

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL
CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

MARINA DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO
ALFA-LINOLÊNICO BASEADO NA FORMAÇÃO DE ADUTOS COM
UREIA: EFEITO DA TEMPERATURA E DA QUANTIDADE DE
ÉSTERES METÍLICOS**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TOLEDO
2013

MARINA DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO
ALFA-LINOLÊNICO BASEADO NA FORMAÇÃO DE ADUTOS COM
UREIA: EFEITO DA TEMPERATURA E DA QUANTIDADE DE
ÉSTERES METÁLICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II do curso superior de Tecnologia em Processos Químicos da Coordenação de Processos Químicos - COPEQ - da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Clayton Antunes Martin

TOLEDO

2013

**TERMO DE APROVAÇÃO
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

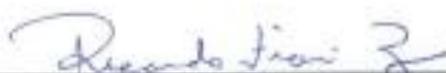
MARINA DE OLIVEIRA

**OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE CONCENTRAÇÃO DO ÁCIDO ALFA-
LINOLÊNICO BASEADO NA FORMAÇÃO DE ADUTOS COM UREIA:
EFEITO DA TEMPERATURA E DA QUANTIDADE DE ÉSTERES METÁLICOS**

Trabalho apresentado como forma de avaliação para o Trabalho de Conclusão de Curso do curso de Tecnologia em Processos Químicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, *Campus Toledo*, e aprovado pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Clayton Antunes Martin
Orientador – UTFPR Campus Toledo



Prof. Dr. Ricardo Fiori Zara
Primeiro membro – UTFPR Campus Toledo



Prof. Dra. Tatiana Shioji Tieman
Segundo membro – UTFPR Campus Toledo

Toledo, 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente meus pais, madrinha e namorado, que sempre me apoiaram e não mediram esforços para que eu estivesse aqui, concluindo um curso de nível superior.

Um muito obrigada também ao meu professor e orientador Clayton Antunes Martin, por todo o acompanhamento durante o projeto de iniciação científica, projeto e apresentação do Trabalho de Conclusão de Curso, pois com isso adquiri muita experiência e conhecimento que contribuirão para minha vida profissional.

Agradeço ainda aos amigos, Marina Oliveira, Elissandro Klein, Karine Dassoler, Sonia Böes, Paula Petry, ao pessoal do laboratório da BRF, por estarem sempre presentes, mesmo que de longe, me entendendo e me ajudando incessantemente a persistir e alcançar meus objetivos.

RESUMO

OLIVEIRA, Marina; Otimização do processo de concentração do ácido alfa-linolênico baseado na formação de adutos com ureia: efeito da temperatura e da quantidade de ésteres metílicos. 2013. 37 f. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos)- Coordenação de Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Toledo, 2013.

O ácido alfa-linolênico (AAL) tem uma importante função no organismo, que está associada à diminuição do risco da doença cardiovascular. Além disso, atua como precursor dos ácidos eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que apresentam efeitos fisiológicos favoráveis em relação ao controle e a prevenção de doenças cardiovasculares, hipertensão, depressão, distúrbios inflamatórios e autoimunes e alterações neurológicas. As principais fontes do AAL são os óleos de linhaça, canola, perila, chia e peixes de origem marinha. Existem diversos métodos para concentrar o AAL, porém a formação de adutos com ureia destaca-se devido ao baixo custo e aos níveis elevados de rendimento. Assim, o objetivo deste estudo foi otimizar o aumento da concentração do AAL proveniente do óleo de linhaça, por meio da formação de complexos de adição com a ureia, utilizando um planejamento fatorial 2^3 , tendo como fatores: razão massa de ureia/massa de ésteres metílicos de ácidos graxos (A); temperatura de reação (B) e condição de tempo e temperatura de cristalização (C). O modelo obtido para a superfície de resposta, em termos das variáveis codificadas ($Y = 76,79 + 2,54A - 0,60B + 3,19C - 3,84AC + 1,27ABC$), apresentou coeficiente de determinação de 0,9850, sendo altamente significativo ($p < 0,0001$). O ponto ótimo foi determinado pelo método SIMPLEX, tendo os valores de 2 para o fator A, 50 °C para B e a condição 2, de resfriamento mais lento para C. Nesta condição, o teor de AAL foi de 83,14%, correspondendo a um aumento de 50,32% na concentração deste ácido, em relação ao seu teor no óleo de linhaça (55,31%). A obtenção de concentrados de AAL permite a incorporação deste ácido graxo n-3 em alimentos industrializados, sem aumentar de forma significativa o teor de lipídios do alimento.

Palavras-chave: ácido alfa-linolênico, planejamento fatorial, concentração.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Marina; Optimization of the concentration of α -linolenic acid based on the formation of adducts with urea: Effect of temperature and amount of the methyl esters. 2013. 37 f. Monografia (Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos)- Coordenação de Processos Químicos – COPEQ – da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Toledo, 2013.

The α -linolenic acid has an important function in the body, which is associated with decreased risk of cardiovascular disease. Furthermore, it acts as a precursor of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), which have favorable physiological effects related to the control and prevention of cardiovascular disease, hypertension, depression, inflammatory and autoimmune disorders and neurological disorders. The main sources of ALA are flaxseed oil, canola oil, perilla, chia and fish of marine origin. There are several methods to concentrate the ALA, but the formation of adducts with urea stands out due to low cost and high levels of efficiency. The objective of this study was to optimize the concentration of ALA from linseed oil, through the formation of complexes added with urea, using a factorial design 2^3 , with the factors: mass ratio of urea / mass esters fatty acid methyl (A), reaction temperature (B) and weather condition and crystallization temperature (C). The obtained model for the response surface in terms of the coded variables ($Y = 76,79 + 2.54 A - 0.60 B + 3.19 C - 3.84 1.27 AC + ABC$), showed a correlation coefficient of 0.9850 and highly significant ($p < 0.0001$). The optimum was determined by SIMPLEX, having values of 2 for factor A, 50 ° C to B and condition 2, cooling slower to C. In this condition, the content of ALA was 83,14%, corresponding to a 50,32% increase in the concentration of the acid in relation to their amount in the linseed oil (55,31%). The obtained concentrate ALA allows the incorporation of the n-3 fatty acid in foods, without significantly increasing the lipid content of the food.

Keywords: α -linolenic, factorial design, concentration.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estruturas dos Ácidos Linoleico (a) e alfa-linolênico (b)	15
FIGURA 2 - Mecanismo da reação de transesterificação de um triacilglicerol com NaOH em metanol.....	17
FIGURA 3 - Estrutura Hexagonal dos cristais/adutos de ureia	19
FIGURA 4 - Fluxograma do processo de obtenção dos EMAG	21
FIGURA 5 - Fluxograma de obtenção dos adutos de ureia.	23
FIGURA 6 - Cromatograma dos EMAG obtidos do óleo de linhaça.....	26
FIGURA 7 - Cromatograma dos EMAG obtido após otimização de concentração. ..	28
FIGURA 8 - Gráfico de distribuição dos resíduos para o AAL.....	29
FIGURA 9 - Superfície de resposta obtida para A e C, B = -1	30
FIGURA 10 - Gráficos de interação para (1): A e C, com B=-1; (2): A e C, com B=1	32

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Variáveis Reais e Codificadas do Planejamento Fatorial	22
TABELA 2 - Condições dos Experimentos	23
TABELA 3 - Concentração dos EMAG, em porcentagem de área, obtidos para o óleo de linhaça	26
TABELA 4 - Concentração de AAL em óleo de linhaça obtidos dos experimentos do planejamento fatorial 2 ³	27
TABELA 5 - ANOVA do planejamento fatorial 2 ³	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPI – Ácidos Graxos Poli-insaturados
AAL – Ácido Alfa-Linolênico
AL – Ácido Linoleico
EPA – Ácido Eicosapentaenóico
DHA – Ácido Docosaexaenóico
DPA - Ácido Docosapentaenóico
CLA – Ácido Linoleico Conjugado
CLNA – Ácido Linolênico Conjugado
EMAG – Ésteres Metílicos de Ácidos Graxos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	OBJETIVOS.....	12
1.1.1	Objetivo Geral.....	12
1.1.2	Objetivos Específicos.....	12
1.2	JUSTIFICATIVA.....	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	ÁCIDOS GRAXOS	14
2.2	ÁCIDOS GRAXOS E O HOMEM	14
2.3	ÓLEO DE LINHAÇA.....	15
2.4	ISÔMEROS CONJUGADOS	16
2.5	REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO	17
2.6	ADUTOS COM UREIA	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	MATERIAL E REAGENTES UTILIZADOS	20
3.2	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	20
3.3	METODOLOGIA	20
3.3.1	Purificação da ureia por recristalização	20
3.3.2	Esterificação dos lipídios.....	21
3.3.3	Ensaio de recristalização dos ácidos graxos com a ureia	22
3.3.4	Análise Cromatográfica	24
3.3.5	Identificação dos ésteres metílicos.....	25
3.3.6	Otimização e análise estatística	25
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1	DETERMINAÇÃO DO PONTO ÓTIMO	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	34
	REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

