



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO HUMANA**

**Heloisa Rodrigues de Gouvêa Campos**

**ÓLEO DE PEIXE EM CÁPSULAS COMERCIALIZADAS EM BRASÍLIA – DF:  
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS, NÍVEL DE OXIDAÇÃO, METAIS PESADOS E  
ROTULAGEM**

**Brasília  
2016**

**Heloisa Rodrigues de Gouvêa Campos**

**ÓLEO DE PEIXE EM CÁPSULAS COMERCIALIZADAS EM BRASÍLIA – DF:  
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS, NÍVEL DE OXIDAÇÃO, METAIS PESADOS E  
ROTULAGEM**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição Humana da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Nutrição Humana**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina Kiyomi Ito.**

**Brasília**

**2016**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C198? Campos, Heloisa Rodrigues de Gouvêa  
Óleo de peixe em cápsulas comercializadas em  
Brasília - DF: perfil de ácidos graxos, nível de  
oxidação, metais pesados e rotulagem / Heloisa  
Rodrigues de Gouvêa Campos; orientador Marina  
Kiyomi Ito. -- Brasília, 2016.  
99 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Nutrição  
Humana) -- Universidade de Brasília, 2016.

1. Nutrição Humana. 2. Doenças Crônicas Não  
Transmissíveis. 3. Óleo de peixe. 4. Ômega-3. 5. Nível  
de oxidação e perfil de ácidos graxos. I. Ito, Marina  
Kiyomi, orient. II. Título.

**Heloisa Rodrigues de Gouvêa Campos**

**ÓLEO DE PEIXE EM CÁPSULAS COMERCIALIZADAS EM BRASÍLIA – DF:  
PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS, NÍVEL DE OXIDAÇÃO, METAIS PESADOS E  
ROTULAGEM**

**Banca Examinadora**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina Kiyomi Ito (Presidente)**

**Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília**

---

**Prof. Dra. Dâmaris Silveira (Membro)**

**Departamento de Farmácia – Universidade de Brasília**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Lívia de Lacerda de Oliveira Pineli (Membro)**

**Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Nathalia Marcolini Pelucio Pizato Valério (Membro Suplente)**

**Departamento de Nutrição – Universidade de Brasília**

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Eduardo e Maria Beatriz, à minha irmã Suzana e ao meu marido Alex. Com eles, tenho aprendido o real valor do amor, da união e da dedicação à vida e aos estudos.

## Agradecimentos

A Deus por, mesmo diante das dificuldades, me abençoar, me fortalecer a cada dia, guiar o meu caminho e me presentear com pessoas tão especiais que fizeram este caminho ser mais leve e prazeroso.

À profa. Marina, minha orientadora, pela oportunidade de me acolher na UnB, pela confiança, pelo incentivo e por todos os ensinamentos. Agradeço em especial, por ter confiado a mim a escolha do projeto a ser executado e por ter sido compreensiva em meus momentos de ausência.

Às professoras Dâmaris, Livia e Nathalia por aceitarem participar da banca e por contribuírem com desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Jurandir, Marcelo, Sandra, Imaculada e Alex, pela disponibilidade de tempo, pelos ensinamentos e por terem me disponibilizado equipamentos e materiais para a execução dos experimentos.

À aluna de ProIC Dryade, à colega Lourdes e à técnica do Laboratório de Bioquímica da Nutrição Thaís pelo auxílio incondicional na coleta de dados, na participação da elaboração da escrita desses dados, pela companhia, incentivo e momentos de descontração e alegrias.

Aos técnicos do Laboratório de Bioquímica da Nutrição Luiz e Mário e aos companheiros de pós-graduação Marcela, Marcus, Camila, Bia, Martina, Mônica, Nádia, Mariane, Átala, Elemárcia e Araída por me auxiliarem nos experimentos, por me ouvirem diante de tantos desabafos e momentos de angústia, pelo incentivo, companhia e momentos de descontração.

À minha chefe Sarah por ter sido tão flexível e compreensiva quanto às alterações dos meus dias e horários de trabalho para que a coleta de dados pudesse ocorrer, e à Sílvia, por me auxiliar, incentivar e encorajar a concluir mais uma etapa de estudos da minha vida acadêmica.

Ao colega de trabalho Henrique pelo auxílio na escolha dos testes estatísticos e no incentivo à conclusão desse projeto.

À minha família por todo o apoio, pelo constante incentivo aos meus estudos, pela compreensão em relação às minhas ausências em momentos difíceis e pelo carinho e acolhimento sempre que preciso.

Ao meu marido Alex, pelo companheirismo, pela dedicação, pela paciência e pela compreensão diante das minhas ausências, pelos ensinamentos acadêmicos e por ter me ajudado a concluir esta etapa da minha vida sem deixar de cuidar da saúde de meus familiares.

A todos que tiveram uma participação direta ou indireta durante esta jornada, muito obrigada.

