método de Wijis Cd 1-25 (AOCS, 2009). Ambas foram realizadas em triplicata.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E TÉRMICA

A estabilidade oxidativa do óleo de fígado de bacalhau e do óleo de linhaça foi determinada através do método acelerados Rancimat.

4.5.1 Método Rancimat

A análise da estabilidade oxidativa do óleo de fígado de bacalhau, do óleo de linhaça e dos *blends* formuladas foram realizados em duplicata no equipamento Rancimat (Metrohm), utilizando a metodologia da AOCS Cd 12b-92 (2009). Neste procedimento utilizou-se 2 g da amostra, sob fluxo constante de ar (10 L.h^{-1} a $68 \text{ }^{\circ}\text{C}$) de acordo com (TIAN, 2013). Os resultados foram expressos em período de indução (PI), determinado automaticamente a partir do ponto de inflexão da curva, pelo programa que acompanha o equipamento. O valor de PI foi expresso em horas (h).

4.5.2 Análise termogravimétrica

As curvas termogravimétricas (TG/DTA) dos óleos foram obtidas em um analisador térmico simultâneo modelo TG-DTA-60H (Shimadzu, Kyoto, Japão) em atmosfera de ar sintético, com fluxo de 50 mL.min^{-1} , razão de aquecimento de $10 \text{ }^{\circ}\text{C.min}^{-1}$, até $600 \text{ }^{\circ}\text{C}$, utilizando cadinho de alumina e massa de aproximadamente 10 mg.

4.6 FORMULAÇÕES DOS *BLENDS*

Foram formulados sete *blends* em proporções diferentes de massa/massa, compostas por óleo de fígado de bacalhau e óleo de linhaça, conforme a tabela 2. Os *blends* foram armazenados em vidro âmbar, e acondicionados em refrigerador à temperatura de aproximadamente $10 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Tabela 2 - Formulações dos *blends* com óleo de fígado de bacalhau (OFB) e óleo de linhaça (OL)

<i>BLEND</i>	OFB (%)	OL (%)
01	50	50
02	40	60
03	30	70
04	20	80
05	60	40
06	70	30
07	80	20

OL = óleo de linhaça

OFB = óleo de fígado de bacalhau

4.7. DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DOS BLENDS

Os perfis de ácidos graxos dos *blends* foram determinados conforme metodologias descritas nos itens 4.3.1, 4.3.2 e 4.3.3.

4.8. DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA DOS BLENDS

O estudo da estabilidade oxidativa dos *blends* foi feito pelo método Rancimat nas condições descritas no item 4.5.1.

4.9. PRECONIZAÇÃO DA VIDA DE PRATELEIRA

A vida de prateleira dos *blends* foi preconizada usando o teste de Schaal, no qual 10 gramas de cada amostra (blend) foram armazenados em frascos de vidro transparente e acondicionados em estufa na temperatura de $60\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5$ durante 10 dias. No final deste período foram feitas análises de RMN ^1H para avaliar o grau de decomposição dos blends.

REFERÊNCIAS

ABDULRAZAQ, M et al. Effect of ω -3 polyunsaturated fatty acids on arthritic pain: A systematic review. **Nutrition**, v. 39-40, p. 57-66, 2017.

AKERELE, O. A.; CHEEMA, S. K. A balance of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy. **Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism**, v. 5, p. 23-33, 2016.

ALMEIDA, Carlos Alberto Nogueira de. I Consenso da Associação Brasileira de Nutrologia sobre recomendações de DHA durante a gestação, lactação e infância. **International Journal of Nutrology**, 2014.

AL-NOZHA, M. M. e colaboradores. Coronary artery disease and diabetes mellitus. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 11, p. 330-338, 2016.

ANDLAUER, W. & FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v. 35, p. 171 – 176, 2002.

ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**. v. 3, n. 2, p. 145- 154, 2004.

BARBOSA, A. D.; SINIOSSOGLU, S. Function of lipid droplet-organelle interactions in lipid homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, p. 1459-1468, 2017.

BATES, B.; LENNOX, A.; BATES, C.; SWAN, G. National Diet and Nutrition Survey. Headline Results from Years 1 and 2 (Combined) of the Rolling Programme (2008/2009–2009/10); Department of Health, **Food Standards Agenc**, 2011

BERNARDI, Juliana Rombaldi e colaboradores., Fetal and Neonatal Levels of Omega-3: Effects on Neurodevelopment, Nutrition, and Growth. **The Scientific World Journal**, 2012.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 398, de 30 de abril de 1999. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Diário Oficial da União, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico n. 63, de 3 de outubro de 2014. Aprova o regulamento sobre Esclarecimentos sobre adição de ingredientes fontes de EPA e DHA em alimentos e bebidas. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/388729/Informe+T%C3%A9cnico+n%C2%BA+63%2C+de+3+de+outubro+de+2014/be5f23cf-456a-41ba-abfd-6065ac94b076>. Acesso em: 01 de nov de 2017.

CARVALHO, A. L.; CARDOSO, E. A.; ROCHA, G. O; TEIXEIRA, L. S.G.; PEPEC, I.M.; GROSJEANAD, D. Carboxylic acid emissions from soybean biodiesel oxidation in the EN14112 (Rancimat) stability test. **Fuel**, v. 173, p. 29-36, 2016

CALDER, P.C. n-3 fatty acids, inflammation and immunity: new mechanisms to explain old actions. **Proc. Nutr. Soc.** v.72, p. 326–336, 2013.

CARAMIA, G, GORI, A, VALLI, E, CERRETANI, L. Virgin Olive Oil in Preventive Medicine: From Legend to Epigenetics. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p.375-388, 2012.

CARLSON, S. E. et al. DHA supplementation and pregnancy outcomes. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 97, p. 808-815, 2013.

CARRILLO, F. L e colaboradores . Grasas de la dieta y salud cardiovascular. **Clinic e Investigacion en Arteriosclerosis**, v. 23, p. 1-36, 2011.

CARVER, J. D. e colaboradores. The relationship between age and the fatty acid composition of cerebral cortex and erythrocytes in human subjects. **Brain Research Bulletin**, v. 56, p. 79-85, 2001.

CHEN. J.; WANG, Y.; LANG, X.; REN, X. FAN, S. Comparative evaluation of thermal oxidative decomposition for oil-plant residues via thermogravimetric analysis: Thermal conversion characteristics, kinetics, and thermodynamics. **Bioresource Technology**. V. 243, p. 37-46, 2017.

DALEPRANE, J. B. Dietary flaxseed supplementation improves endothelial function in the mesenteric arterial bed. **Food Research International**, v. 43, p. 2052-2056.

DAMANIK, M.; MURKOVIC, M. The stability of palm oils during heating in a rancimat. **European Food Research and Technology**, v. 244, p. 1293-1299, 2018.

DIKSHIT, A.; HALES, K.; HALES, D. B. Whole flaxseed diet alters estrogen metabolism to promote 2-methoxtestradiol-induced apoptosis in hen ovarian câncer. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 42, p. 117-125, 2017.

ELBAZ, A.M. et al. TG/DTG, FT-ICR Mass Spectrometry, and NMR Spectroscopy Study of Heavy Fuel Oil. **Energy Fuels**. v. 29, p.7825-7835, 2015.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. **Química de Alimentos de Fennema** – 4ª ed. - Editora Artmed, 2010.

FOCKE, W. W.; WESTHUIZEN, I. V. OOSTHUYSEN, X.. Biodiesel oxidative stability from Rancimat data. **Thermochimica Acta**. v, 633, p. 116-121, 2016.

GILMORE LA, WALZEM RL, CROUSE SF, et al. Consumption of high-oleic acid ground beef increases HDL-cholesterol concentration but both high- and low-oleic acid ground beef decrease HDL particle diameter in normocholesterolemic men. **Journal of Nutritional V**. 141, p. 1188-1194, 2011.

GUILLÉN, M. D. Characterization of cod liver oil by spectroscopic techniques. New approaches for the determination of compositional parameters, acyl groups, and cholesterol from 1h nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectral data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9072-9079, 2008

GULATI, O; BERRY, P. Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products. **Toxicology**, v. 221, p. 75-87, 2006.

HARIRI, N.; GOUGEON, R.; THIBAULT, L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. **Nutrition Research**, v. 30, p. 632-643, 2010.

HARTMAN, L; LAGO, L. C. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Laboratory Prattice**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HONGJIAN, P. e colaboradores. Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation improves neurologic recovery and attenuates white matter injury after experimental traumatic brain injury. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 33, p. 1474-1484, 2013.

HU; JACOBSEN. Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats. American Oil Chemists' Society. London: Elsevier, 2016. 519 p.

HUTCHINGS, Aret e colaboradores. Flaxseed consumption influences endogenous hormone concentration in postmenopausal women. **Nutrition and Cancer**, p. 631-637, 2001.

HUTCHINS, A.M. e colaboradores. Daily flaxseed consumption improves glycemic control in obese men and women with pre-diabetes: a randomized study. **Nutrition Research**, v. 33, p. 367-375, 2013.

INNIS, S.M., 2005. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 26. **Suppl. A**, p. 70–S75, 2005

KOREN, Netta e colaboradores. Exposure to omega-3 fatty acids at early age accelerate bone growth and improve bone quality. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, p. 623–633, 2014.

KOSTIK, V., MEMETI, S., & BAUER, B. Fatty acid composition of edible oils and fats. *Journal of Hygienic Engineering Design*, v. 4, p. 112–116, 2013.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. v. 12, p. 99–107, 2001a.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. **Food Control**. v.12, p. 109–117, 2001b.

LANDS, B. Consequences of essential fatty acids. **Nutrients**. v. 4, p.1338–1357, 2012.

LENTJES, M. A. H e colaboradores. Contribution of cod liver oil-related nutrients (vitamins A,D, and eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) to daily nutrient intake and their associations with plasma concentrations in the EPIC-Norfolk cohort. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. v.28, p. 568–582, 2015.