Os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) são muito importantes para a nutrição humana e a prevenção de doenças. Estes são classificados em ômega-9 (ω -9), ômega-6 (ω -6) e ômega-3 (ω -3). O ácido alfa-linolênico (AAL), da família ω -3, é o precursor dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), que são sintetizados pela ação de enzimas alongase e dessaturase. A ação dessas enzimas depende de vários fatores, tais como o envelhecimento, diabetes, alcoolismo, *stress*, ingestão elevada de gorduras *trans*, que contribuem para diminuir a produção destes ácidos graxos no organismo. Ainda que em baixas concentrações estes ácidos são usados pelo corpo para prevenir doenças cardiovasculares, hipertensão, depressão, distúrbios inflamatórios e autoimunes e certas alterações neurológicas (GU *et al*, 2009).

Os ácidos linoleico (AL) e alfa-linolênico são considerados estritamente essenciais ao organismo, pois são imprescindíveis ao seu funcionamento, e este não os sintetiza. Devem então ser ingeridos na alimentação. As principais fontes destes ácidos graxos são os óleos vegetais, como o óleo de soja, girassol e milho (fonte de ômega-6) e óleo de linhaça, canola e até peixes como fonte de ômega-3 (CARMO; CORREIA, 2009). Já os ácidos graxos EPA e DHA também são importantes ao organismo, porém não são estritamente essenciais. Caso o consumo de AL e AAL esteja adequado, e o corpo não sofra distúrbios que possam afetar nas reações de alongamento e dessaturação da cadeia carbônica, estes ácidos graxos não precisam ser ingeridos diretamente na alimentação. Do contrário, a ingestão de algas, peixes de origem marinha e outras fontes diretas de DHA e EPA devem ser ingeridas.

São utilizados diversos métodos para a concentração do AAL. Teshima *et al.* (1978), empregou a cromatografia líquida de alta eficiência com colunas impregnadas com nitrato de prata, para efetuar a concentração dos ácidos eicosapentaenoico (20:5 n-3) e docosaexaenóico (20:6 n-3), e obteve bons resultados, variando de 85-96% e 95-98%, respectivamente. Stout e Spinelli (1987) fizeram a concentração do ácido 20:6n-3 através da extração por fluido supercrítico em ésteres etílicos de óleo de peixes marinhos, porém, não obtiveram resultados

muito satisfatórios se comparado a outros métodos, atingindo o nível de 65% de concentração.

A comparação de resultados obtidos pelos métodos descritos na literatura, para a concentração de ácidos graxos, indica que a concentração do AAL por meio da formação de adutos com a ureia apresenta uma grande potencialidade, levando-se em consideração o seu baixo custo, simplicidade de trabalhar e os bons resultados que vem atingindo (GAMERO *et al*, 2011).

Considerando a importância fisiológica do AAL, já que este vem despertando grande interesse para a prevenção de diversas doenças, este trabalho teve como objetivo concentrar o AAL em óleo de linhaça, ajustando as condições necessárias para melhores resultados e menores custos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Realizar a otimização do processo de concentração do ácido alfa-linolênico proveniente do óleo de linhaça baseando-se na formação de adutos com ureia.

1.1.2 Objetivos Específicos

→ Avaliar o efeito das variáveis: razão entre massa de ureia por massa de ésteres metílicos de ácidos graxos do óleo de linhaça, temperatura de reação e condições de tempo e temperatura de cristalização, sob a concentração final do ácido alfa-linolênico.

→ Realizar os experimentos baseando-se na metodologia do Planejamento Fatorial, utilizando dois níveis e três fatores, a fim de realizar todas as possíveis combinações entre as variáveis.

→ Determinar a concentração de ácidos graxos do óleo de linhaça através de cromatografia a gás e comparar a composição dos ácidos graxos do óleo de linhaça antes e depois do processo de concentração.

→ Realizar a análise estatística dos resultados do experimento e obter o modelo de superfície de resposta para a concentração do ácido alfa-linolênico, bem como determinar a melhor condição por meio do método SIMPLEX.

1.2 JUSTIFICATIVA

Os ácidos graxos poli-insaturados das famílias n-6 e n-3 tem fundamental importância para a saúde do homem, prevenindo diversos problemas de saúde e melhorando a qualidade de vida, devendo ser ingeridos regularmente através da alimentação. A razão entre o total de ácidos graxos n-6 e n-3 (n-6/n-3) tem sido relacionada com o desenvolvimento de uma condição saudável bem como com a predisposição para o desenvolvimento de várias doenças, dependendo do seu valor na dieta. Diversos estudos recomendam que o valor da razão n-6/n-3 da dieta esteja entre 4:1 e 10:1 para que haja uma condição saudável do indivíduo. Em vários países tem sido relatada a ocorrência de razões muito superiores a este intervalo, cujos efeitos são associados principalmente com o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e alérgicas.

Nesse contexto, é preciso desenvolver alternativas para elevar a ingestão de ácidos graxos n-3. Considerando que a maioria dos alimentos industrializados apresenta baixos teores de ácidos graxos n-3, a incorporação de misturas de ácido alfa-linolênico e linoleico, com elevado teor do primeiro, podem contribuir para diminuir a razão n-6/n-3 no alimento.

Além disso, a obtenção de uma mistura contendo somente os ácidos alfa-linolênico e linoleico pode ser de grande importância para o desenvolvimento de futuros trabalhos sobre a preparação de ácidos graxos conjugados, considerando os efeitos favoráveis que tem sido observados em vários estudos envolvendo neoplasias e obesidade.

Assim é necessário desenvolver e otimizar processos que aumentem a concentração do ácido alfa-linolênico, a partir de óleos vegetais com teor elevado deste ácido, como o óleo de linhaça, e que tenham baixo custo. A complexação com ureia é descrita na literatura como sendo simples e de baixo custo, proporcionando um rendimento elevado. Por essa razão, o presente estudo empregou o fracionamento dos ácidos graxos presentes no óleo de linhaça por meio da formação de adutos com ureia.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDOS GRAXOS

Ácidos graxos são compostos orgânicos formados por uma cadeia de hidrocarbonetos com um grupo carboxílico geralmente delimitado com glicerol, formando então os chamados acilgliceróis (mono, di ou triacilgliceróis). Dependendo da natureza da cadeia de hidrocarbonetos, os ácidos graxos podem ser saturados (apenas ligações simples), mono (uma ligação dupla) ou poli-insaturados (apresentando duas ou mais ligações duplas) (RUBIO-RODRÍGUEZ, 2009). Geralmente as gorduras apresentam ácidos graxos saturados em sua composição, já, os óleos, apresentam ácidos graxos insaturados (VISENTAINER, 2003, p.13).