## Resumo

**Introdução:** Óleos de peixe em cápsulas (OPC), de venda livre no Brasil, são fontes dos ácidos graxos eicosapentenoico (EPA) e docosaexenoico (DHA), recomendados para o tratamento de hipertrigliceridemia. O objetivo do presente estudo foi avaliar o conteúdo de EPA e DHA, mercúrio, nível de oxidação e a rotulagem de OPC comercializados em Brasília, Brasil, de acordo com a legislação vigente. Também buscou-se avaliar o custo, a ingestão calórica e a carga de cápsulas envolvidos no consumo desses suplementos para o tratamento de hipertrigliceridemia. **Métodos:** Os OPC foram adquiridos em drogarias de Brasília. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa, utilizando padrões interno (éster metílico de C23:0) e externos (ésteres metílicos de EPA e DHA). As amostras foram metiladas com trifluoreto de boro (14% em metanol). Foi aceita uma variação de  $\pm 20\%$  de EPA e DHA, em relação ao declarado no rótulo. O mercúrio foi determinado por método de detecção direta de vapor. O índice de peróxidos (IP) foi determinado de acordo com o método A.O.C.S Cd 8-53 adaptado por Crowe et al., (2001), e o índice de anisidina (IA), pelo método A.O.C.S Cd 18-90. O valor total de oxidação (TOTOX) foi calculado pela fórmula:  $2 \cdot IP + IA$ . Níveis de IP, IA e TOTOX aceitáveis por organizações internacionais reconhecidas são  $<5 \text{ mEq O}_2/\text{kg}$  de óleo,  $<20$  e  $<26$ , respectivamente. Os rótulos e as recomendações compatíveis com a propriedade funcional de EPA e DHA foram analisados a partir de documentos legais e diretrizes das sociedades científicas internacionais. O custo mensal de cada produto foi calculado a partir do preço estabelecido pelas farmácias. **Resultados:** Foram identificados 31 produtos e adquiridos 28, pois 3 não discriminaram a quantidade de EPA e DHA no rótulo. Dos produtos, 88,8 % e 81,4 % apresentaram porcentagem de adequação de EPA e DHA, respectivamente, dentro dos valores permitidos pela legislação brasileira. Cerca de 15 % dos produtos apresentaram concentração de mercúrio entre 11 e 15 ppb, dentro dos valores permitidos. Nos 10 produtos analisados quanto ao nível de oxidação, 20 % excederam os níveis de IP e TOTOX recomendados, com o produto mais oxidado atingindo  $14,9 \text{ mEq O}_2/\text{kg}$  de óleo de PV e 44 de TOTOX. Em relação à rotulagem, 9,7 % dos produtos estavam de acordo com todos os quesitos avaliados. Houve uma grande variação concentração de EPA e DHA e de custo e quantidade de cápsulas a ser ingerida para se atingir a dose mínima para o tratamento de hipertrigliceridemia. Produtos mais concentrados foram associados a uma menor ingestão de calorias ( $\rho = -0,904$ ;  $p < 0,001$ ) e de cápsulas ( $\rho = -0,794$ ;  $p < 0,001$ ), mas a um maior custo ( $\rho = 0,531$ ;  $p = 0,002$ ). **Conclusão:** Apesar da alta porcentagem de adequação das variáveis químicas analisadas, cerca de 1/3 dos produtos apresentaram alguma inadequação quanto à legislação. A legislação vigente em relação à rotulagem é vasta, mas fragmentada, o que refletiu em baixa porcentagem de produtos com rótulos conformes.

**Palavras-chave:** óleo de peixe, ômega-3, nível de oxidação, mercúrio, carga de cápsulas, rótulo.

## Abstract

**Background:** Fish oil are over the counter supplements in Brazil, and are sources of eicosapentaenoic fatty acids (EPA) and docosahexaenoic (DHA), recommended for the treatment of hypertriglyceridemia. The aim of this study was to evaluate the content of EPA and DHA, mercury, oxidation level and labeling of fish oil supplements marketed in Brasilia, Brazil, in accordance with current legislation. Cost, caloric intake and pill burden related to the intake of these supplements for the treatment of hypertriglyceridemia were also evaluated. **Methods:** Fish oil supplements were purchased in drugstores of Brasilia. The fatty acid content was determined by gas chromatography using the internal (C23:0) and external (EPA and DHA) methyl ester standards. For GC-FID analysis, samples were prepared by alkali-catalyzed methylation with boron trifluoride (14% in methanol). Variation of  $\pm 20\%$  of EPA and DHA, compared to the stated label was considered adequate. Mercury was determined by direct vapor detection method. PV was determined according to A.O.C.S Cd 8-53 method adapted by Crowe et al. (2001) and AV, according to A.O.C.S Cd 18-90 method. Total oxidation (TOTOX) was calculated by the formula:  $2.PV + 1.AV$ . Recommended levels for PV, AV and TOTOX of  $< 5 \text{ mEq O}_2/\text{ kg oil}$ ,  $< 20$  and  $< 26$ , respectively, were used as oxidation parameters of the products. Labels and therapeutic recommendations of EPA and DHA were analyzed based on legal documents and guidelines of international scientific societies, respectively. The monthly cost of each product was calculated from the price set by the drugstores. **Results:** We identified 31 products and purchased 28 because 3 did not discriminate the amount of EPA and DHA on the label. EPA and DHA percentage adequacy were met by 88.8 % and 81.4 % of the products, respectively. About 15 % of products had mercury concentrations between 11 and 15 ppb, within the allowed values. Twenty percent of the products exceeded recommended levels of PV and TOTOX, with the most oxidized product reaching 14.9 mEq O<sub>2</sub>/ kg oil of PV and 44 of TOTOX. Ten percent of the labels were in accordance to all issues analyzed. There was a great variation in the concentration of EPA, DHA, cost and quantity of capsules to be ingested per day to achieve the minimum dose for the treatment of hypertriglyceridemia. The more concentrated supplements were correlated with lesser calories ( $\rho = -0.904$ ;  $p < 0.001$ ) and lesser pills ( $\rho = -0.794$ ;  $p < 0.001$ ), but higher costs ( $\rho = 0.531$ ;  $p = 0.002$ ). **Conclusion:** Despite the high percentage of adequacy of the chemical parameters analyzed, about 2/3 of the products showed some inadequacies according to the law. The current legislation is broad, but fragmented, which resulted in low percentage of products with label compliance.