LENTJES, M. A. H. e colaboradores. Contribution of cod liver oil-related nutrients (vitamins A, D, E and eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid) to daily nutrient intake and their associations with plasma concentrations in the EPIC-Norfolk cohort. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**, v. 28, p. 568–582, 2014.

LIANG, L. et al. Protective role of n6/n3 PUFA supplementation with varying DHA/EPA ratios against atherosclerosis in mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.32, p.171–180, 2016.

LIMA DE SOUZA, H. A. e colaboradores. Physical and nutritional characterization and lipid profile of three amazon fish species. **Revista Brasileira de Tecnologia Industrial**. v.4, n. 2. 2010.

LIU, L. ScienceDirect Protective role of n6 / n3 PUFA supplementation with varying DHA / EPA ratios against atherosclerosis in mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 32, p. v, 2016.

LYBERG, A.M., ADLERCEUTZ, P. Monitoring monohydroperoxides in docosahexaenoic acid using high-performance liquid chromatography. **Lipids**, v. 41, p.67–76, 2006.

MARINANGELI, C.P.; JONES, P.J. Gazing into the crystal ball: future considerations for ensuring sustained growth of the functional food and nutraceutical marketplace. **Nutrition Research Review**, v.1, p.12-21, 2013.

MARTIN, C. A.; ALMEIDA, V.V.; RUIZ, M.R., et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de Nutrição**, v.19, n.6, p.761-770, 2006.

MORAES, Fernanda P. e COLLA, Luciane M. Functional foods and nutraceuticals: definition, legislation and health benefits. **Revista Eletrônica de Farmácia**. V.3, n. 2, p. 109-122. 2006.

MONNIER, L.; COLETTE, C. Acides gras oméga 3 et pathologie cardiovasculaire: La part du vrai. **Medecine des Maladies Metaboliques**, v. 5, p. 269-277, 2011.

MORETTO, E.; FETT, R. **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. São Paulo: Varela, p. 150, 1998.

MOZGHAN, Abdulrazaq e colaboradores. The effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on arthritic pain: A systematic review. **Nutrition**, v. 16, 2016.

NINDUANGDEE, P. et al. Thermogravimetric Studies of Oil Palm Empty Fruit Bunch and Palm Kernel Shell: TG/DTG Analysis and Modeling. **Energi Procedia**. v. 79, p. 453-458, 2015.

NYAKUMA, B. B.; AHMAD, A.; JOHARI, A. ABDULLAH, T A.T. Thermogravimetric and Kinetic Analyses of Oil Palm Empty Fruit Bunch (OPEFB) Pellets Using the Distributed Activation Energy Model. **Journal of Physical Science**, v.27, p.67–83, 2016

OMS (2008). Interim summary of conclusions & dietary recommendations on total fat & fatty acids. The joint FAO/WHO expert consultation on fats & fatty acids in human nutrition. Geneva, p. 1– 14.

OZYURT, B. e colaboradores. The protective effects of omega-3 fatty acids against MK-801-induced neurotoxicity in prefrontal cortex of rat. **Neurochemistry International**, v. 50, p. 196-202, 2007.

PESCADOR, Rosane. Aspectos nutricionais dos lipídios no peixe: uma revisão e literatura. 2006. 69p. (Especialista em Gastronomia e Segurança Alimentar) – Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília, setembro, 2006.

POWER, K. A. e colaboradores. ScienceDirect Dietary flaxseed modulates the colonic microenvironment in healthy C57Bl / 6 male mice which may alter susceptibility to gut-associated diseases. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 28, p. 61-69, 2016.

RAJAKUMAR, K. Vitamin D, Cod-Liver Oil, Sunlight, and Rickets: A Historical Perspective. **Pediatrics**, v. 112, p. 132-134, 2003.

RAMALHO, H. F.; SUAREZ, P. A. Z. A Química dos Óleos e Gorduras e seus Processos de Extração e Refino. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 2-15, 2013.

RATUSZ, K. POPIS, E.; CIEMNIEWSKA-ŻYTKIEWICZ, H. WRONIAK M. Oxidative stability of camelina (*Camelina sativa* L.) oil using pressure differential scanning calorimetry and Rancimat method. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v.126, p.343-351, 2016.

RAUCH, B., SCHIELE, R., SCHNEIDER, S., DILLER, F., VICTOR, N., GOHLKE, H., et al. OMEGA, a randomized, placebo-controlled trial to test the effect of highly purified omega-3 fatty acids on top of modern guideline-adjusted therapy after myocardial infarction/clinical perspective. **Circulation**, v.122, p. 2152–2159, 2010.

RÊGO, Fernando Luiz Trindade. Estudo do perfil de ácidos graxos e a razão entre ômega 6 / ômega3 em pescado / Fernando Luiz Trindade Rêgo. 2012. 196 f. Tese. Universidade Federal da Bahia. Instituto de Química. 2012.

REVILJA Mozuraityte e colaboradores. Oxidative Stability and Shelf Life of Fish Oil. In: HU, Min; JACOBSEN, Charlotte. Oxidative Stability and Shelf Life of Foods Containing Oils and Fats. AOCS press. Elsevier. p. 209-212, 2016

RIZOS, E. C. Association Between Omega-3 Fatty Acid Supplementation and Risk of Major Cardiovascular Disease Events. A Systematic Review and Meta-analysis, **JAMA**, v.308, p. 1024-1033, 2012.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.

ROHMAN, A; CHE MAN, Y. B. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy combined with chemometrics for authentication of cod-liver oil. **Vibrational Spectroscopy**, v. 55, p. 141-145, 2011.

RUXTON, C. H. S.; CALDER, P. C.; REED, S. C.; SIMPSON, M. J. A. The impact of longchain n-3 polyunsaturated fatty acids on human health. **Nutrition Research Reviews**, v. 18, p.113-129, 2005.

SANTOS, R; GAGLIARDI, A; XAVIER, H; MAGNONI, C; CASSANI, R; LOTTENBERG, A. I. Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, 2013.

SHAHIDI, F; ZHONG, Y. Lipid oxidation and improving the oxidative stability. **Chemical Society Reviews**, v.39, p.4067-4079, 2010.

SICIŃSKA, P.; e colaboradores. The use of various diet supplements in metabolic syndrome. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 9, p.25-33, 2015.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine**, p. 674-685, 2008.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the ratio omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 56, p. 365-379, 2002.

SIMOPOULOS, A. P. An increase in the omega-6/omega-3 fatty acid ratio increases the risk for obesity. **Nutrients**, v. 8, p. 1-17, 2016.

STANLEY WC, et al. Evaluation of docosahexaenoic acid in a dog model of hypertension induced left ventricular hypertrophy. **Journal Cardiovascular Translational**. v. 6, p.1000-1010, 2013.

SUAREZ, Paulo A. Z. e colaboradores Transformação de triglicerídeos em combustíveis, materiais poliméricos e insumos químicos: algumas aplicações da catálise na oleoquímica. **Química. Nova**, v. 30, p. 667-676, 2007.

TIAN, X. Chemical Factors Affecting Degradation Processes of Vegetable Oils during Frying. Food Science, 2013. Disponível em: <https://search.proquest.com/openview/17ff2f53b6f24ffe0d09f49bccd10815/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y>. Acesso em: 20 de jan. de 2018.

TRUCOM, C. **A importância da linhaça na saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, p. 151, 2006.

USYDUS, Z., POLAK-JUSZCZAK, L., DOBRZANSKI, Z., MALESA-CIECWIERZ, M. Study on the nutritive value of raw fish oils. **Polish Journal Food Nutrition Sciences**, v.57, p.593–596, 2007.

VALENTIM-SILVA, J. R e colaboradores. Impactos nutricionais da ingestão alimentar dos ácidos graxos ômega 3 e óleo de palma: uma revisão. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e emagrecimento**, v. 8, p. 16- 23, 2014.

VIZUETE, A. F. K. e colaboradores. Brain changes in BDNF and S100B induced by ketogenic diets in Wistar rats. **Life Sciences**, v. 92, p. 923–928, 2013.

VKM. Description of the processes in the value chain and risk assessment of decomposition substances and oxidation products in fish oils. Opinion of Steering Committee of the Norwegian Scientific Committee for Food Safety, Oslo. Disponível em: <http://www.vkm.no/dav/4be9bee090.pdf>. Acesso em: 29 out. de 2011

WALZEM, R. L. Functional Foods. **Trends in Food Science and Technology**. v. 15, p. 518, 2004.

WARENSJO E, SUNDSTROM J, LIND L, VESSBY B. Factor analysis of fatty acids in serum lipids as a measure of dietary fat quality in relation to the metabolic syndrome in men. **The American Journal of Clinical Nutrition**. v.84, p. 442–448, 2006.

WU, S. et al. Omega-3 fatty acids intake and risks of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 48, p. 1-9, 2015.

YANG, K.; et al. Characterization of Volatile Compounds with HS-SPME from Oxidized n-3 PUFA Rich Oils via Rancimat Tests. **Journal of Oleo Science**. v. 66, p. 113-122, 2017.

YATES, C. M.; CALDER, P. C.; ED RAINGER, G. Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 141, p. 272-282, 2014.

YONGGANG, M. A, LYNDSEY, M. L., HALADE G. V. DHA derivatives of fish oil as dietary supplements: a nutrition-based drug discovery approach for therapies to prevent metabolic cardiotoxicity. **Expert Opinion on Drug Discovery**. v.7, p.711-721, 2012.

ZENG, Y. e colaboradores. Talanta Elucidation of triacylglycerols in cod liver oil by liquid chromatography electrospray tandem ion-trap mass spectrometry. **Talanta**, v. 82, p. 1261-1270, 2010.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO

Os resultados obtidos com desenvolvimento desta pesquisa proporcionaram a elaboração de um artigo descrito a seguir:

O artigo intitulado “STRATEGY TO IMPROVE THE OMEGA-3 CONTENT AND THE OXIDATIVE STABILITY IN COD LIVER OIL” submetido ao periódico Food Chemistry, qualis A1 para Ciência de Alimentos.