2.2 ÁCIDOS GRAXOS E O HOMEM

Muitos ácidos graxos podem ser sintetizados pelo homem, porém existe um grupo de poliinsaturados (AGPI) que o organismo não produz: os ácidos graxos da família ômega-3 (n-3) e ômega-6 (n-6). O principal ácido graxo da família n-3 é o ácido alfa-linolênico (18:3n-3, AAL) e o da família n-6 é o ácido linoleico (18:2n-6, AL) (Figura 1). A partir destes, podem ser sintetizados ácidos importantes ao organismo, como o eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA), provenientes do ácido alfa-linolênico, e o ácido docosapentaenóico (DPA) sintetizado a partir do ácido linoleico. Estes ácidos são sintetizados a partir da ação de enzimas alongase e dessaturase. As alongases atuam adicionando dois átomos de carbono à parte inicial da cadeia, e as dessaturases agem oxidando dois carbonos da cadeia, originando uma dupla ligação com a configuração *cis* (MARTIN *et al*, 2006). Porém, a conversão do AAL em EPA e DHA e do AL em DPA é muito baixa, e com o envelhecimento ou em determinadas doenças como a diabetes pode ocorrer a diminuição da atividade enzimática das enzimas dessaturases, o que torna os ácidos EPA, DHA e DPA essenciais na alimentação. Além disso, foi relatado que

o consumo moderado de ácidos graxos altamente insaturados está associado um risco reduzido de câncer e doenças cardiovasculares em humanos e animais estudados (NAGAO; YANAGITA, 2005).

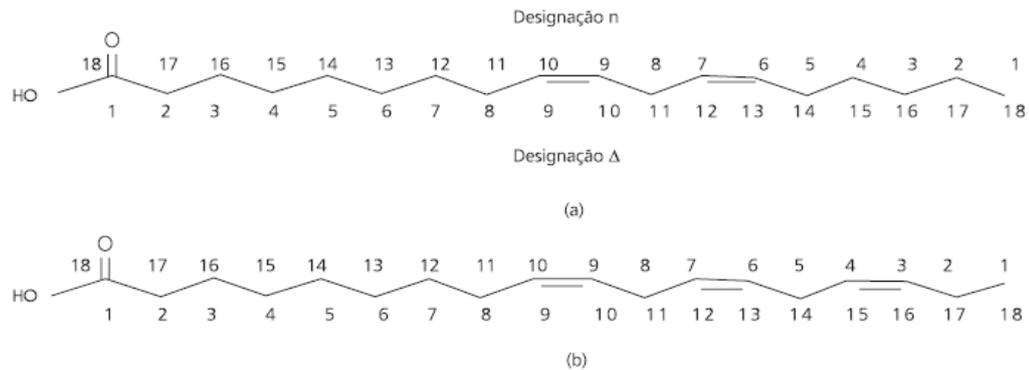


Figura 1 – Estruturas dos Ácidos Linoleico (a) e alfa-linolênico (b)
 Fonte: MARTIN *et al*, 2006.

2.3 ÓLEO DE LINHAÇA

As grandes fontes alimentares do AL são os óleos de soja, girassol e milho, e do AAL são os óleos de linhaça, canola, perilla e peixes de origem marinha. A semente de linho possui uma variação aproximada de 32 a 38% de óleo, denominado popularmente de óleo de linhaça, o qual apresenta teores elevados de AAL (44,6 a 51,5%), comparado com os principais ácidos graxos que constituem o óleo de linhaça, como o ácido oléico (ômega-9), com cerca de 19% e o ácido linoleico (15%). Sendo assim, o óleo de linhaça se torna uma das maiores fontes do AAL (CEOTTO, 2000).

2.4 ISÔMEROS CONJUGADOS

O termo ácido graxo conjugado é utilizado para descrever os isômeros posicionais e geométricos dos ácidos graxos poli-insaturados com duplas ligações conjugadas. Entre diversos isômeros, os representantes dos ácidos graxos essenciais são o CLA (ácido linoleico conjugado) e o CLNA (ácido linolênico conjugado), provenientes dos ácidos linoleico e alfa-linolênico, respectivamente (KOBA; BELURY; SUGANO, 2007).

Estudos indicam que os ácidos graxos conjugados possuem potentes efeitos benéficos ao organismo, entre eles: atividade antitumoral, antiobesidade, anticarcinogênica e antidiabética. As moléculas também demonstraram prevenir o surgimento da hipertensão (NAGAO; YANAGITA, 2005).

O CLA corresponde a um grupo de ácidos graxos que abrange oito isômeros geométricos, contudo, dois tendem a ser os isômeros predominantemente encontrados naturalmente em tecidos animais. Os animais ruminantes e seus produtos constituem as principais fontes naturais de CLA (COOK; PARIZA, 1998).

O CLNA pode ser preparado sinteticamente a partir do óleo de linhaça, fonte de AAL, por isomerização alcalina. Diferentemente do CLA, os estudos dos efeitos fisiológicos dos CLNA ainda são bastante limitados. Contudo, mesmo limitados, testes feitos *in vivo* e *in vitro* demonstram resultados promissores em relação a atividade do CLNA contra o câncer, obesidade e até sob funções imunológicas (KOBA; BELURY; SUGANO, 2007).

Cada isômero de ácido graxo têm diferentes funções, por exemplo, o isômero 10-*trans*,12-*cis*, proveniente do ácido linoleico possui propriedades anticarcinogênicas, antiobesidade e efeitos antidiabéticos (KOBA; BELURY; SUGANO, 2007).

Porém, ainda há poucos relatos sobre os reais efeitos dos ácidos graxos conjugados nos seres humanos. São necessárias avaliações mais detalhadas da atividade fisiológica dos isômeros no corpo para uma melhor conclusão (NAGAO, YANAGITA, 2005).

2.5 REAÇÃO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

A reação entre triacilgliceróis, principais componentes dos óleos e gorduras, com monoalcoóis de cadeia curta como o metanol ou o etanol, é denominada de transesterificação. Quando a formação de ésteres metílicos ou etílicos de ácidos graxos ocorre a partir de um ácido graxo livre, a reação é denominada de esterificação (ALLINGER, 1978). Os ésteres podem ser metílicos (EMAG), caso a reação de transesterificação ocorra com o metanol, ou então etílicos (EEAG), caso o álcool utilizado seja o etanol. O álcool tem a função de fornecer o radical, metil ou etil, dependendo de qual for utilizado, para a formação do éster (VISENTAINER, 2011).

A transesterificação pode ocorrer por duas categorias: por catálise ácida e a catálise básica. Existe uma variedade de métodos envolvendo a catálise ácida, com procedimentos utilizando uma ou duas etapas e com aquecimento. Já os métodos envolvendo a catálise básica geralmente são rápidos, podendo ser realizados a temperatura ambiente em um curto intervalo de tempo (MILINSK, 2007).

A Figura 2 mostra as etapas da reação de transesterificação de triacilgliceróis por catálise básica, utilizando hidróxido de sódio (NaOH).

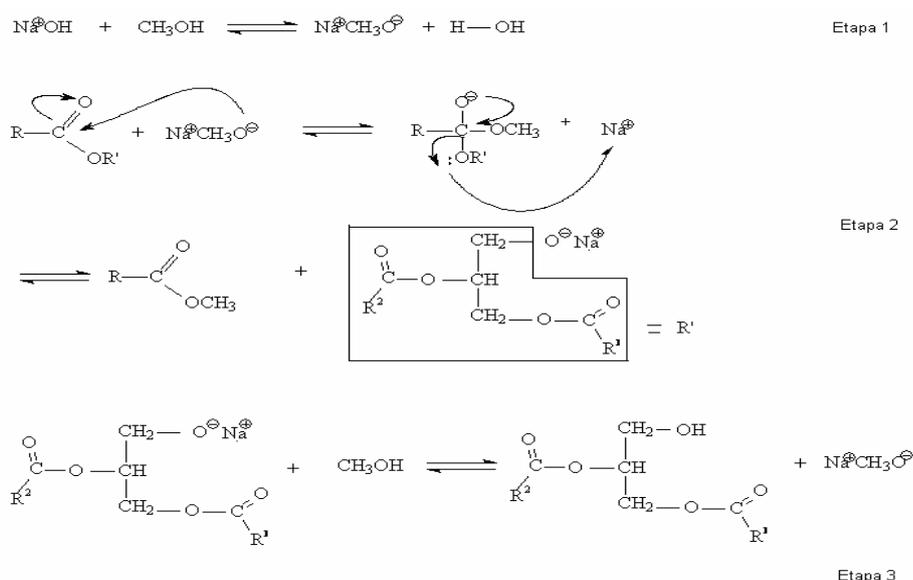


Figura 2 - Mecanismo da reação de transesterificação de um triacilglicerol com NaOH em metanol

Fonte: MILINSK, 2007.