**Keywords:** fish oil, omega-3, oxidation level, mercury, pill burden, label.

## Lista de Figuras

Figura 2.1 Produção de óleos de peixe (adaptação de AOCS, 2011).....	19
Figura 2.2 Produção de hidroperóxidos e dienos conjugados (adaptado de SILVA et al., 1999) .....	25
Figura 2.3 Produtos primários e secundários da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (adaptado de ARAÚJO, 2008) .....	26
Figura 2.4 Trajeto endógeno do ácido $\alpha$ -linoleico e $\alpha$ -linolênico (adaptado de LEE; LIP, 2003) .....	29
Figura 4.1 Reação de condensação entre a p-anisidina e o malondialdeído com formação de produto de coloração amarelada (adaptado de SHAHIDI; WANASUNDARA, 2002) .....	45
Figura 6.1 Fluxograma da aquisição e análises das amostras de óleo de peixe em cápsulas. ....	59
Figura 6.2 Adequação de EPA e DHA dos suplementos de óleo de peixe em relação à quantidade declarada no rótulo. ....	61
Figura 6.3 Nível de oxidação determinado nos suplementos de óleo de peixe: Índice de peróxido, Índice de anisidina e TOTOX. ....	62

## Lista de Tabelas

Tabela 2.1 Estudos que avaliaram a adequação da composição de EPA e DHA em óleos de peixe em cápsulas. ....	35
Tabela 6.1 Perfil de ácidos graxos dos suplementos de óleo de peixe. ....	60
Tabela 6.2 Nível de oxidação das amostras com e sem vitamina E declaradas no rótulo. ....	62
Tabela 7.1 Recomendações de óleo de peixe e ômega-3 de diretrizes nacionais e internacionais para prevenção e tratamento de doenças crônicas.....	75
Tabela 7.2 Doses diárias, custo e calorias de suplementos de óleo de peixe, de acordo com informações do rótulo. ....	76
Tabela 7.3 Adequação dos produtos em relação a cada quesito analisado. ...	77
Tabela 7.4 Material Suplementar 2: Composição, custo e calorias de suplementos de óleo de peixe.....	84

## Siglas e Abreviações

AA	Ácido araquidônico
AG	Ácido graxo
AGPI	Ácidos graxos poli-insaturados
AHA	<i>American Heart Association</i>
ALA	Ácido alfa-linolênico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas
COX	Cicloxigenases
DC	Dienos conjugados
DCNT	Doenças crônicas não transmissíveis
DCV	Doenças cardiovasculares
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DHA	Ácido docosaexenoico
DRI	<i>Dietary Reference Intakes</i>
EE	Etil éster
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EPA	Ácido eicosapentenoico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOX	<i>Ferrous Oxidation – Xylenol Orange</i>
GOED	<i>Global organization for EPA and DHA</i>
IA	Índice de anisidina
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
IL-6	Interleucina6
IL-8	Interleucina8
IOM	<i>Institute of Medicine</i>
IP	Índice de peróxido
ISSFAL	<i>International Society for Fatty Acids and Lipids</i>
LA	Ácido linoleico
LDL	<i>Low density lipoproteins</i>
EMAG	Éster metílico de ácido graxo
OMS	Organização Mundial de Saúde

OP	Óleo de peixe
OPC	Óleos de peixe em cápsulas
PCR	Proteína C Reativa
SREBP-1	Proteína 1 ligadora do elemento regulatório de esterol
TAG	Triacilglicerol
TBA	Teste do ácido 2-tiobarbitúrico
TOTOX	<i>Total oxidation</i>
UL	<i>Upper Tolerable Intake Levels</i>
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adesão da célula vascular - 1
VLDL	<i>Very low density lipoproteins</i>
$\omega$ -3	Ômega-3
$\omega$ -6	Ômega-6