STRATEGY TO IMPROVE THE OMEGA-3 CONTENT AND THE
OXIDATIVE STABILITY IN COD LIVER OIL

**Dayene Louyse L. Dantas^{1*}, Andreza M. Duarte¹, Túlio S. Nobre², Neide Queiroz²,
Maristela A. Alcântara¹, Antônia L. Souza^{1,2}**

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil.

² Programa de Pós-Graduação em Química. Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Brazil.

*Corresponding author: Cel.: +55 84 996347338
E-mail address: dayene_louyse@yahoo.com.br

Abstract

In the present study, blends were prepared using different ratios of linseed (LO) and cod liver (CLO) oils to obtain oils with major sources of omega-3 fatty acids and high oxidative stability. For this purpose, the blends were analyzed by Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS), ¹H Nuclear Magnetic Resonance (¹H NMR), Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy and Rancimat. The results showed that the proposed strategy of using LO/CLO blends to obtain oils with privileged compositions in omega-3 fatty acids such as α -linolenic (ALA), eicosapentaenoic (EPA) and docosaheptaenoic (DHA) acids. Furthermore, confirmation was obtained in showing an increase of the oxidative stability in compared to CLO.

Keywords: Cod liver oil, linseed oil, blends, omega-3, ¹H NMR, oxidative stability.

1. Introduction

Cod liver oil (CLO) presents a differentiated characteristic, compared to many vegetable oils, significant proportions of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid (eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids), as well as soluble vitamins A and D (Guillén et al, 2008). Due to this composition, its use as a nutritional supplement has been recommended mainly for children and pregnant women. The regular use of CLO in pregnant women has been associated with better brain development in the fetus. On the other hand, oil consumption in other life cycles has been related to the treatment of degenerative chronic diseases such as: Alzheimer's, inflammatory, cardiovascular diseases, cancers, amongst others (Akerele; Cheema, 2016; Hongjian et al, 2013; Wu et al, 2015; Yates et al, 2014; Al-Nozha et al, 2016).

The benefits of poly-unsaturated fatty acids for humans on health is well documented, and the consumption of products rich in omega-3 is growing. Although CLO is consumed as a source of omega-3, its percentage in oil is considered low in comparison, for example, to linseed oil. This fact has stimulated strategies that increase the concentration of omega-3 in lipid sources of animal origin. In the study developed by Lei et al. applying the techniques of winterization via solvent and enzyme interesterification obtained values of molar percentage of omega-3 around 43% in cod liver oil (Lei, Q. et al. 2016). Other works have managed to increase the content of omega-3 in fish oils and improve some physico-chemical properties by mixing oils from fish with other oils, mainly vegetable oils (Vicente et al, 2015; Corrêa, 2015; Baltork, Torbati, Damirchi & Savage, 2016). Among the class of vegetable oils, the oil of linseed seeds (*Linum Usitatissimum*) presents an appropriate chemical composition to be applied as a source of omega-3 to enrich other oils. The concentrations of omega-3 (α -linolenic acid) are in the 50% range in that oil (Marpalle et al., 2015; Reddy et al., 2012; Sun et al., 2015). And just like CLO, it is used as a functional food and in the prevention and

treatment of hypercholesterolaemia, diabetes, heart disease and the set of diseases characterized as metabolic syndrome (Hutchins et al, 2013; Sun et al., 2015).

The main problem in the use of oils rich in omega-3 is in its low oxidative stability. In this sense, both cod liver and linseed oils are highly susceptible to oxidation. However, intrinsic factors such as the presence of metals and substances of animal origin catalysts of oxidation reactions contribute to the lower stability of fish oils, regardless of the omega-3 content. It constitutes an oil industry strategy, the use of antioxidant additives to prolong the shelf life of oils with great susceptibility to oxidation. In the case of oils used as functional food, it is not a very safe or suitable the use of additives, since they are oils consumed regularly.

Nieva-Echevarría et al. assessed the efficiency of the butyl-hydroxytoluene synthetic antioxidant (BHT) in cod liver oil *in vitro* in a simulation of digestive process (Nieva-echevarría; Goicoechea; Guillén 2017). According to these authors, the use of BHT decreases the extent of the oil degradation progress, however, they do recommend caution in the use of this synthetic antioxidant in a functional food. According to literature, an alternative strategy is to improve the oxidative stability and functional characteristics of an oil is to combine oils with different compositions and properties. In this context, blends present a composition of fatty acids and greater thermal and oxidative stability than oils that originated from them (Aladedunye e Przybylski, 2013; Roiaini, Ardiannie e Norhayati, 2015; Siddeeg & Xia, 2015).

Based on what was mentioned above, we prepared cod liver and linseed oils blends in varied proportions in order to evaluate the effect of the addition of linseed oil on physico-chemical properties, especially the oxidative stability, profile of fatty acids with emphasis on the omega-3 content.

2. Materials and methods

2.1 Chemical reagents and materials

Hexane, methanol and deuterated chloroform (CDCl_3) obtained from Sigma-Aldrich. The other solvents and reagents used from F-Maia (Brazil).

2.2 Samples

The cod liver oil in capsule (CLO) from the Viseu- Portugal in a natural products store. The linseed from in the market of Joao Pessoa-Brazil. The linseed (1000 g) were cold pressed in a mechanical press with a total pressure of thirty ton. Obtained 200 g of oil in a yield of 20% by weight of oil/weight of seeds. After the extraction process, the oil obtained was vacuum filtered to remove the vegetal material and conditioned in amber glass in an inert atmosphere at 4 °C until the analyzes were carried out.

2.3 Preparation of blends

The blends (LO/CLO) composed were prepared in the following proportions weight/weight: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8).

2.4 Physico-chemical characterization of the oils

In the samples of oils and blends the following physico-chemical tests performed: acid value and iodine value. The acid value according to the methods (IAL, 2008). The iodine value according by the method of Wijis Cd 1 - 25 (AOCS, 2009).

2.5 Composition of fatty acids of oils and blends by GC-MS

Initially, the esterification of fatty acids was carried out to obtain the methyl esters according to the methodology described literature (HARTMAN & LAGO, 1973). The identification of fatty acid esters in the samples was performed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), Shimadzu, model GCMS-QP2010. The capillary column used was a Durabond - DB-23 (30 m $\times$ 0.25 mm and 0.25 μ m film thickness). The injection and detector temperature were set to 230 °C. The oven temperature was programmed from 90 °C to 150 °C (10 °C/min), 150 °C to 200 °C (2 °C/min) and then from 200 °C a 230 °C (10 °C/min). Helium gas was used as the carrier gas with a flow rate of 3 mL min⁻¹ and an injection volume of 1 μ L, using the split mode with a splitting ratio of 1:100. For molar quantification of methyl esters, sample peak areas were compared to those of the external calibration standard (Supelco® 37 Component FAME Mix).

2.6 Acquisition of the ¹H NMR Spectra and determination of fatty acid profile of oils and blends

The ¹H NMR spectra were recorded on a Bruker 400 MHz spectrometer. Each experiment was performed by dissolving a 20 mg of sample in 0.6 mL of deuterated chloroform (CDCl₃) containing tetramethylsilane (TMS). The mixture was introduced into a 5 mm diameter tube. The spectra acquisition time was 47 s with 16 repetitions. Chemical shifts were expressed in parts per million (ppm). The area of the signal was determined by using the software MestReNova software version 6.0 and the integrations were made of the peaks using previous studies (GUILLÉN et al. 2008), according Table 1. The results were expressed in molar percentage.

Table 1 - Equations for obtaining the fatty acid composition of the oils and blends by ¹H NMR signals

Fatty acid	Equation
Omega-3 (%)	$1 = (I_C + A_B) / (I_C) \times 100$
DHA (%)	$2 = (I_I) / (I_I + 2I_H) \times 100$
EPA (%)	$3 = (2I_F) / (I_I + I_E + I_F) \times 100$
ALA (%)	$4 = \% \text{ omega-3} - (\text{DHA} + \text{EPA})$
SMDU (%)	$5 = (I_B) / (I_B + I_C) \times 100$
Unsaturated (%)	$6 = (2I_G + I_I) / (6I_K) \times 100$
Saturated (%)	$7 = (2I_G + I_I) / (6I_K) \times 100$
Cholesterol (mmol/mol)	$8 = (4I_A / 3I_K)$

Source: Guillén (2008), adapted. DHA: docosahexaenoic acid. EPA: eicosapentaenoic acid. ALA: linolenic acid. SMDU: saturated, mono and diunsaturated.

2.7 Acquisition of the FTIR Spectra

FTIR spectra of the extracted oils were acquired on a Shimadzu prestige-21 IR Spectrophotometer and tests performed by reflection using Attenuated Total Reflectance accessory (ATR). All spectra were recorded from 4000 to 400 cm⁻¹. The frequency value for each band and the absorbance were obtained by the software OriginPro version 8. The assignment of the bands to specific functional group vibration was made from comparison with previous studies.

2.8 Oxidative stability

The oxidative stability tests were carried out in duplicate, according to the methodology of AOCS (AOCS, 2009), using the equipment 873 Biodiesel Rancimat, from Metrohm. The tests were performed using a 2 g samples, at temperature of 68 °C and constant air flow of 10 L.h⁻¹. The result, the induction period (IP), usually expressed in hours, was automatically determined from the inflexion point of the curve by the internal equipment software.

2.9 Accelerated stability test (Schaal test)

The oil samples (10 g) were stored in clear glass vials and oven-conditioned at 60 °C $\pm$ 5 for 10 days, which were subjected to ^1H NMR analysis.

2.10 Statistical Analysis

Results were expressed as mean $\pm$ standard deviation. Statistical analysis of the results was performed using ANOVA and Tukey test to identify significant differences between means, with significance at the 5% level ($p < 0.05$). The data were treated in the Sigma Stat Program 3.2.

3. Results and discussion

3.1 Physico-chemical properties

The average acidity and iodine values of the oil samples are listed in Table 2. CLO and LO as well as their blends presented acidity values ($< 4 \text{ mg KOH.g}^{-1}\text{oil}$) in accordance with the specifications recommended by the Codex Alimentarius for edible oils obtained by pressing and virgin oil (Codex Alimentarius, 2005). The CLO presented a lower acid value among the analyzed oils while LO showed higher acid value. Regarding the iodine index, it is related to the degree of unsaturation of an oil and major value this parameter implies in high oil quality. A significant difference was observed between the iodine values obtained for LO and CLO in agreement with the percentage of PUFAS in these oils.