2.6 ADUTOS COM UREIA

Existem diversos métodos para a concentração do AAL, como: cromatografia de adsorção, destilação molecular ou fracionada, extração por fluido supercrítico, transesterificação química e a formação de adutos de ureia (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1999).

A descoberta dos complexos de ureia é creditada à Bengen. Em 1940, Bengen descobriu ocasionalmente que compostos alifáticos de cadeia linear que contenham seis ou mais átomos de carbono formam complexos de ureia bem definidos, enquanto que compostos cíclicos e de cadeia ramificada não os formam. Em geral, quanto maior o comprimento da cadeia, maior a facilidade dos complexos se formarem e também maior sua estabilidade (SWERN, 2002).

A complexação com adutos de ureia é a forma mais simples e eficaz para a concentração de ácidos graxos. Esta é uma técnica bem estabelecida para a separação/eliminação de ácidos graxos saturados e monoinsaturados da fração lipídica. Inicialmente faz-se a esterificação dos ácidos graxos livres que existem no óleo. Os ésteres são então misturados a uma solução de etanol e ureia, com proporções pré-estabelecidas para que haja a formação dos complexos de ureia. A fração lipídica saturada e monoinsaturada se complexa facilmente com a ureia, formando assim os cristais. Já a parte líquida é rica em ácidos graxos poli-insaturados (WU *et al*, 2008).

A separação só é possível devido a algumas propriedades da geometria da ureia. A molécula de ureia em si tem forma tetragonal. Na presença de moléculas de cadeia longa, a ureia forma cristais hexagonais com canais de 8 a 12 Å de diâmetro (Figura 3). Porém, esses canais não são suficientes para acomodar cadeias carbônicas que contenham insaturações, já que estas aumentam o volume da molécula e também a curvam, diminuindo assim a probabilidade de ocorrer inclusão nos canais dos cristais de ureia (HARRIS, 1996).

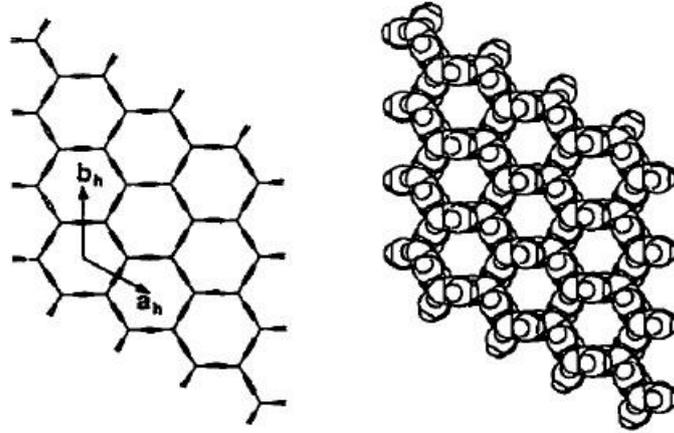


Figura 3 - Estrutura Hexagonal dos cristais/adutos de ureia
Fonte: Harris, 1996.

Esta técnica tem as vantagens de que os complexos de adição com a ureia são extremamente estáveis, além disso, é desnecessária a filtração à baixas temperaturas. O método também é favorecido devido ao fracionamento estar ligado à presença de ligações duplas e a sua configuração na estrutura do ácido graxo, não dependendo assim de propriedades físicas como ponto de ebulição ou solubilidade (WU *et al*, 2008).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL E REAGENTES UTILIZADOS

Para a realização deste trabalho foram utilizados os seguintes materiais: água destilada; balão de fundo chato; bastão de vidro; béquer 250 mL; eppendorf; espátula; funil de Büchner; funil de separação; kitassato; papel filtro; provetas graduadas 50, 100 e 250 mL; termômetro e óleo de linhaça.

Os reagentes que foram utilizados, todos de grau analítico: n-Hexano; metanol; etanol; ureia e hidróxido de sódio (NaOH).

3.2 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

Para a realização dos experimentos os equipamentos utilizados foram: agitador magnético com aquecimento, balança analítica modelo AY 220 (Shimadzu), estufa de secagem com renovação e circulação de ar (Solab), evaporador rotativo (Fisatom), banho ultra-termostático (Fisatom), geladeira e freezer (Bosch).

3.3 METODOLOGIA

3.3.1 Purificação da ureia por recristalização

Foram pesadas 50 g de ureia em um béquer, em seguida adicionado 50 mL de água e 100 mL de etanol. Após a solubilização, adicionou-se mais ureia até a formação de uma solução saturada. Em seguida, a solução foi aquecida até aproximadamente 60°C e depois da sua solubilização, resfriada em temperatura ambiente para sua cristalização. A solução foi filtrada, e os cristais de ureia levados

à estufa, a uma temperatura de 105 °C, permanecendo durante duas horas para a remoção da umidade (VOGEL, 1987).

3.3.2 Esterificação dos lipídios

Foram pesados 15 g de óleo de linhaça em um balão de fundo chato, em seguida adicionados 50 mL de n-hexano e 30 mL de NaOH 2 mol L⁻¹ em metanol. A mistura foi submetida a uma agitação vigorosa, durante um minuto, até a obtenção de solução levemente turva. A solução foi colocada em funil de separação, e após a separação de fases, a superior, contendo n-hexano e ésteres metílicos de ácidos graxos, foi concentrada em evaporador rotativo (Figura 4). Os ésteres metílicos foram armazenados em freezer (-18 °C) para posterior utilização (ISO, 1978).

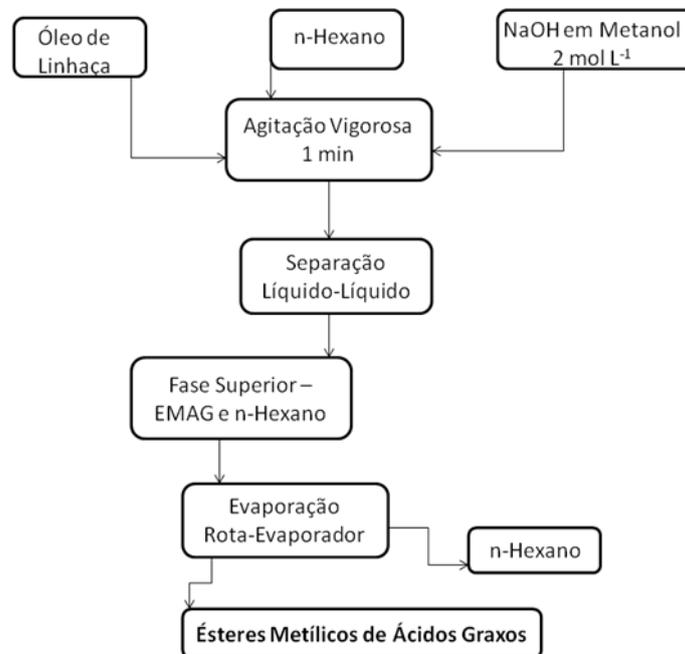


Figura 4 - Fluxograma do processo de obtenção dos EMAG

3.3.3 Ensaios de recristalização dos ácidos graxos com a ureia

A Tabela 1 mostra as condições utilizadas nos experimentos para a preparação das misturas de ácidos graxos com a ureia, utilizado um planejamento fatorial 2^3 (dois níveis e três fatores), tendo como variáveis: razão de massa de ureia por massa de éster metílico (A), a temperatura de reação (B) e a temperatura de cristalização (C). O nível baixo de cada fator é representado por (-1) e o nível alto, por (1).

Tabela 1 - Variáveis Reais e Codificadas do Planejamento Fatorial

Variáveis	Intervalos			
	Real		Codificado	
A. - m ureia (g)/m EMAG (g)	2,0	4,0	-1	1
B. - Temperatura de Reação	50°C	70°C	-1	1
C. - Condição de Cristalização	1 ^a	2 ^b	-1	1

^a Resfriamento a 5°C por 2h, e -18°C por 19h. ^b Resfriamento a 25°C por 1h, 5°C por 4h e -18°C por 16h.