## Sumário

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	18
2.1 Processamento de Óleos de Peixe.....	18
2.2 Formulações Comercializadas de Óleo de Peixe .....	20
2.3 Biodisponibilidade das Formulações de Óleo de Peixe .....	23
2.4 Oxidação de Lipídios .....	24
2.5 Ácidos Graxos Essenciais e Eicosanoides .....	28
2.6 Efeitos Fisiológicos do Ômega-3 nas DCNT.....	30
2.7 Rotulagem de óleo de peixe em cápsulas .....	33
2.8 Estudos prévios de relevância.....	34
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	37
3.1 Objetivo Geral .....	37
3.2 Objetivos Específicos .....	37
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
4.1 Delineamento do estudo.....	38
4.2 Aquisição e transporte das amostras.....	38
4.3 Pesagem e preparo da Amostra Composta.....	39
4.4 Quantificação dos ácidos graxos EPA e DHA .....	39
4.5 Determinação do índice de peróxido .....	42
4.6 Determinação do Índice de anisidina.....	44
4.7 Cálculo do TOTOX .....	46
4.8 Determinação de mercúrio .....	47
4.9 Adequação da Rotulagem .....	48
4.10 Análises estatísticas .....	49
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>6. ARTIGO 1- Aspectos quali e quantitativos de suplementos de óleo de peixe comercializados em Brasília, Brasil</b> .....	51
6.1 Introdução .....	53
6.2 Materiais e Métodos .....	54
6.3 Resultados .....	58
6.4 Discussão.....	63
6.5 Conclusão .....	69
<b>7. ARTIGO 2- Suplementos de óleo de peixe para o tratamento de doenças crônicas: o desafio de se evitar alta carga de comprimidos e de se atingir doses compatíveis com sua propriedade funcional</b> .....	70

7.1 Introdução .....	72
7.2 Métodos .....	74
7.3 Resultados .....	75
7.4 Discussão.....	78
7.5 Conclusão .....	81
<b>8. CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>87</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>98</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O aumento da expectativa de vida, a urbanização e o estresse crônico refletem em um aumento na incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) (INCA, 2014). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as DCNT foram responsáveis por 63% dos óbitos mundiais em 2008 (WHO, 2014). No Brasil, as DCNT são consideradas o principal problema de saúde pública e representam cerca de 74 % das causas de morte em 2014, sendo as principais, as doenças cardiovasculares (DCV) (SCHIMIDT et al., 2011; WHO, 2014). Assim como a mortalidade, morbidade por DCNT aumentou nas últimas décadas e a principal faixa etária afetada é a de adultos, que apresentam 19 % de risco de morte por alguma DCNT (BRASIL, 2015; INCA, 2014; WHO, 2014).

O Plano de Ações Estratégicas para o Enfrentamento das DCNT no Brasil 2011-2022 prioriza o combate aos principais fatores de risco no País, como a alimentação inadequada. Estratégias para esse combate incluem o incentivo ao consumo de lipídios com um perfil qualitativo equilibrado: redução no consumo alimentos ricos em gordura saturada e aumento do consumo de gorduras poli-insaturadas, como o ômega 3 ( $\omega$ -3) (BRASIL, 2011). Os ácidos graxos (AG)  $\omega$ -3 eicosapentenoico (EPA) e docosaexenoico (DHA) são importantes para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e hipertrigliceridemia (ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002; SANTOS et al., 2013; WANG et al., 2006).

Fontes de  $\omega$ -3 incluem os peixes marinhos, principalmente os de águas frias (salmão, sardinha, bacalhau, etc.) (PESCADOR, 2006). No Brasil e no mundo, o consumo desses alimentos é baixo, se comparado a outras fontes protéicas, como a carne e o frango (BRASIL, 2010a; USDA, 2010; ALBERT; METIAN, 2013). Como fator complicador, o armazenamento e a cocção reduzem o valor nutricional dos peixes, tanto de vitaminas, como de gorduras, que podem se oxidar quando expostas ao calor (PESCADOR, 2006).

Os suplementos de óleo de peixe em cápsulas (OPC) são uma alternativa eficiente para consumo de EPA e DHA. É importante considerar uma quantidade adequada desses nutrientes nas cápsulas, nível de oxidação e ausência de toxicidade por metais pesados, além de uma rotulagem clara e completa, para que o consumidor tenha informações adequadas a respeito do produto (ANVISA 2005; ANVISA, 2016). Assim, as prescrições por profissionais de saúde, as propagandas

veiculadas na mídia e a venda de OPC crescem a cada ano no Brasil e no mundo (MURGEL et al., 2013; ITO, 2015). Estes são classificados como suplementos alimentares que podem ser vendidos sem prescrição médica (BRASIL, 2009). A venda livre e o apelo da mídia podem levar o consumidor a comprar o suplemento em função de seu custo ou em função de alegação no rótulo (MURGEL et al., 2013).

O consumo excessivo de óleo de peixe (> 3 g/ dia) pode causar diarreias, desconforto gástrico e hemorragias, e doses abaixo das prescritas podem comprometer a ação desejada (FDA, 1997; WANG et al., 2006; MURGEL et al., 2013). Assim, é necessário que o consumidor conheça o produto a ser consumido para otimizar o efeito benéfico desejado e evitar efeitos deletérios à saúde (MURGEL et al., 2013).