Table 2 - Acid and iodine values of linseed oil, cod liver oil and blends.

Sample	Acid value (mg KOH. g ⁻¹ oil)	Iodine value (g I ₂ 100 g ⁻¹)
LO	0.83 ^a $\pm$ 0.01	182.5 ^a $\pm$ 0.70
CLO	0.20 ^b $\pm$ 0.10	166.0 ^e $\pm$ 0.00
B1	0.77 ^a $\pm$ 0.09	181.5 ^a $\pm$ 0.70
B2	0.77 ^a $\pm$ 0.09	176.5 ^b $\pm$ 0.70
B3	0.76 ^a $\pm$ 0.09	176.0 ^b $\pm$ 0.00
B4	0.62 ^a $\pm$ 0.09	180.5 ^a $\pm$ 0.70

B5	$0.55^a \pm 0.00$	$173.5^c \pm 0.70$
B6	$0.55^a \pm 0.00$	$170.5^d \pm 0.70$
B7	$0.48^{ab} \pm 0.09$	$166.5^e \pm 0.70$

Different letters in the same column, indicate significant differences at the 5% probability level in the Tukey test.

3.2 Fatty acid profile by GC-MS

Table 3 shows the composition of fatty acid in the oil samples, whose main constituents were ALA and oleic acid. Linseed oil has a favorable fatty acid composition with a high α -linolenic acid content. It contains nearly 52% of ALA, compared with 4% for cod liver oil. Thus, its composition is favorable for the oxidation process due to the presence of allylic and *bis*-allylic hydrogens in the acid alkyl chain. In cod liver oil, the content is mainly distributed between oleic acid and omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acid.

The composition obtained for seven blends shows that it is possible to prepare oil sample with control of omega-3 levels. For example, B1, B2 and B3 are blends with high values of ALA, whereas B7 shows nearly ALA and EPA contents. All the blends differ in omega-3 type, as expected, there was an increase of ALA content and a decrease of the levels of EPA and DHA. As was reported in the literature and presented here, linseed oil has high ALA content and does not contain the EPA and DHA (Gómez-Cortés; Brenna; Lawrence; De La Fuente, 2016; Shadyro; Sosnovskaya; Edimecheva, 2017). In relation to levels of EPA and DHA in LO/CLO blends were lower as compared to CLO Lei et al. observed an increase of omega-3 content in cod liver oil using the winterization method (Lei et al, 2016). These values were in this study higher than those obtained for us, but we had used a simple, fast and inexpensive process to improve the omega-3 content of CLO, which consists of mixing oils with different physico-chemical properties aiming at an improvement of characteristics. Thus, some oil blends have been prepared by industry, such as sunflower oil mixed with rapeseed or sunflower oil, soybean oil mixtures with oils rich in oleic acid to improve the oxidative stability (Hashempour-Baltork et al. 2016).

According to World Health Organization the omega-6/omega-3 ratio for a healthy consumption of an oil should be within the range 0.1 to 0.2 (WHO, 2008). Linseed oil and cod liver oil showed an omega-6/omega-3 ratio of 0.22 and 0.37, respectively. This parameter varied from 0.18 to 0.27 for blends showing an approximation with respect to linseed oil, which is an oil with functional properties (Hutchins et al, 2013).

The saturated fatty acids/PUFAS ratio for CLO was significant 0.73 against 0.1 for LO. According to other studies, the substitution of saturated fatty acids (C:12 to C:16) by fatty acids PUFAS decreases the cholesterol concentration and the ratio of total cholesterol/high density lipoproteins (HDL) causing a decrease in the incidence of coronary diseases (WHO, 2008). In this context, the blends obtained with the LO and CLO mixture provided the oils with the greatest potential for use as a functional food in relation to CLO.

Table 3 - Fatty acid profile of CLO, LO e blends por GC-MS.

Fatty acid (%)	LO	CLO	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
Lauric acid	ND	0.38	ND	0.31	0.36	0.36	ND	ND	ND
Myristic acid	ND	4.85	1.73	1.74	2.10	2.74	2.85	3.34	3.74
Myristoleic acid	ND	0.50	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pentadecanoic acid	ND	0.82	ND	0.37	0.55	0.48	0.47	0.62	0.63
Pentadecenoic acid	ND	0.49	0.70	ND	0.41	0.39	ND	ND	ND
Palmitic acid	4.83	13.19	6.33	7.30	7.93	8.77	8.74	9.44	9.92
Palmitoleic acid	0.49	6.90	1.85	1.94	2.54	3.02	4.37	5.54	5.73
Heptadecanoic acid	0.50	0.57	ND	0.46	0.55	ND	ND	ND	ND
<i>cis</i> -10-Heptadecenoic acid	0.52	0.66	ND	ND	0.41	ND	ND	ND	ND
Stearic acid	4.74	3.78	5.32	4.62	4.36	4.47	4.37	4.02	4.43
Elaidic acid	0.93	3.44	1.41	1.58	1.94	1.84	3.50	4.08	4.51
Oleic acid	16.12	22.56	16.02	17.78	18.59	18.97	17.99	17.92	18.17
Linolelaidic acid	0.54	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Linoleic acid	11.38	8.37	10.43	10.95	11.03	10.21	7.13	6.35	4.79
α -Linolenic acid (ALA)	51.70	4.03	42.86	40.97	36.11	31.16	26.11	20.30	13.28
γ - Linolenic acid	1.19	ND	ND	0.51	0.61	0.72	ND	ND	ND
Arachidic acid	ND	1.69	2.08	1.19	1.32	1.43	0.54	ND	ND
Eicosanoic acid	ND	4.02	1.54	1.34	1.74	1.99	7.79	9.34	12.04
Eicosadienoic acid	ND	1.54	1.87	ND	ND	1.35	ND	ND	ND
Eicosatrienoic acid	ND	ND	1.68	ND	ND	1.02	ND	ND	ND
Eicosatetraenoic acid	0.78	1.04	1.36	0.70	1.09	ND	ND	ND	ND

Ácido eicosatrienoico	ND	ND	ND	0.78	0.88	0.88	ND	ND	ND
Eicosapentaenoic acid (EPA)	ND	15.46	2.55	4.28	4.70	5.74	ND	9.04	10.17
Behenic acid	1.27	ND	ND	0.77	ND	ND	ND	ND	ND
Erucic acid	0.98	1.45	ND	ND	1.26	1.16	ND	7.21	9.63
Docosadienoic acid	0.84	1.13	1.53	ND	ND	0.90	ND	ND	ND
Tricosanoic acid	0.89	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Docosahexaenoic acid (DHA)	ND	3.10	ND	1.28	1.44	1.57	ND	2.79	2.97
Σ PUFAS	66.43	34.67	62.28	59.47	55.86	53.55	33.24	38.48	31.12
Σ omega-3	51.70	22.59	45.41	46.53	42.25	38.47	26.11	32.13	26.42
Reason omega-6/omega-3	0.22	0.37	0.23	0.24	0.26	0.27	0.27	0.20	0.18
Σ Saturated	12.23	25.28	15.46	16.76	17.17	19.09	16.97	17.42	18.72

ND: non-detectable. PUFAS: polyunsaturated fatty acid.

3.3 Fatty acid profile by ^1H NMR Spectroscopy

The GC-MS technique is the one most used in the determination of the composition of fatty acids. Though, it is possible to determine the percentages of esters from the fatty acids allowing the description of the composition. ^1H NMR technique is more robust than GC-MS, although it is not as sensitive. In the study of oils with rich compositions of omega-3 fatty acids, ^1H NMR is a perfectly adequate technique, allowing the determination of the molar percentage of omega-3, with specification in the ALA, EPA and DHA fatty acids (Guillén, 2008; Chang et al, 2010), which motivated the use of the technique in this study.

The ^1H NMR spectrum of CLO, Figure 1, presented 13 signals, of which twelve were attributed to hydrogen of the triacylglycerides of the oil, and 1 signal at 0.69 ppm, that was attributed to the presence of cholesterol, commonly found in oils of animal origin (Guillén et al, 2008). In the ^1H MNR spectrum of LO, 11 signals were identified, ten of which were assigned to fatty acids and one, at 0.67 ppm, to the presence of phytosterols, found in other vegetable oils extracted by pressing (Souza et al., 2017). The other signals from the spectra were identified based on data established in the literature (Guillén, 2012; Castro et al, 2010; Kostik; Memeti & Bauer, 2013). ^1H NMR spectrum of the LO showed the intensity of signal C, attributed to the terminal methyl hydrogen of the omega-3 fatty acid chain is greater than

the intensity of B, which attributed to the hydrogens of the terminal methyl of the other fatty acids. As a result, LO showed higher molar percentage of omega-3 fatty acid.

Opposite result was observed in the spectrum of the CLO thereby evidencing, that LO has higher omega-3 content than CLO. The comparison between the intensities of signals B and C in the spectra of the blends varied according to the amounts of LO and CLO used in their preparations, Figure 2. As expected, higher amounts of LO used gave blends with higher levels of omega-3. The equation 1 was used to obtain omega-3 molar percentages of LO, CLO and blends from the values of the integrals of signals B and C, shown in Table 4. The molar percentages of DHA and EPA fatty acids in CLO oil and blends were determined by 2 and 3 equations, respectively, using the integrals of the signals: I (A_I), H (A_H), (A_F) E (A_E) e I (A_I). The molar percentage of ALA in CLO was calculated using equation 4. The other equations were used to determine the molar percentages of saturated, unsaturated, diunsaturated fatty acids in LO, CLO and blends.

Table 4 - Composition parameters of Cod Liver Oil, Linseed Oil and blends obtained from 1H NMR.