Os experimentos foram preparados de acordo com as especificações a seguir:

- Em béqueres, pesaram-se diferentes massas de ureia (12 ou 6 g), de acordo com o planejamento fatorial;
- Em seguida, adicionados 120 mL de etanol;
- Para a solubilização da ureia, a mistura foi submetida a agitação, acompanhada de aquecimento, conforme descrito no Fator B (50 ou 70°C);
- Em béqueres separados, pesou-se a massa fixa de 3 g de ésteres metílicos de ácidos graxos, previamente preparado e já descongelado;
- A essa porção de EMAG adicionou-se então a mistura de ureia e etanol, já totalmente solubilizada;
- Os béqueres foram então fechados com papel filme, para evitar evaporação do álcool e a entrada de qualquer tipo de sujeira;

- A mistura é deixada por 21 horas na temperatura e tempo estabelecidos pelo Fator C para a cristalização (Figura 5).

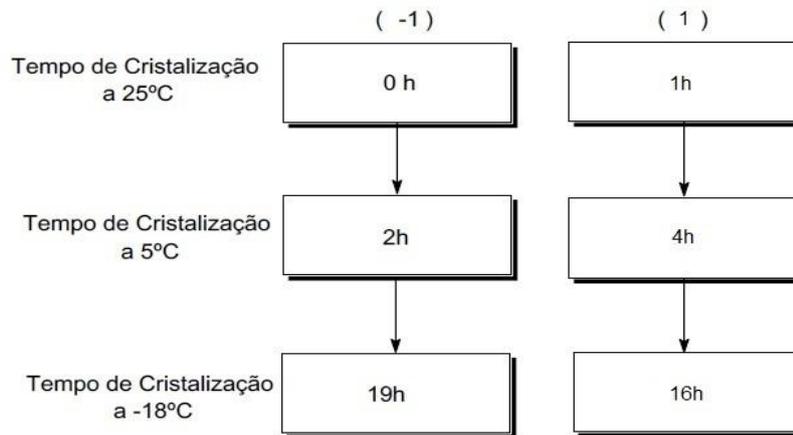


Figura 5 - Fluxograma de obtenção dos adutos de ureia.

Realizaram-se oito experimentos referentes ao planejamento fatorial (Tabela 2). Os experimentos foram realizados em três repetições.

Tabela 2 - Condições dos Experimentos

Experimento	Fatores				
	Massa (g)		Razão (A)	Temperatura Reação (B)	Condição Cristalização (C)
	Ureia	EMAG			
1	6,0	3,0	2	50°C	1 ^a
2	12,0	3,00	4	50°C	1 ^a
3	6,0	3,00	2	70°C	1 ^a
4	12,0	3,00	4	70°C	1 ^a
5	6,0	3,00	2	50°C	2 ^b
6	12,0	3,00	4	50°C	2 ^b
7	6,0	3,00	2	70°C	2 ^b
8	12,0	3,00	4	70°C	2 ^b

^a Resfriamento a 5°C por 2h, e -18°C por 19h. ^b Resfriamento a 25°C por 1h, 5°C por 4h e -18°C por 16h.

Para o tratamento dos cristais, foram realizadas as seguintes etapas:

- Filtraram-se a vácuo os adutos de ureia, sendo lavados com n-hexano, para a retirada de qualquer ácido graxo poli-insaturado que pudesse estar aderido as paredes dos cristais de ureia;
- Transferiu-se o filtrado então para um funil de separação ao qual se adicionaram 60 mL de n-hexano e 30 mL de água destilada.
- Coletou-se a parte superior contendo somente os EMAG;
- A parte inferior, contendo água, ureia e etanol, é submetida a uma segunda extração. Esse procedimento visava um melhor aproveitamento de algum EMAG que pudesse ter ficado na parte inferior no momento da separação. Adicionou-se 50% dos volumes anteriores de n-hexano e água destilada.
- Em seguida a mistura de EMAG foi concentrada em evaporador rotativo, sendo armazenada a -18 °C para posterior análise cromatográfica.

3.3.4 Análise Cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas no laboratório do grupo de pesquisa CromAlimentos da Universidade Estadual de Maringá, em Maringá. Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram separados em um cromatógrafo a gás CP 3380 (Varian, Estados Unidos), equipado com coluna capilar de sílica fundida CP 7420 (100 m x 0,25 mm x 0,39 µm de cianopropil polisiloxano) e detector de ionização em chama. A temperatura inicial da coluna foi de 185 °C por 5 min, sendo elevada a 225 °C à taxa de 15 °C min⁻¹, permanecendo nesta temperatura por 15 min. As temperaturas do injetor e detector foram 240 °C. O volume injetado foi de 2,0 µL. As velocidades de fluxo dos gases foram 1,4 mL min⁻¹ para o gás de arraste (H₂); 30 mL min⁻¹ para o gás auxiliar (nitrogênio); 30 e 300 mL min⁻¹ para os gases da chama, hidrogênio e ar sintético, respectivamente. As áreas dos picos foram determinadas através do software Workstation versão 5.0 (Varian).

3.3.5 Identificação dos ésteres metílicos

A identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos baseou-se na comparação dos seus tempos de retenção com o de misturas padrão de ésteres metílicos obtidas da Sigma (EUA) e por co-eluição de padrões com a amostra.

3.3.6 Otimização e análise estatística

Os resultados foram submetidos ao teste de Grubbs para detecção de valores anômalos ($p < 0,05$) por meio do *software* R versão 2.15 com o pacote *outliers*. As médias foram submetidas a análise de variância, seguida da aplicação do teste de Tukey para identificação das diferenças ($p < 0,05$), sendo utilizado o *software* Statistica versão 7.0. A otimização das condições para a concentração do ácido alfa-linolênico empregou as metodologias de planejamento fatorial, superfície de resposta, e SIMPLEX, que foram realizadas por meio do *software* Design-Expert versão 7.0. O modelo obtido a partir do planejamento fatorial foi submetido à análise de variância (ANOVA), sendo considerado significativo se $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Cinco ácidos graxos foram identificados e quantificados no óleo de linhaça. Em ordem crescente de concentração estão: ácido alfa-linolênico (18:3n-3), oleico (18:1n-9), linoleico (18:2n-6), palmítico (16:0) e esteárico (18:0). A Tabela 3 mostra as concentrações de cada ácido e a Figura 6 o cromatograma obtido do óleo.

Tabela 3 - Concentração dos EMAG, em porcentagem de área, obtidos para o óleo de linhaça

Ésteres Metílicos	Concentração (%)
16:0	5,82
18:0	4,58
18:1n-9 ^a	19,76
18:2n-6	14,53
18:3n-3	55,31

^a – Inclui o 18:1n-7

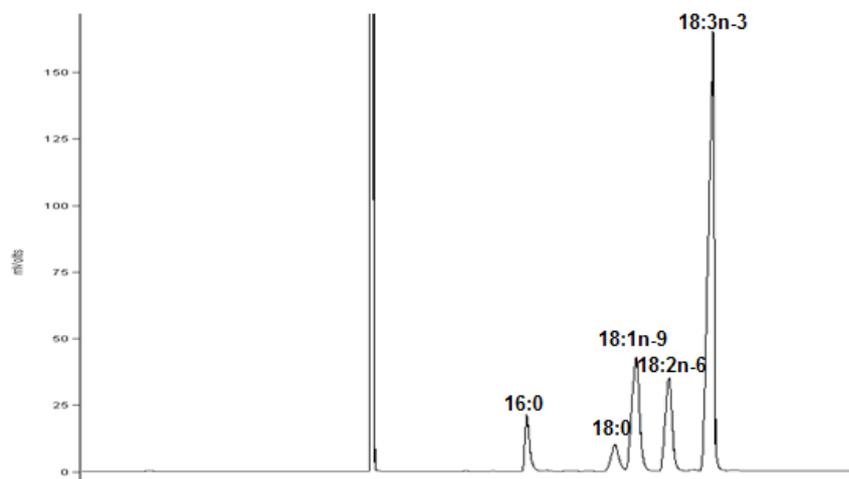


Figura 6 - Cromatograma dos EMAG obtidos do óleo de linhaça

A Figura 6 mostra o cromatograma obtido a partir dos EMAG do óleo de linhaça. O primeiro pico mostra o solvente e os picos seguintes, os respectivos ácidos graxos encontrados.