Poucos estudos realizados no Brasil analisaram a composição de ácidos graxos, nível de oxidação e presença de metais pesados de OPC em relação às exigências da legislação brasileira e às recomendações de organizações internacionais. Apesar de a legislação vigente estabelecer requisitos para a comercialização destes produtos, outros fatores são necessários para garantir um suplemento de qualidade ao consumidor, como armazenamento adequado.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Processamento de Óleos de Peixe

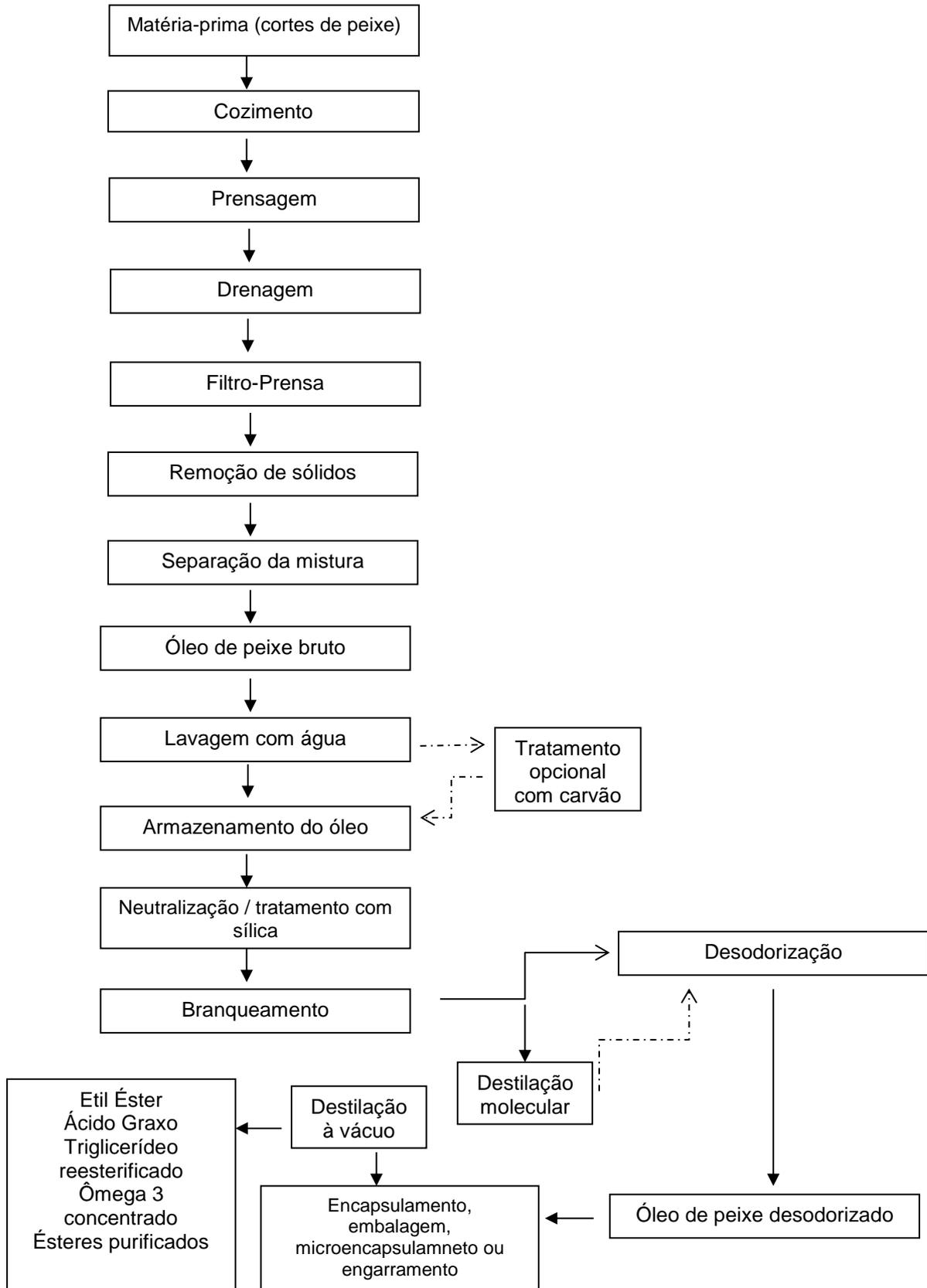
Os peixes utilizados para a produção de óleo em escala industrial são das mais diversas origens, como aqueles capturados para a produção de óleo, de farinha e de outros derivados do peixe; peixes de baixo valor comercial adquiridos de pescarias para outros fins distintos à produção de óleo; e resíduos de peixe e suas vísceras provenientes da indústria de processamento (FAO, 1986). Os peixes são geralmente pelágicos e de pequeno porte, como a anchova e savelha (FAO, 2015). De toda a produção de óleo de peixe, apenas 25 % é destinada a produção de OPC e o restante, geralmente, se destina à aquicultura (CAMERON-SMITH et al., 2015).

Há diversas maneiras de extrair o óleo de peixe de sua matéria-prima. O método a ser utilizado sempre deve levar em consideração que a matéria-prima é composta por três elementos: óleo, sólidos (extrato seco livre de gordura) e água. De toda maneira, a maioria dos métodos relevantes de extração e refino segue os seguintes passos (FAO, 1986; SEGURA, 2012):

- Aquecimento dos cortes de peixe fresco;
- Drenagem/ decantação e prensagem/ centrifugação: para separar a parte sólida da mistura óleo/ água;
- Fracionamento dos fluidos provenientes da prensagem/ centrifugação: para separação da mistura óleo/ água;
- Purificação do óleo.

Detalhadamente, um exemplo de processo de fabricação de OPC é descrito na figura 2.1. Após a extração dos óleos de peixe dos tecidos com aplicação de vapor, o refino do óleo bruto é semelhante ao dos óleos vegetais. Todo o processo de extração e fabricação do óleo de peixe deve ocorrer em condições que evitem a oxidação da matéria prima, com proteção contra altas temperaturas, luz e radiação.