Parameter	Equation **	LO	CLO	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
omega-3 (%)	1	52.2	21.37	46.45	37.66	33.78	34.24	34.23	31.40	27.94
DHA (%)	2	ND	12.90	0.66	0.92	1.02	3.54	7.36	8.03	10.28
EPA (%)	3	ND	10.12	0.11	9.19	10.2	7.18	8.99	12.36	15.63
ALA (%)	4	52.2	ND	45.68	27.55	22.56	23.32	17.88	11.02	2.03
SMDU (%)	5	47.8	78.73	53.55	62.06	66.22	65.76	65.77	68.59	54.33
U (%)	6	88.7	90.53	87.08	72.37	70.70	76.33	86.25	85.25	83.62
S (%)	7	11.33	11.80	12.91	27.62	29.29	23.66	13.75	14.75	16.38
Cholesterol*	8	ND	0.01	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: no detectable. DHA: docosahexaenoic acid. EPA: eicosapentaenoic acid. ALA: linolenic acid. SMDU: saturated, mono and diunsaturated; U: unsaturated; S: saturated. *Cholesterol/Triglyceride (mmol/mol); **See Table 1.

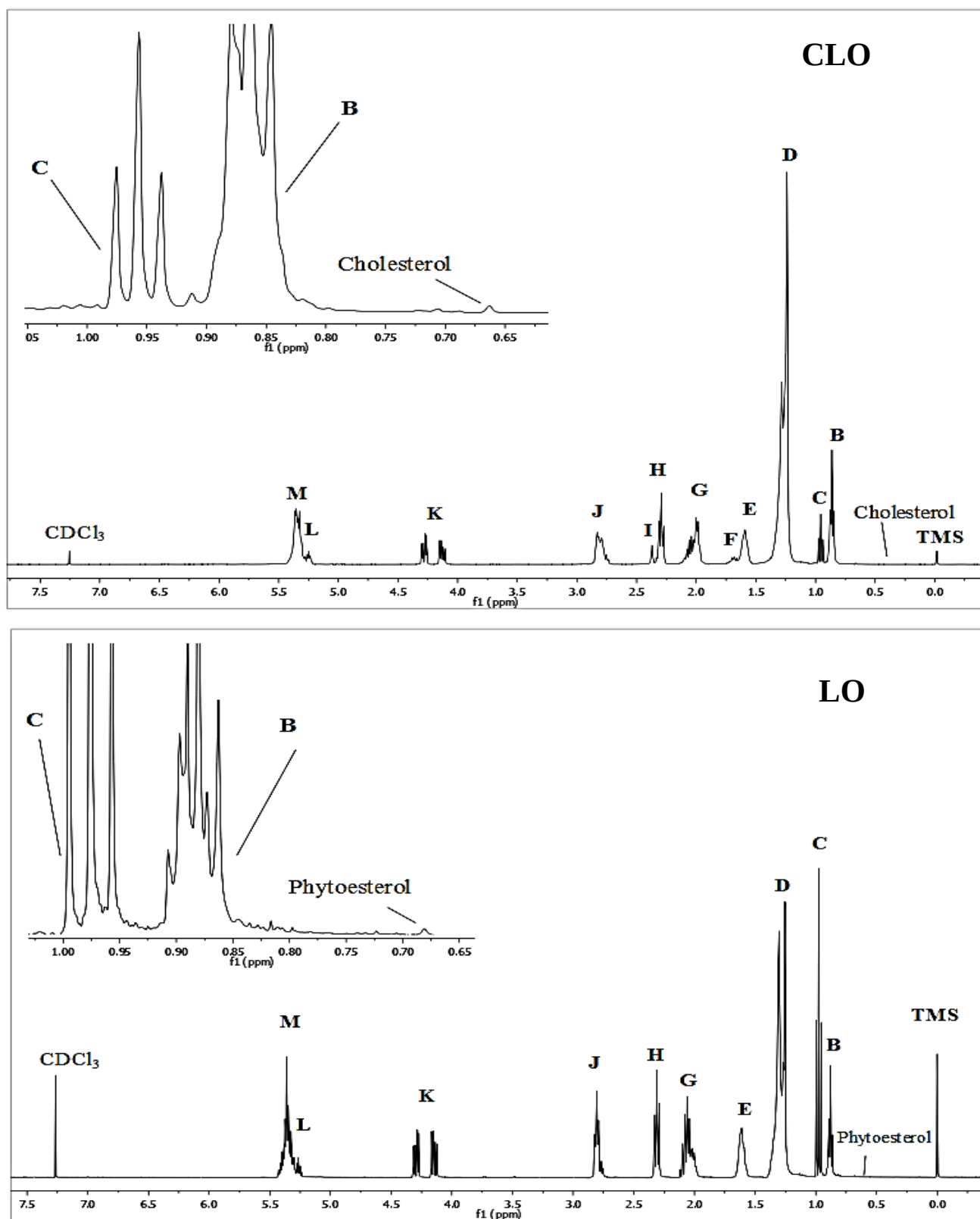


Figure 1 - ¹H NMR spectra of cod liver oil (CLO) and linseed oil (LO) recorded in CDCl₃

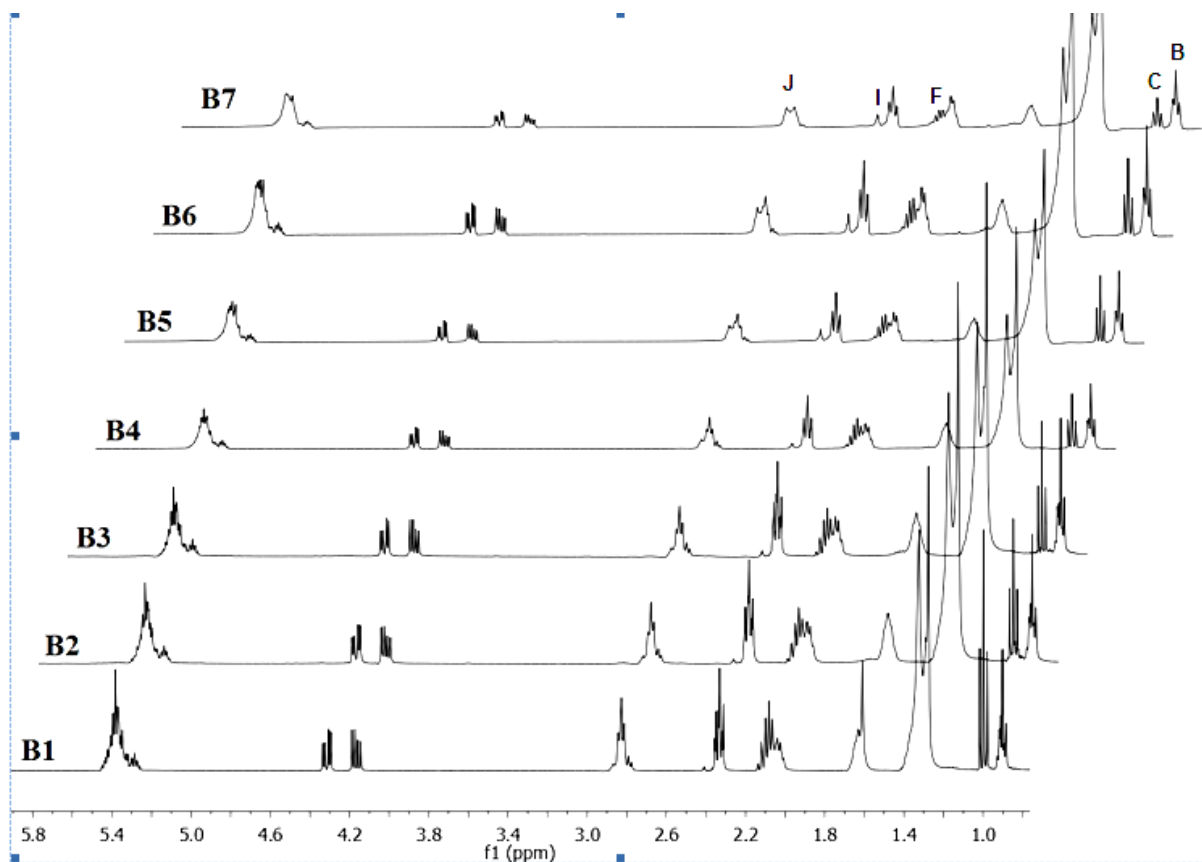


Figure 2 - Partial ^1H NMR spectra of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl_3 . The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8).

3.4 Characterization by Fourier transform infrared spectra

The evaluation of the composition of oils using spectroscopy in the infrared region is very efficient, mainly in the study of the identification of the authenticity and the degree of degradation of the sample. This technique was used in the characterization of pure oils and blends and in the monitoring of their oxidative stability during 10 days of storage, in the Schaal test. The infrared spectra of CLO and LO showed absorption bands in the characteristic regions of oils, but some relevant differences were observed between the two spectra presented in the Figure 3. The spectra these oils showed bands around 3020 cm^{-1} , attributed for the $=\text{C}-\text{H}$ bond stretch in *cis* configuration, normally discrete in the spectrum of

conventional oils, proved to be quite expressive for the two oils, indicating the degree of high unsaturation of CLO and LO. Unsaturation profile was confirmed by the presence similarly expressive of the band in 720 cm^{-1} , attributed for the $\text{HC}=\text{C}-\text{H}$ bond in *cis* configuration. At 968 cm^{-1} band associated with $\text{HC}=\text{C}-\text{H}$ in configuration *trans*, arising from a smaller proportion of isomerization of the double bonds, possibly due to the high degree of unsaturation of the evaluated oils. This band was more expressive in the CLO spectrum, because it was an oil with less stability when compared to LO (Guillén, 2003; Elzey; Pollard; Fakayode, 2016). Carbonyl group ($\text{C}=\text{O}$) stretch observed at 1746 cm^{-1} and $\text{C}-\text{O}$ bond at 1095 cm^{-1} , these bands attributed to the saturated acyl groups, monosaturates and polyunsaturated in triglycerides.