A Tabela 4 mostra os valores de concentração média do AAL obtida dos experimentos realizados conforme o planejamento fatorial com dois níveis e três fatores, a fim de otimizar as condições do aumento da concentração do AAL.

Tabela 4 - Concentração de AAL em óleo de linhaça obtidos dos experimentos do planejamento fatorial 2³

Experimento	Fatores						Teor AAL ¹ (%)
	Não codificados			Codificados			
	A ²	B ³	C ⁴	A	B	C	
1	2	50°C	1 [*]	-1	-1	-1	66,66 ± 0,33 ^a
2	4	50°C	1 [*]	1	-1	-1	82,10 ± 0,37 ^b
3	2	70°C	1 [*]	-1	1	-1	67,79 ± 0,44 ^a
4	4	70°C	1 [*]	1	1	-1	76,99 ± 1,50 ^{c,d}
5	2	50°C	2 ^{**}	-1	-1	1	82,76 ± 3,08 ^b
6	4	50°C	2 ^{**}	1	-1	1	77,89 ± 0,72 ^c
7	2	70°C	2 ^{**}	-1	1	1	81,01 ± 3,86 ^{b,c}
8	4	70°C	2 ^{**}	1	1	1	79,47 ± 0,65 ^{c,d}

¹ Teor médio de concentração do AAL ± desvio padrão. Experimentos realizados em triplicata. ^{*} Resfriamento a 5°C por 2h, e -18°C por 19h. ^{**} Resfriamento a 25°C por 1h, 5°C por 4h e -18°C por 16h. ² Razão massa de ureia/massa de EMAG. ³ Temperatura de reação. ⁴ Condição de tempo e temperatura de cristalização. Letras diferentes na mesma coluna correspondem a diferença significativa entre as médias ao nível de 0,05, pelo teste de Tukey.

Pode-se notar que o experimento 5 resultou no maior teor de AAL: 82,76%. Não foram observadas diferenças significativas ($P > 0,05$) entre os resultados obtidos para os experimentos 2, 5 e 7. A Tabela 5 apresenta a concentração dos EMAG's após a otimização. As condições foram razão massa de ureia/massa de EMAG igual a 2, temperatura de reação de 50°C e condição de cristalização mais lenta. A Figura 7 mostra o cromatograma obtido do experimento 5, cujo teor de ácidos graxos insaturados foi de 99,8%.

Tabela 5 - Concentração dos EMAG, em porcentagem de área, obtidos para o experimento após otimização da concentração

Ésteres Metílicos	Concentração (%)
18:1n-9 ^a	0,73
18:2n-6	16,27
18:3n-3	82,76

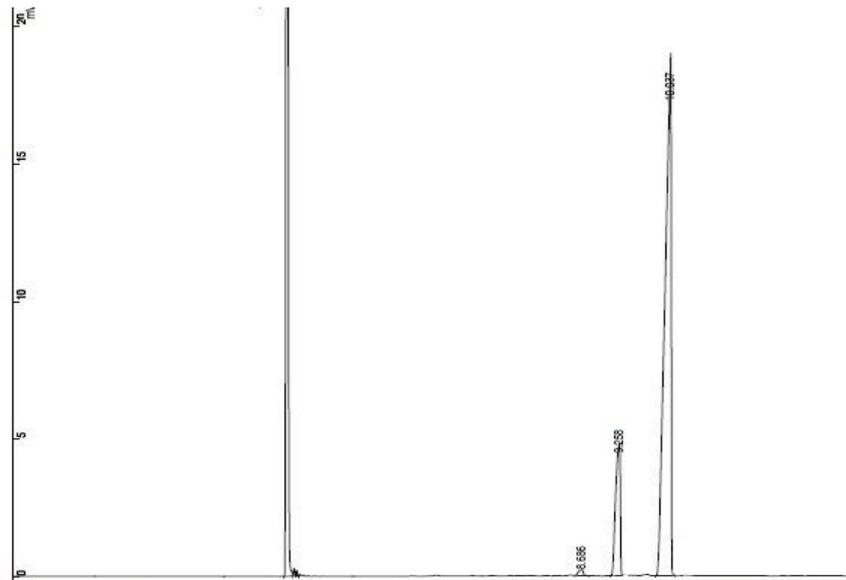


Figura 7 - Cromatograma dos EMAG obtido após otimização de concentração

Analisando os resultados, aplicou-se o teste de Grubbs para a verificação de valores anômalos (*outliers*) no conjunto de dados. O teste demonstrou que existiam dois *outliers*, e estes foram excluídos para que fosse realizada a análise de variância do modelo. Utilizando-se do software Design Expert 7.0 realizou-se a análise de variância (ANOVA) do modelo, para que fosse feita a avaliação das variáveis, suas influências e interações (Tabela 5). Esta demonstrou que o modelo foi significativo ($p < 0,0001$) e apresentou coeficiente de determinação R^2 de 0,9850.

Tabela 6 - ANOVA do planejamento fatorial 2^3

Efeitos	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Valor F	Prob > F
Modelo	748,8615	5	149,7723	209,6962	< 0.0001
A-A	137,9389	1	137,9389	193,1283	< 0.0001
B-B	7,7487	1	7,7487	10,8489	0.0046
C-C	216,5764	1	216,5764	303,2286	< 0.0001
AC	314,0880	1	314,0880	439,7546	< 0.0001
ABC	35,4103	1	35,4103	49,5779	< 0.0001
Resíduos	11,4278	16	0,7142		
Falta de Ajuste	1,1189	2	0,5595	0,7598	0.4861
Erro Puro	10,3088	14	0,7363		
Total	760,2893	21			
R^2		0,9850			

A Equação 1 descreve o modelo de forma codificada, onde Y representa a concentração de ácido alfa-linolênico, A a razão massa de ureia/massa de EMAG, B a temperatura de reação e C a condição de tempo e temperatura de cristalização. Substituindo as variáveis A, B e C na equação por (-1) ou (1) (nível baixo ou alto), é possível encontrar a concentração de AAL naquela condição.

$$Y = 76,79 + 2,54A - 0,60B + 3,19C - 3,84AC + 1,27ABC \quad (1)$$

A ANOVA indicou um coeficiente de determinação (R^2) de 0,9850, o que significa que 98,50% da variação total de respostas são explicadas por este modelo. O valor máximo de R^2 é 1, ou seja, quanto maior o coeficiente de determinação, melhor será o ajuste do modelo às respostas observadas. Porém, isso só ocorrerá quando não houver interferências nem resíduo nenhum no modelo.

A Figura 8 apresenta a distribuição dos resíduos do modelo. Os valores de resíduos podem ser definidos como a diferença entre a resposta obtida experimentalmente e àquela predita pelo modelo. Quanto menor a variação dos resíduos, melhor a qualidade do modelo analisado. Percebe-se que esta distribuição foi uniforme, indicando que o modelo é satisfatório.

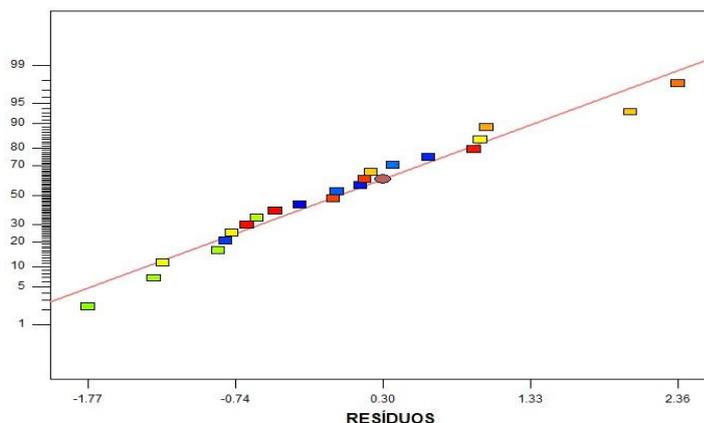


Figura 8 - Gráfico de distribuição dos resíduos para o AAL

Para analisar a interação entre os fatores A, B e C, observaram-se os gráficos de superfície de resposta, que mostram a interação entre as variáveis, obtidos através do software Design Expert 7.0 (Figura 9).