No Brasil, basicamente ocorre encapsulamento e embalagem dos óleos de peixe (PACHECO, 2005). O óleo de peixe bruto geralmente é importado de países como o Peru, que é o maior exportador de óleo de peixe do mundo (PACHECO, 2005; SEGURA, 2012; PIKE; JACKSON, 2010).



**Figura 2.1** Produção de óleos de peixe (adaptação de AOCS, 2011)

A purificação do óleo de peixe é um processo importante da produção do óleo de peixe, em que há a remoção de substâncias indesejadas, pesticidas, metais

pesados e poluentes. Vários métodos podem ser empregados para este fim, como: cristalização a baixas temperaturas, extração de íons metálicos com agentes complexantes, extração supercrítica de fluidos, complexação com ureia, hidrólise catalisada por lipase e destilação molecular. Estes métodos podem ser otimizados ou combinados para se atingir um produto com grau de pureza otimizado (LIN et al., 2014; HAJEB et al., 2014).

Podem-se empregar as técnicas de complexação de ureia e destilação molecular em um mesmo produto. A complexação com ureia é utilizada na remoção de AG mono e saturados, no processo de concentração de EPA e DHA no óleo de peixe. A destilação molecular é uma técnica de separação líquido-líquida baseada na diferença do livre caminho médio das moléculas, sob condições de alto vácuo. A pequena distância entre o condensador e o evaporador, e o vácuo no espaço da destilação permitem que o líquido seja exposto a menores temperaturas por um curto período de tempo para que os materiais termolábeis não sejam facilmente decompostos. Por ser um método que não utiliza solventes, por minimizar as perdas de AG por decomposição térmica e por gerar menos resíduos e riscos, é considerado um método adequado para a separação de AG poli-insaturados (LIN et al., 2014).

O método de extração supercrítica de fluidos é um processo baseado na dissolução de substâncias em fluido com habilidade de solvatação modificada, acima de suas condições críticas de temperatura e pressão, e as propriedades do fluido supercrítico são usadas para extração de compostos específicos de diversas substâncias por modificação de pressão e temperatura, sem a necessidade de uma fase intermediária. Esse método, otimizado com o planejamento composto central (*Central Composite Design CCD*) para o estudo da superfície de resposta, mostrou-se eficaz para a remoção de mercúrio, cádmio, chumbo e arsênio de óleos de peixe, e pode ser usado para extração e refino de óleos (HAJEB et al., 2014).

## **2.2 Formulações Comercializadas de Óleo de Peixe**

Na natureza, o óleo de peixe pode apresentar perfis distintos de ácidos graxos, devido ao acúmulo de variáveis níveis de ácidos graxos na cadeia trófica de um certo ecossistema (BUDGE et al., 2002; KAYA; ERDEM, 2009). Usualmente, o óleo de peixe bruto apresenta 18 % de EPA e 12 % de DHA, cerca de 1/3 da

molécula de TAG é composta por  $\omega$ -3 (SCHUCHARDT et al., 2013). Assim, há necessidade de padronização da concentração do produto comercializado, bem como aprimoramento da qualidade do perfil de ácidos graxos no óleo.

Os óleos de peixe comercializados atualmente podem estar em diversas formulações e concentrações (SANTOS et al., 2013). A indústria tem utilizado recursos tecnológicos para reformular óleos de peixe brutos em produtos mais concentrados, viabilizando o aporte de doses mais altas de EPA e DHA a partir do consumo de um menor número de cápsulas. Desta forma, pode-se melhorar a adesão dos pacientes a tratamentos com cápsulas de óleo de peixe (DYERBERG et al., 2010).

A cápsula de óleo de peixe é composta por EPA e DHA e outros ingredientes, como: outros ácidos graxos poli-insaturados, monoinsaturados e saturados; gelatina e glicerina (veículos). A concentração de EPA e DHA pode ser tão eficiente, que chega a ter de 30 % a até 90 % em apresentações mais concentradas (SANTOS et al., 2013).

O óleo de peixe bruto pode sofrer diversas modificações pela indústria para refino de suas características físico-químicas, como hidrogenação, interesterificação e fracionamento. A interesterificação é um dos métodos utilizados para concentração dos óleos no conteúdo de EPA e DHA. O processo de interesterificação pode ser classificado em quatro tipos diferentes de reações (OLIVEIRA et al., 2004; MOURA et al., 2006):

- Glicerólise (troca de grupos acila entre um triacilglicerol (TAG) e um glicerol);
- Acidólise (troca de grupos acila entre um éster e um ácido);
- Alcoólise (troca de grupos acila entre um éster e um álcool);
- Transesterificação (troca de radicais acil entre um éster e outro éster).

Os diversos tipos de apresentação de óleo de peixe comercialmente disponíveis são (DYERBERG et al., 2010):

- TAG natural;
- Ácido Graxo (AG) livre;
- Etil Éster (EE) de AG;
- TAG reesterificado.

O TAG natural é o óleo bruto, que pode ser comercializado, porém em uma concentração menor do que as outras formas comerciais. A partir do TAG natural, podem ser realizadas transformações laboratoriais para se conseguir uma versão mais concentrada (DYERBERG et al., 2010).