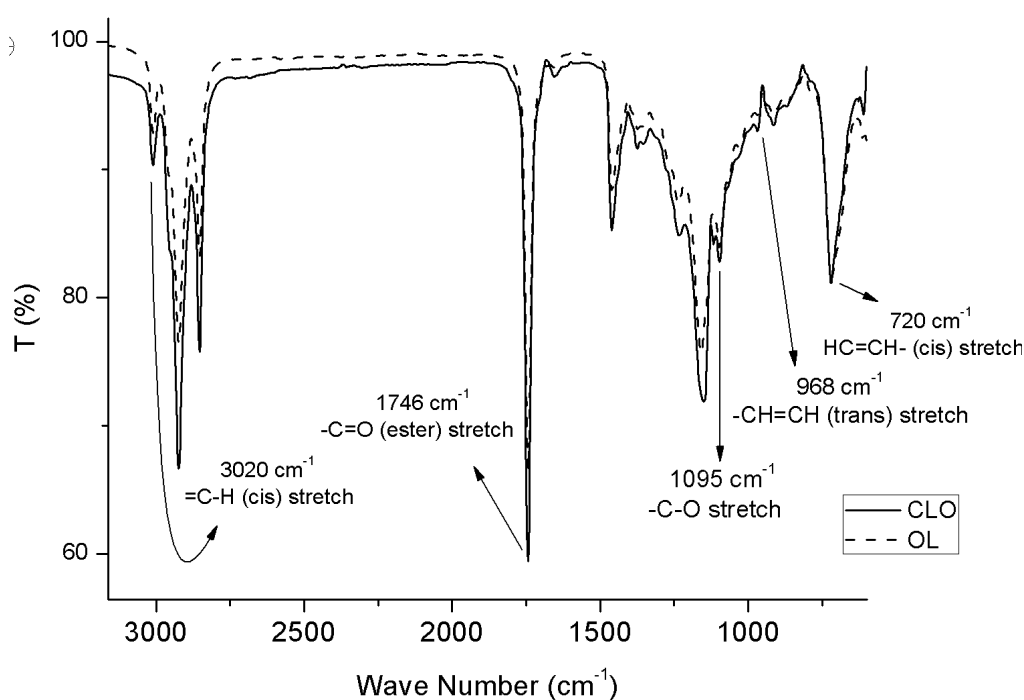


Figure 3 - Fourier transform infrared spectra of the CLO and LO sample.

3.5 Oxidative stability of the Cod Liver Oil, Linseed Oil and blends

The period of oxidative induction by the Rancimatt method is a parameter used for the prediction of the shelf life of the oils. Based on this, it was determined oxidative stability LO, CLO and blends using this method. The results are shown in Table 5. According to these data, LO, IP (26.46 ± 0.07 h) was much more stable than CLO, IP (12.32 ± 0.24 h), although the latter has a lower content of omega-3. Possibly, this is due to the chemical nature of the omega-3 fatty acids present in CLO, that although they consist of long chains, have 5 and 6 double bonds, therefore, a higher number of *bis*-allylic methylene groups (CH_2), more susceptible to oxidative degradation, compared to the structure of omega-3 fatty acid ALA present in LO.

Table 4 - Induction period (IP) of the LO, CLO and blends by the Rancimat method 68 °C.

Sample	IP/h
LO	$26.46^a \pm 0.07$
CLO	$12.32^g \pm 0.24$
B1	$23.12^b \pm 0.66$
B2	$21.80^b \pm 0.05$
B3	$17.11^{df} \pm 0.33$
B4	$16.99^{ef} \pm 0.12$
B5	$19.79^c \pm 0.82$
B6	$19.39^c \pm 0.44$
B7	$16.64^{de} \pm 0.54$

Different letters in the same column, indicate significant differences at the 5% probability level in the Tukey test.

The value of IP in the blends increased proportionally to the amount of LO used in obtaining these, and the B1 blend containing 80% LO was the most stable IP (23.12 ± 0.66 h). Usually, the temperatures used in the Rancimat test for the determination of IP in oils vary between 100 and 110 °C. In this study, we use a lower temperature, 68 °C, because according to the literature (Tian, 2013; Rúbio-Rodrigues et al, 2012; García-Moreno, 2013), this is the temperature that should be used for the determination of IP in fish oils, because the temperatures used for analysis in vegetable oils, there is a very rapid degradation of fish oils producing very low IP values, not being possible the correlation with the shelf life. In this

study we used the same temperature for all samples, for comparative purposes. In a recent study (Symoniū, Ratusz & Rygier, 2016) the induction period by Rancimat of linseed oils of different cultivars was determined, using a temperature at 70 °C, and the IP values obtained were higher than found in this study. Rancimat is an excellent technique for the determination of the stability of oils, however, several factors may interfere with the test result, for example, incorrect washing of equipment accessories, besides the presence of volatile compounds in the oil.

Considering the facts, we also decided to perform the Schaal test on the oil samples, to investigate the changes by ^1H NMR and IR spectroscopic techniques, fast techniques, and applied directly to the sample. Using ^1H NMR, we evaluated the degradation of omega-3 fatty acids during ten days of storage by the analysis of the ratio between the intensities of signals B and C. We investigated the progression of the production of peroxides and conjugated dienes, secondary products of oxidative degradation according to literature (Guillén, Ruiz & Cabo, 2004). Using the IR technique, we evaluated the formation of peroxides by monitoring the progression in the growth of bands in the region between 3020 – 3080 cm^{-1} and the occurrence of isomerization in the oils, using as a parameter the band at 968 cm^{-1} .

Figure 4 shows the expansions of the ^1H NMR spectra of the oils during storage. It was observed that there was degradation of the omega-3 content in all the oils, according to the decrease in intensity of signal C at 0.98 ppm comparing with signal B, at 0.89 ppm, especially in LO and in blends with major proportions of LO. In the region between 3.0 and 3.8 ppm, attributed to peroxides, there was more intense production in CLO and in the blends as major the amount of cod liver oil. In the region of formation of conjugated dienes, between 5.8 – 6.6 ppm, the signals observed in the expansions were also more evident in CLO, B5, B6 and B7. In the region of secondary oxidation products, between 9.0 – 9.8 ppm, were observed more intense signals in the CLO, B2 and B3, evidencing that in these samples the oxidative

degradation was faster. In the B4 blend, although signals of this type of degradation were not detected, does not indicate that there was preservation of this blend, for the secondary oxidation products derived omega-3, are usually aldehydes and low molecular weight ketones that possibly volatilized.

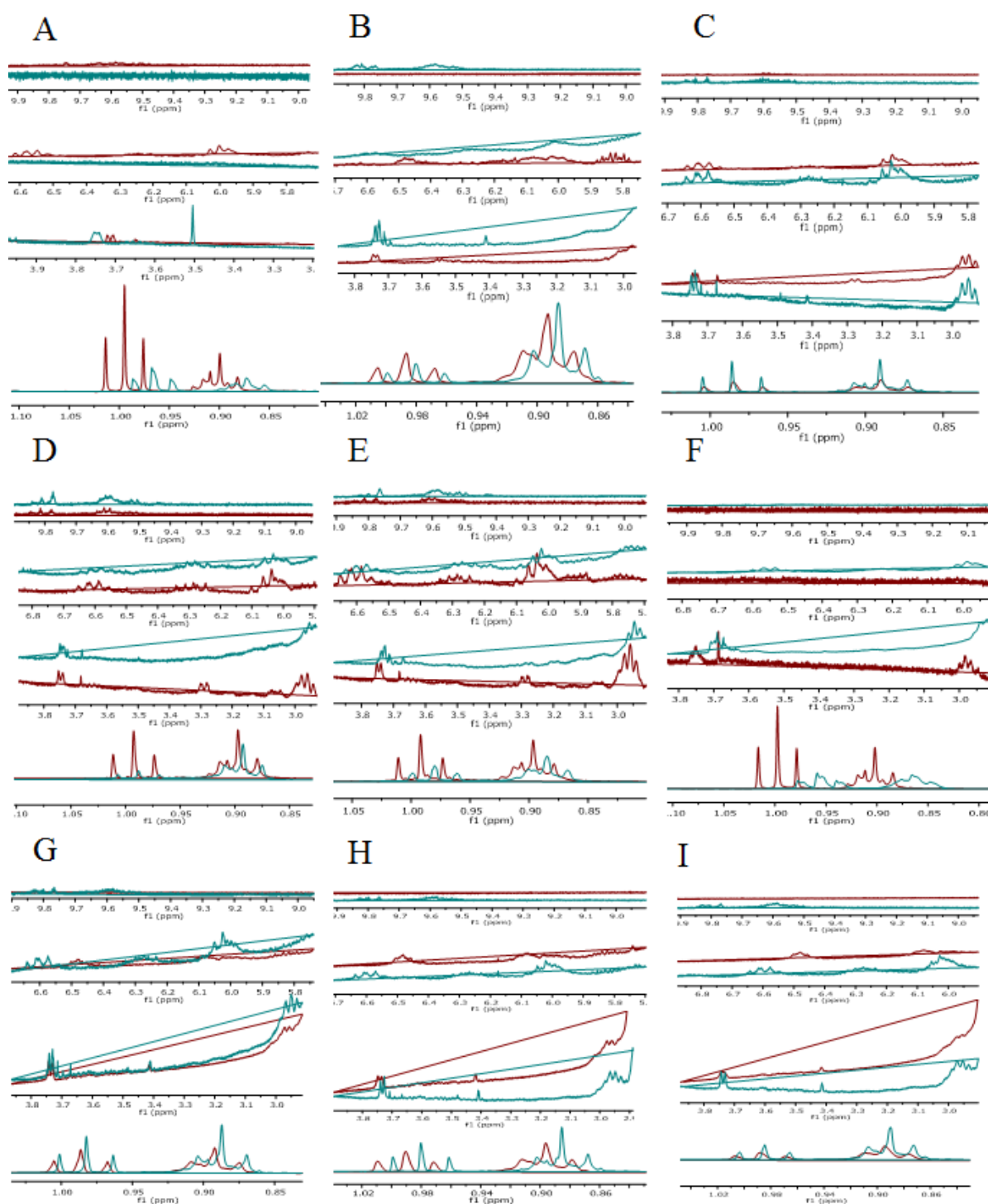


Figure 4 - Partial ^1H NMR spectra of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl_3 . The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The red line matches the unheated sample

Figure 5 shows the expansions of the IR spectra of the oils subjected to the Schaal test. Unlike what was observed in the ^1H NMR technique, the formation of peroxides were more expressive in LO, as shown by the expansion A, absorption band around 3020 cm^{-1} . Blends with major LO, showed that the behavior was similar. Isomerization was observed in the IR spectra of the LO and CLO oils, evidenced by the increase in the intensity of the band at 968 cm^{-1} , Figure 6. Also, hydrolysis reactions were observed in these oils indicated by the increase of the absorption bands in 3520 cm^{-1} , Figure 6. In the blends with major LO content was observed a degree of degradation not expected, since LO is more stable than CLO, but these results were in accordance with the behavior of blends in the ^1H NMR technique.