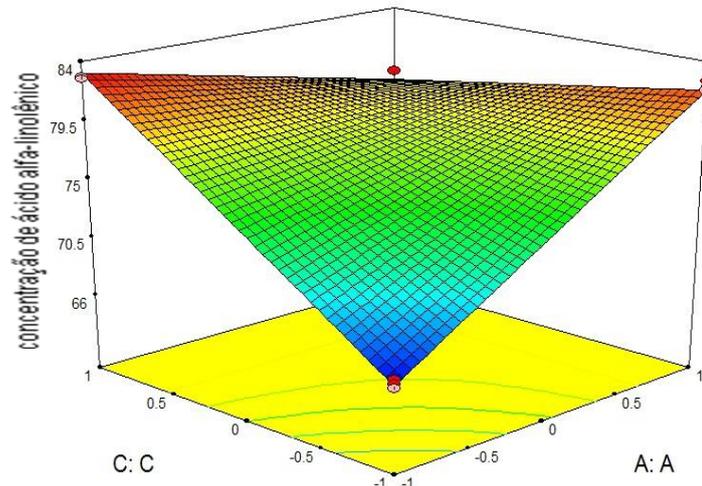


Figura 9 - Superfície de resposta obtida para A e C, B = -1

Quando a variável C está no nível baixo e a variável A passa do nível baixo para o alto, a resposta varia de 66,55% a 81,85%, o que representa um aumento de 15,30%. Por outro lado, quando a variável C está em seu nível alto e a variável A vai do nível baixo para o alto, o teor de AAL passa de 83,15% a 78,01%, correspondendo à diminuição de 5,14%.

Já fixando a variável A em (-1), e passando a variável C do nível baixo para o alto, a resposta varia de 66,55% para 83,15%, aumentando em 16,60%. Com A=1, a variação de resposta com C de -1 para 1 fica de apenas 3,84%, diminuindo apenas de 81,85% para 78,01%, respectivamente.

Através disso é possível verificar que as duas variáveis, tanto A quanto C, devem ser ajustadas em conjunto, pois influenciam de forma combinada em relação à resposta. Como prova disso temos dois picos em que a superfície de resposta atingiu valores bastante próximos do máximo (regiões em vermelho). Ou seja, tanto quando a variável A está em seu nível baixo e C em seu nível alto, quanto o nível alto de A e baixo de C apresentaram elevados valores de concentração de AAL.

O nível alto de C representa um resfriamento mais lento da mistura de EMAG e ureia. Ou seja, quando o tempo para a formação dos cristais de ureia é

maior, a formação de cristais hexagonais é favorecida, conforme observado por Hayes (1998). A configuração hexagonal permite a formação de adutos com ácidos graxos, principalmente saturados, o que está associado com o aumento da seletividade do processo. Quando A está em seu nível baixo, ou seja, a razão massa de ureia/massa de EMAG é igual a 2, o teor de AAL apresenta o maior valor. Entretanto, quando a razão massa de ureia/massa de EMAG é igual 4, o teor de AAL diminui. Nesta condição há uma maior quantidade de cristais hexagonais, pelo fato da massa de ureia ser maior em relação a condição em que esta razão tem o valor de 2. Em consequência a probabilidade de ocorrer a formação de adutos com a ureia aumenta em relação a todos os ácidos graxos, o que explica a diminuição do teor de AAL na fração líquida.

Já o nível baixo de C reproduz um resfriamento mais brusco: da temperatura de reação (50° ou 70°C) diretamente para a geladeira (5°C). No resfriamento rápido, ocorre a predominância de cristais tetragonais, que não formam complexos de adição com ácidos graxos (HAYES, 1998). Quando a razão massa de ureia/massa de EMAG é igual a 2, a menor concentração de AAL é observada, devido a pequena quantidade de cristais hexagonais que contém os ácidos graxos em seus canais. Com o aumento da razão para 4, aumenta a quantidade de cristais tetragonais mas também aumenta a de hexagonais, que formam complexos de adição predominantemente com ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Esta condição explica o aumento do teor de AAL na fração líquida, quando a variável A passa do nível baixo para alto, com C em seu nível baixo.

Ao comparar os resultados quando C está em seu nível alto e A no baixo com C no nível baixo e A no nível alto, obtêm-se respostas bastante próximas. Isto sugere que o uso de uma quantidade maior de ureia em relação a massa de EMAG exerce um efeito compensador quando o resfriamento é brusco em relação a melhor condição onde o resfriamento é lento e a quantidade de ureia é menor.

A análise dos gráficos da Figura 10 permite verificar o comportamento da interação ABC.

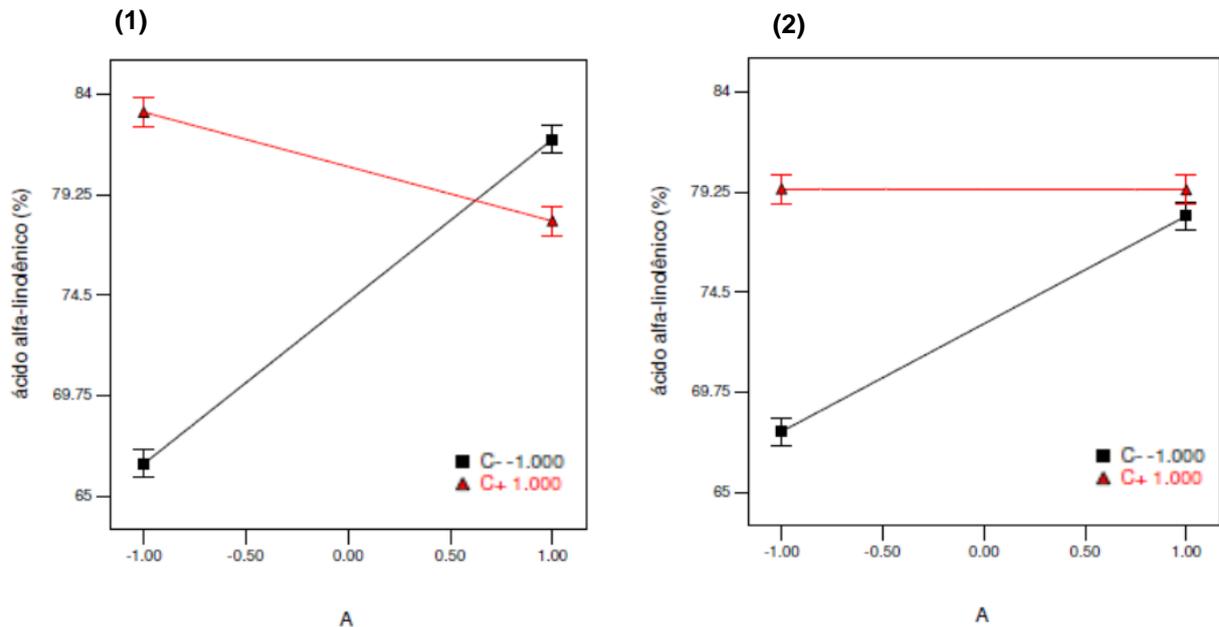


Figura 10 - Gráficos de interação para: (1) A e C, com B = -1; (2) A e C, com B = 1

Quando a variável B está em seu nível baixo e A varia do nível baixo para alto, com C no nível baixo, há um aumento no valor da resposta. Por outro lado, quando C está no nível alto e A varia de -1 para +1, o teor de AAL diminui. Na condição em que B está em seu nível alto e A varia de -1 para 1, com C = 1, não há variação da resposta. Esta condição é diferente da observada quando B = 1 e caracteriza a interação envolvendo 3 fatores (ABC). Quando C está em seu nível baixo e A varia de -1 a +1, observa-se um comportamento da resposta semelhante ao obtido para B = -1, porém com uma menor variação.

As melhores respostas foram obtidas com o fator B em seu nível baixo, ou seja, a temperatura de reação de 50°C. Para a temperatura de 70°C (nível alto de C), a pressão de vapor do etanol é elevada, favorecendo assim a diminuição de seu volume devido à vaporização. Com o volume de etanol reduzido, a solubilidade da ureia é afetada, influenciando diretamente na formação de cristais hexagonais. Ou seja, a ureia não solubiliza no álcool, ficando assim em sua forma tetragonal. O fato explica os melhores resultados terem sido alcançados com B em seu nível baixo.