O AG livre não é comercializado em cápsulas, mas é disponível na indústria para outros fins. Para a transformação do TAG natural em AG livre ocorre o processo de hidrólise ácida (acidólise), no qual são formados glicerol e AG (ácidos carboxílicos) correspondentes. Assim, pode-se ter AG livres de EPA e DHA (DYERBERG et al., 2010). A obtenção de AG livres pelo processo convencional utiliza temperaturas elevadas, entre 150 e 280 °C, de acordo com o tempo de reação desejado, o que pode levar à oxidação do óleo de peixe, deixando-o impróprio para o fim pretendido (MOURA et al., 2006).

A partir do AG livre, forma-se o EE de AG, pelo processo de esterificação com etanol. No entanto, como a etapa anterior de obtenção do AG livre requer altas temperaturas (150-280 °C), a reação de alcoólise mostrou-se viável para a produção de ésteres etílicos, devido à possibilidade de utilização de temperaturas muito baixas, na faixa de 40 °C. O processo proposto é uma alternativa tecnológica para óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, conferindo-lhes maior proteção à oxidação. Este método se baseia na reação entre o TAG e um álcool, que gera ésteres de AG (etil ou metil) a depender do álcool empregado a partir do deslocamento do glicerol pelo álcool na presença de catalisadores (MOURA et al., 2006).

Assim, a produção de EE de AG é uma alternativa para o problema da oxidação dos ácidos graxos, mas mantendo a produção de lipídios estruturados específicos, pois os EE de AG podem ser produzidos a baixas temperaturas, o que aumenta sua estabilidade e poder de causar benefícios à saúde (MOURA et al., 2006). O EE de AG é mais estável que o AG livre e pode ser comercializado em forma de cápsulas. Assim, comercializa-se um óleo rico em EE de EPA e DHA, sendo uma versão mais concentrada do que o óleo de peixe bruto, porém, menos biodisponível do que este (DYERBERG et al., 2010; NEUBRONNER et al., 2011).

Por fim, tem-se o TAG reesterificado (TAGr), a partir da transesterificação enzimática de três EE de AG com glicerol. Com este processo, consegue-se comercializar cápsulas com TAG elaborados laboratorialmente com maior concentração dos AG de interesse. São bastante estáveis, devido à presença de um

glicerol unindo os AG, e são a forma com mais alta biodisponibilidade, se comparados ao TAG natural e os EE de AG (DYERBERG et al., 2010).

### **2.3 Biodisponibilidade das Formulações de Óleo de Peixe**

A variação de biodisponibilidade entre as formulações dos AG  $\omega$ -3 (TAG, EE e TAGr) pode ser explicada por diversos motivos: atividade da lipase pancreática, a posição do AG de interesse na cadeia de glicerol do TAG, a posição da dupla ligação do grupo carboxila terminal, a massa molecular da formulação de  $\omega$ -3, e a atual matriz em que o AG é apresentado (SCHUCHARDT et al., 2013). Por exemplo, a digestão do EE de AG é prejudicada em relação à do TAG como resultado da ausência da cadeia de glicerol em sua estrutura. A lipase pancreática hidrolisa os AG da cadeia de etanol do EE de AG no intestino delgado e este é mais resistente à hidrólise do que o AG proveniente do TAG (OPPERMAN et al., 2013). Esta biodisponibilidade pode ser implementada com a ingestão concomitante de refeição contendo gordura (SCHUCHARDT et al., 2013).

Em diversos estudos, a biodisponibilidade dos AG  $\omega$ -3 é determinada pelos níveis séricos nestes nutrientes. No entanto, esta concentração sérica não reflete o real efeito fisiológico dos AG EPA e DHA no organismo, que possuem ação fisiológica importante nos tecidos em que se incorporaram (GHASEMIFARD et al., 2014). Diante dessa variação de biodisponibilidade entre os diversos tipos de apresentação de OPC comercializados, sugere-se que os efeitos biológicos deste suplemento sejam aferidos pelo índice de  $\omega$ -3, que é a medida da concentração dos AG EPA e DHA na membrana eritrocitária, e que apresenta forte correlação com a concentração desses ácidos graxos em outros tecidos, como miocárdio, fígado e rins (SCHUCHARDT et al., 2013; FLACHS et al., 2014). Harris & Schacky (2004) sugerem a utilização clínica do índice de  $\omega$ -3, por ser um marcador do risco de doenças cardiovasculares. Índice de  $\omega$ -3  $\geq$  8 % indica baixo risco cardiovascular e < de 4 % indica alto risco cardiovascular.

Além da biodisponibilidade, deve ser considerada a segurança da ingestão dos AG nas diferentes formulações existentes. Não é consenso se o consumo de EE de AG é seguro durante a gestação, por exemplo, pois, durante a digestão do  $\omega$ -3 nesta formulação, o EE é convertido a TAG, com a liberação de uma molécula de

álcool. Apesar de ser uma quantidade pequena, a segurança do consumo de EE é controversa para grupos de risco, como crianças e gestantes, pois este pode ser tóxico para o coração, fígado, pâncreas e, possivelmente, para a placenta (OPPERMAN et al., 2013).

Considerando diferentes níveis de biodisponibilidade e segurança das diferentes formulações, é importante que esta seja especificada no rótulo do produto (OPPERMAN et al., 2013).