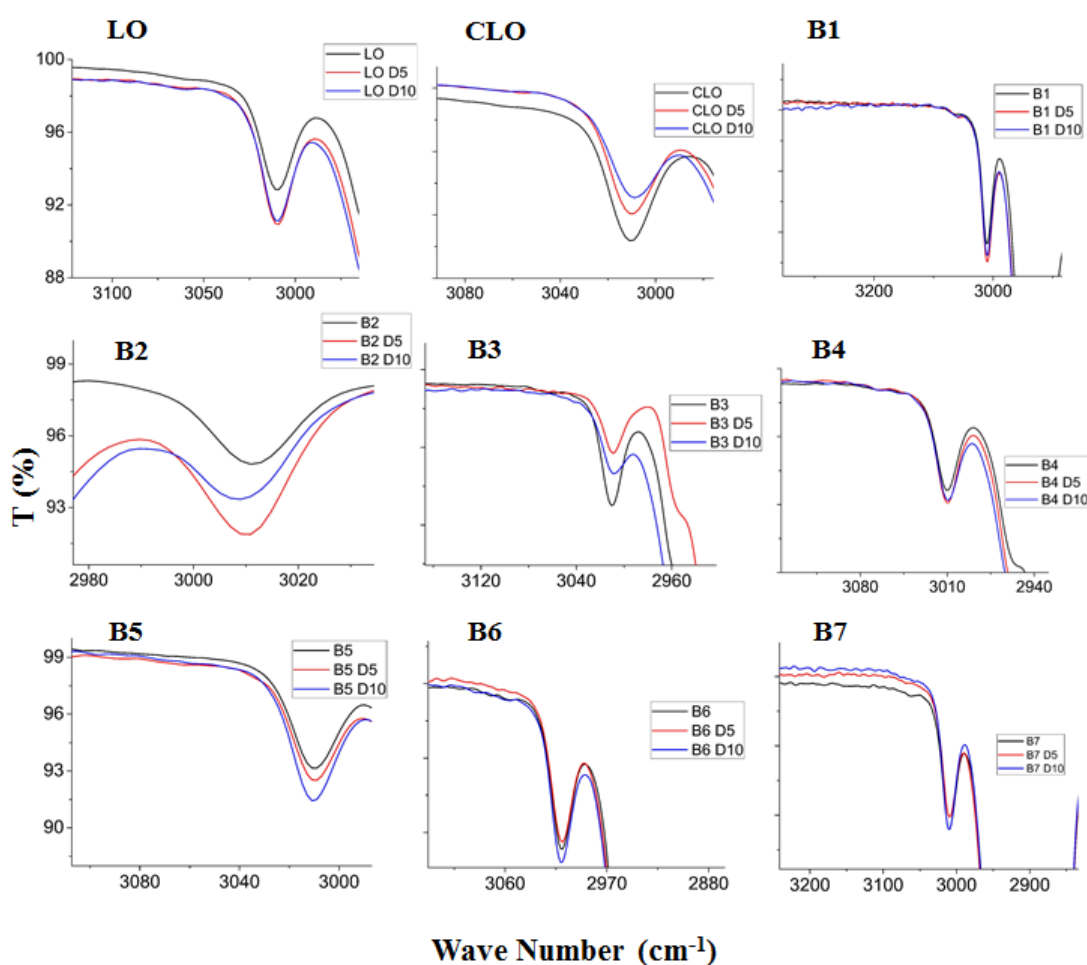


Figure 5 - Partial FTIR of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl₃. The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The black line matches the unheated samples, red

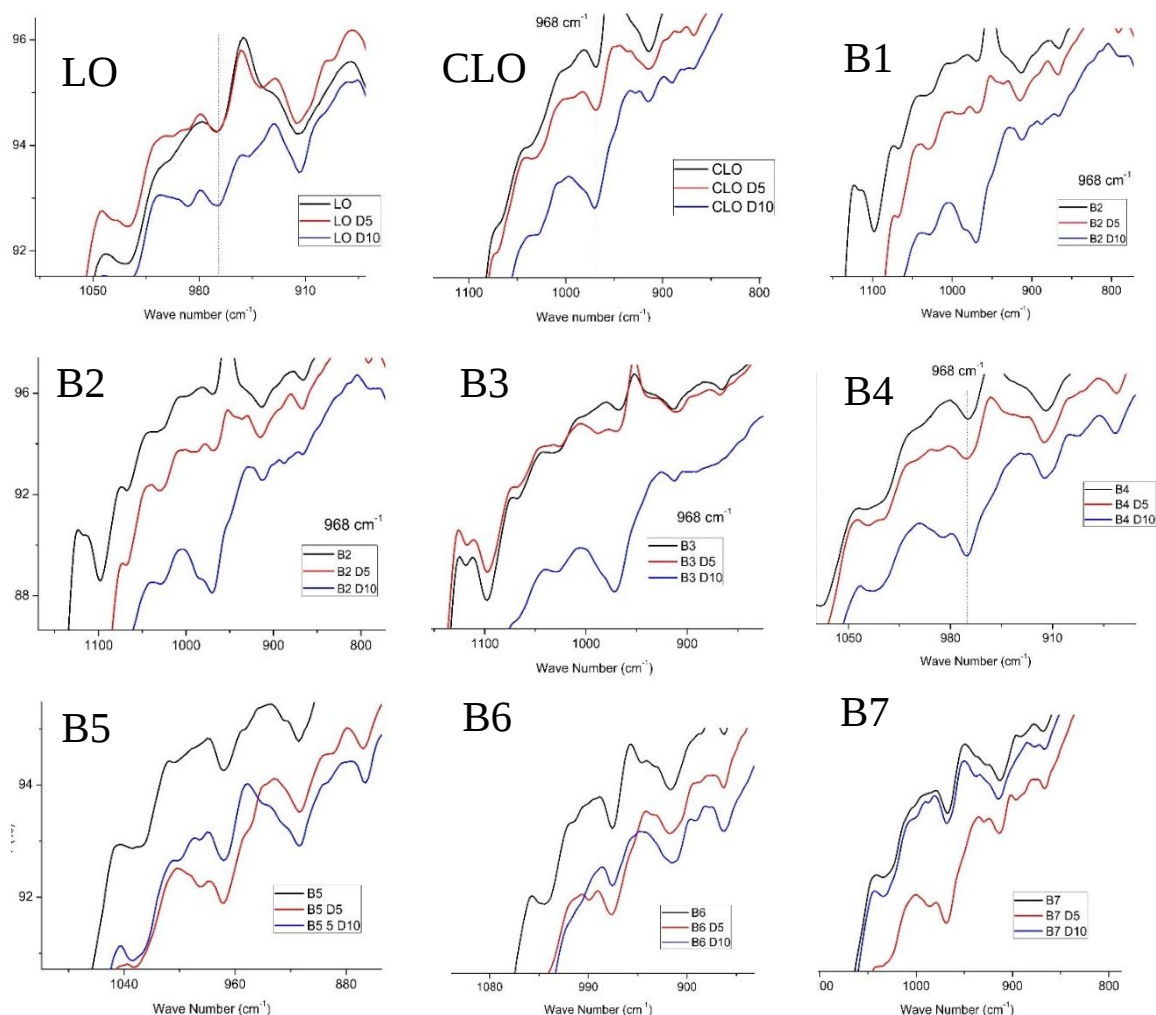


Figure 6 - Partial FTIR of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl₃. The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The black line matches the unheated samples, red.