4.1 DETERMINAÇÃO DO PONTO ÓTIMO

Esta determinação foi realizada utilizando o método SIMPLEX através do próprio software utilizado para o planejamento experimental, e forneceu 19 soluções para os maiores níveis de concentração de AAL. A maior resposta obtida foi de 83,14%, correspondendo aos valores de -1 para A, -1 para B e 1 para C em termos de variáveis codificadas. Já em termos de variáveis reais, a melhor condição mostra razão massa ureia/massa EMAG igual a 2, temperatura de reação de 50°C e condição de tempo e temperatura de cristalização mais lenta.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Verificou-se que o modelo obtido para a concentração de AAL foi altamente significativo ($P < 0,0001$) e teve uma boa adequação, respondendo a 98,50% da variação das respostas do mesmo. O ponto ótimo para o AAL forneceu um valor de 83,14%, diferindo apenas 0,38% do valor alcançado experimentalmente, tendo como variáveis a razão massa de ureia/massa de EMAG igual a 2 (A), temperatura de reação de 50°C (B) e condição de tempo e temperatura de resfriamento mais lento (C).

O ponto ótimo do modelo, com 83,14% de concentração de ácido alfa-linolênico, se comparado ao resultado inicial encontrado no óleo de linhaça, em que a concentração de AAL era de 55,31%, demonstrou um aumento de 50,32% no teor de AAL, um aumento significativo para o trabalho.

O planejamento fatorial foi de grande valia e também adequado à otimização da concentração do AAL. Com ele, foi possível diminuir o tempo de pesquisa, desperdício de reagentes e outros custos operacionais. Também através dele foi possível verificar que a variável C foi a que apresentou maior influência sobre a resposta, seguida das variáveis A e B, respectivamente.

O trabalho apresenta grande importância, pois contribui com o desenvolvimento dos estudos relacionados aos ácidos graxos poli-insaturados, lipídios benéficos ao organismo, que estão principalmente relacionados com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares. Além disso, a partir deste ácido podem ser obtidos isômeros conjugados (CLNA) que possuem efeitos fisiológicos favoráveis no caso de doenças como câncer, diabetes e obesidade.

Outro valor relevante do trabalho é que este coopera com as pesquisas relacionadas à adição de ácidos graxos ômega-3 em alimentos. Quando estes estão concentrados, a ingestão de ácidos graxos saturados e de lipídios em geral é reduzida, alcançando o efeito fisiológico esperado mais facilmente. Com isso, as propriedades funcionais dos alimentos, principalmente aqueles industrializados, podem aumentar consideravelmente.

REFERÊNCIAS

ALLINGER, Norman et al; **Química Orgânica**. Tradução da 2ª edição americana, Rio de Janeiro: Editora Guanabara Dois S.A., 1978.

CARMO, Maria. C. N. S.; CORREIA, Maria. I. T. D. A. Importância dos Ácidos Graxos Ômega-3 no Câncer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 55, 279-287, 2009.

CEOTTO, Bernardo. O que é que a linhaça tem. Dentro das sementes da planta que dá origem ao linho há componentes que equilibram os hormônios femininos e reforçam as defesas do corpo. **Revista da Saúde**. Campinas. v. 23, n. 3, p. 37-40, 2000.

COOK, Mark. E.; PARIZA, Michael. The Role of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in Health. **International Dairy Journal**. Madison, USA. p. 459-462, 1998.

GAMERO, Patrícia. D.; OLIVEIRA, Marina.; NASCIMENTO, Cleuciane. T.; VISENTAINER, Jesuí. V.; MARTIN, Clayton. A. Concentração do Ácido Alfa-Linolênico em Óleo de Linhaça por Meio da formação de Adutos com Ureia. **Anais do COBEQ-IC**, Maringá, 2011.

GU, Hai-bo; MA, Xue-yi, WU, Jing-bo, ZHANG, Qi, YUAN, Wen-bing., CHEN Yi-ping. Concentration of alpha-linolenic acid of perilla by gradient cooling urea inclusion. **Agricultural Sciences in China**, 8, 685, 2009.

HARRIS, Kenneth. D. M., Structural and dynamic properties of urea and thiourea inclusion compounds. **Journal of Molecular Structure**, 374, 241-250, 1996.

HAYES, Douglas G.; BENGTSSON, Ylva C.; ALSTINE, James V. M.; SETTERWALL, Fredrik; Urea complexation for the rapid, ecologically responsible fractionation of fatty acids from seed oil. **The Journal of the American Chemists Society**. Champaign. v. 75, n. 10, p. 1404, jun. 1998.

ISO - International Organization for Standardization. **Animal and vegetable fats and oils – preparation of methyl esters fatty acids**, ISO, Geneve, Method ISO 5509, p. 1-6, 1978.

KOBA, Kazunori; BELURY, Martha A.; SUGANO, Michihiro. Potential health benefits of conjugated trienoic acids. **Lipid Technology**. Weinheim. v. 19, n. 9, p. 200-203, 2007.

MARTIN, Clayton A; ALMEIDA Vanessa V; RUIZ, Marcos R; VISENTAINER, Jeane E. L; MATSHUSHITA, Makoto; SOUZA, Nilson E; VISENTAINER, Jesuí V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. **Revista de nutrição**. Campinas, v. 6, n. 19, p. 761-770, nov./dez. 2006.

MILINSK, Maria C. **Análise comparativa entre oito métodos de esterificação na determinação quantitativa de ácidos graxos em óleo vegetal**. 2007. 118 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

NAGAO, Koji.; YANAGITA, Teruyoshi.; Conjugated Fatty Acids in Food and Their Health Benefits. **Journal of bioscience and bioengineering**. Osaka. Japan, v. 100, n. 2, p.152–157, mar, 2005.

OLIVEIRA, Marina; NASCIMENTO, Cleuciane T.; BONAFE, Elton G.; MARTIN, Clayton A. Concentração do Ácido Alfa-Linolênico em Óleo de Linhaça por Meio da Formação de Adutos com Ureia. **Anais do XVI SICITE**, Ponta Grossa, 2011.

RUBIO-RODRÍGUEZ, Nuria.; BELTRÁN, Sagrario.; JAIME, Isabel.; DIEGO, Sara M.; SANZ, Maria. T., CARBALLIDO, Jordi. R., Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Burgos, Espanha, n. 11, p. 1-12, 2010.

STOUT, Virginia. F.; SPINELLI, John. Polyunsaturated Fatty Acids from Fish Oils. **US Patent** 4, 675, 132, 1987.

SWERN, Daniel, Urea and Thiourea Complexes in Separating Organic Compounds, **Industrial Engineering Chemistry**, 47 (2), 216-221, 2002.

TESHIMA, Shin-ich., KANAZAWA, Akio., TOKIWA, Shigeru. Separation of polyunsaturated fatty acids by column chromatography on silver nitrate impregnated silica gel. **Bulletin of Japanese Society of the Science Fisheries Oceanography**, 44, 927-929, 1978.

VISENTAINER, Jesuí. V. Aspectos Analíticos da Resposta do Detector de Ionização em Chama para Ésteres de Ácidos Graxos em Biodiesel e Alimentos. **Química Nova**, Maringá, ago. 2011.

VISENTAINER, Jesuí. V. **Composição de ácidos graxos e quantificação dos ácidos graxos LNA, EPA e DHA no tecido muscular de tilápias (*Oreochromis niloticus*), submetidas a diferentes tratamentos com óleo de linhaça.** 2003. 192 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, Campinas, 2003.

VOGEL, Arthur I.; **Química Orgânica – Análise Orgânica Qualitativa.** 3ª ed., Rio de Janeiro: Ao Livro Técnico, 1987.

WANASUNDARA, Udaya N.; SHAHIDI, Fereidoon. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. **Food Chemistry**, Canadá, n. 65 p. 41-49, 1999.

WU, Mingyi., DING, Hui., WANG, Song. e XU, Shimin. Optimizing Conditions for the Purification of Linoleic Acid from Sunflower Oil by Urea Complex Fractionation. **Journal of the American Oil Chemist's Society.** China, n. 85 p. 677-684, 2008.