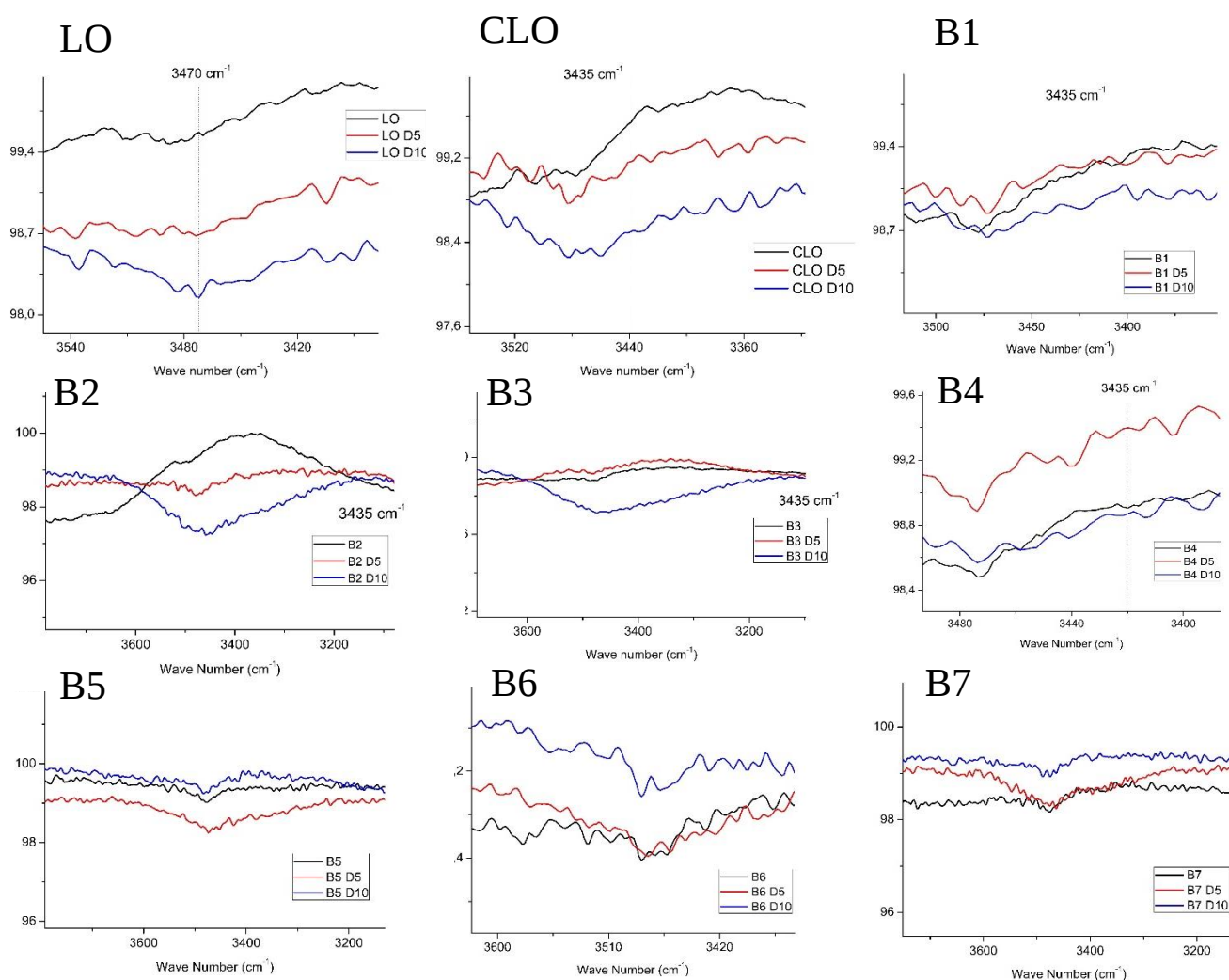


Figure 7 - Partial infrared spectra of blends linseed oil/cold liver oil (LO/CLO) recorded in CDCl₃. The blends (LO/CLO) proportions (w/w) as follows: B1 (8:2), B2 (7:3), B3 (6:4), B4 (1:1), B5 (4:6), B6 (3:7) and B7 (2:8). The black line matches the unheated.

4. Conclusion

The strategy of using linseed oil and cod liver oil to prepare blends with higher omega-3 content and greater oxidative stability than cod liver oil has proven to be quite efficient. The seven blends obtained showed a considerable increase in the omega-3 content and all showed greater oxidative stability than cod liver oil. This data is relevant, considering the possible use of these blends as functional foods, however, in future studies it is appropriate to determine the vitamin D content, to characterize the metallic profile of the oils

and blends, as well it to make a clinical evaluation of the effect of the addition of linseed oil in the functional properties of cod liver oil.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of this article.

Acknowledgements

The authors acknowledge support from the Financier of Studies and Projects (FINEP), the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

References

Akerele, O. A.; Cheema, S. K. (2016). A balance of omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids is important in pregnancy. *Journal of Nutrition and Intermediary Metabolism*, 5, 23-33.

Al-nozha, M. M. et al (2016). Coronary artery disease and diabetes mellitus. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11, 330-338.

AOCS (2009). Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society. Champaign: Champaign: AOCS.

Castro, P. et al. Linseed oil inclusion in sea bream diets: Effect on fatty acid composition during ice storage. (2010). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 112, 985-993. CHANG 2010

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION - FAO/WHO, Codex Alimentarius, Fats, Oils and Related Products. 2.ed. Roma: Secretariat of the Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Roma, 1999.
SECTION 2. Codex Standards for Fats and Oils from Vegetable Sources

Corrêa, C. F. (2015). Fontes de ácidos graxos da dieta no desempenho da tilápia-do-nil em temperatura ótima e subótima. 2015. 106 f. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

Elzey, B., Pollard, D.; Fakayode, S. (2016). Determination of adulterated neem and flaxseed oil compositions by FTIR spectroscopy and multivariate regression analysis. *Food Control*, 68, 303-309.

García-Moreno, P. J. et al (2013). Influence of the parameters of the Rancimat test on the determination of the oxidative stability index of cod liver oil. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 303-308.

Gómez-Cortés, P., Brenna, J., Lawrence, P., De La Fuente, M. (2016). Novel characterisation of minor α -linolenic acid isomers in linseed oil by gas chromatography and covalent adduct chemical ionisation tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 200, 141-145.

Guillén, M. D., Ruiz, A., Cabo, N. (2004). Study of the oxidative degradation of farmed salmon lipids by means of Fourier transform infrared spectroscopy. Influence of salting. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 1528-1534.

Guillén, M. D., Carton, I, Goicoechea, E., Uriarte, P. S. (2008). Characterization of cod liver oil by spectroscopic techniques. New approaches for the determination of compositional parameters, acyl groups, and cholesterol from ¹H nuclear magnetic resonance and Fourier transform infrared spectral data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 9072-9079.

Guillén, M. D., & Uriarte, P. S. (2012). Monitoring by ¹H nuclear magnetic resonance of the changes in the composition of virgin linseed oil heated at frying temperature. Comparison with the evolution of other edible oils. *Food Control*, 28, 59–68.

Homayooni, B., Sahari, M. A., & Barzegar, M (2014). Concentrations of omega-3 fatty acids from rainbow sardine fish oil by various methods. *International Food Research Journal*, 21, 743–748.

Hashempour-Baltork, F., Torbati, M., Azadmard-Damirchi, S., Savage, G.(2016). Vegetable oil blending: A review of physicochemical, nutritional and health effects. *Trends in Food Science and Technology*, 57, 52-58.

Hongjian, P. et al. (2013). Omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation improves neurologic recovery and attenuates white matter injury after experimental traumatic brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 33, 1474-1484.

Hutchins, A. M. et al (2013). Daily flaxseed consumption improves glycemic control in obese men and women with pre-diabetes: a randomized study. *Nutrition Research*, 33, 367-375.

Ibargoitia, M. L., Sopelana, P., Guillén, M. D. (2014). ¹H Nuclear Magnetic Resonance monitoring of the degradation of margarines of varied compositions when heated to high temperature. *Food Chemistry*, 165, 119-128.

Kostik, V., Memeti, S., Bauer, B. (2013). Fatty acid composition of edible oils and fats. *Journal of Hygienic Engineering and Design*, 1, 112-116.

Kowalski, B. (1990). Evaluation of the Stability of Some Antioxidants for Fat-Based Food. *Thermochimica Acta*, 177, 9-14.

Lee, J. B. et al. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCBs), heavy metals and omega-3 fatty acids in commercially available Korean functional fish oil supplements (2016). *International Journal of Food Science and Technology*, 51, 2217–2224.

Lei, Q. et al. (2016). Enrichment of omega-3 fatty acids in cod liver oil via alternate solvent winterization and enzymatic interesterification. *Food Chemistry*, 199, 364–371.

Lentjes, M. A. H. et al. (2014). Cod Liver Oil Supplement Consumption and Health: Cross-sectional Results from the EPIC-Norfolk Cohort Study. *Nutrients*, 6, 4320-4337.

Marcone, M. F. (2013). Diverse food-based applications of nuclear magnetic resonance (NMR) technology. *Food Research International*, 51, 729–747.

Marpalle, P. et al. (2015). Nutritional characterization and oxidative stability of α -linolenic acid in bread containing roasted ground flaxseed. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 510-515.

Nieva-Echevarría, B.; Goicoechea, E.; Guillén, M. D. (2017). Effect of the presence of protein on lipolysis and lipid oxidation occurring during in vitro digestion of highly unsaturated oils. *Food Chemistry*, 235, 21-33.

Reddy, K. J., Jayathilakan, K., Pandey, M. C., & Radhakrishna, K. (2012). Evaluation of the physico-chemical stability of rice bran oil and its blends for the development of functional meat products. *International Journal of Food and Nutritional Sciences*, 2, 46-53.

Rohman, A.; Man, C.; Yaakob, B. Application of Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy combined with chemometrics for authentication of cod-liver oil. *Vibrational Spectroscopy*, 55, 141-145.

Rubio-Rodríguez, N. et al. (2012). Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: a review. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, 1-12, 2012.

Shadyro, O., Sosnovskaya, A., Edimecheva, I. (2017). Flaxseed oil stabilization using natural and synthetic antioxidants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 119, 1-11.

Sicińska, P. et al (2015). The use of various diet supplements in metabolic syndrome. *Postępy Hig Med Dosw*, 9, 25-33.

Silva, L., Pinto, J., Carrola, J., Paiva-Martins, F. (2010). Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *Food Chemistry*, 121, 1177-1187.

Souza, A. L. et al. (2017). A complete evaluation of thermal and stability of chia oil: The richest natural source of α -linolenic acid. *J Therm Anal Calorim*, 130, 1307-1315.

Sun, X. et al. (2015). Fatty acid profiles-based adulteration detection for flaxseed oil by gas chromatography mass spectrometry. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 430-436.

Symoniuk, E., Ratusz, K., Krygier, K. (2016). Comparison of the oxidative stability of linseed (*Linum usitatissimum* L.) oil by pressure differential scanning calorimetry and Rancimat measurements. *Journal of Food Science and Technology*, 53, 3986-3995.

Tian, X. (2013). Chemical Factors Affecting Degradation Processes of Vegetable Oils during Frying. Ph.D. Food Science, Rutgers University, New Brunswick, NJ.

Vicente, J. et al. (2015). Fatty acids profile of Sacha Inchi oil and blends by ^1H NMR and GC-FID. *Food Chemistry*, 181, 215-221.

Wu, S. et al. (2015). Omega-3 fatty acids intake and risks of dementia and Alzheimer's disease: A meta-analysis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 48, 1-9.

Yates, C. M., Calder, P. C., Ed Rainger, G. (2014). Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 141, 272-282.