## **2.4 Oxidação de Lipídios**

As duplas ligações na estrutura de AGPI, principalmente do EPA e do DHA, os tornam bastante suscetíveis à oxidação. Essa pode ocorrer de diversas maneiras, de acordo com o meio e os agentes catalisadores (SILVA et al., 1999), durante o processamento do óleo de peixe ou até mesmo após seu encapsulamento (TURNER et al., 2006). Por isso, os OPC são os suplementos mais suscetíveis à oxidação existentes no mercado (CAMERON-SMITH et al., 2015).

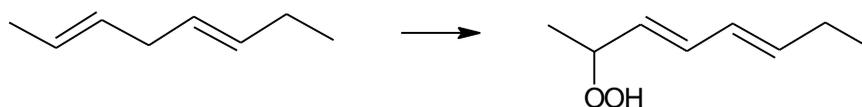
A degradação do óleo de peixe se inicia quando os AGPI entram em contato com  $O_2$  e diversos fatores podem favorecer e acelerar a oxidação desses AG (TURNER et al., 2006). Como o óleo de peixe para a produção de OPC é selecionado entre parte do óleo destinado à aquicultura, é difícil relacionar a origem do óleo, data de fabricação e o tipo de refino do óleo com o nível de oxidação do produto final. Assim, as indústrias devem dosar os níveis de oxidação de seus produtos constantemente, antes de serem distribuídos no comércio (CAMERON-SMITH et al., 2015).

A auto-oxidação é o principal mecanismo responsável pela oxidação de óleos e trata-se de um processo químico complexo com formação de radicais livres, na presença de iniciadores, que ocorre de acordo com a evolução do tempo e condições de armazenamento do óleo. Os iniciadores catalisadores desse processo incluem: calor, íons metálicos, radicais livres, alteração do pH do meio ou até hidroperóxidos (SILVA et al., 1999).

A foto-oxidação pode ocorrer a partir da exposição dos lipídios à radiação ultravioleta (UV) na presença de sensibilizadores (compostos químicos excitados pelos raios UV) e é mais rápida do que a auto-oxidação (SILVA et al., 1999). Diante da exposição à radiação UV, o oxigênio tripleto ( $^3O_2$ ) é convertido a oxigênio singlete

( $^1\text{O}_2$ ), que interage com as duplas ligações do AGPI, com formação de hidroperóxidos e compostos que podem desencadear reações de auto-oxidação (TURNER et al., 2006). A oxidação de AGPI, ainda, pode ocorrer devido à catálise enzimática, especificamente pela lipoxigenase (SILVA et al., 1999).

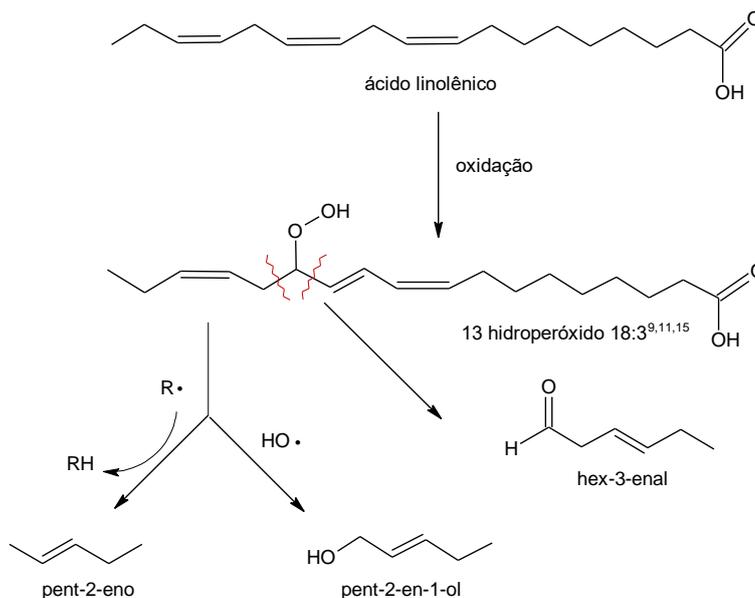
A partir da oxidação dos AGPI, tem-se a formação dos compostos primários da oxidação. Nestes, pode-se ver a formação de hidroperóxidos e, a depender das posições das duplas ligações, pode haver deslocamento de uma destas, com formação de dienos conjugados, como mostra o esquema da figura 2.2 (SILVA et al., 1999).



**Figura 2.2** Produção de hidroperóxidos e dienos conjugados (adaptado de SILVA et al., 1999)

Os hidroperóxidos (compostos primários da oxidação) são intermediários instáveis, principalmente a temperaturas elevadas ou em presença de metais de transição, devido à fraca ligação entre os seus átomos de oxigênio. Dessa forma, podem se decompor com a produção de compostos designados como produtos secundários da oxidação, que possuem naturezas diversas e são responsáveis pela rancidez e odor desagradável dos óleos, como alguns compostos voláteis dos diferentes grupos: aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos (SILVA et al., 1999). Eventualmente, esses podem ser convertidos a compostos terciários da oxidação (TURNER et al., 2006).

A Figura 2.3 exemplifica um processo de oxidação do AGPI  $\omega$ -3 ácido linolênico, gerando seus produtos primários e secundários. Inicialmente, a remoção de um átomo de hidrogênio do carbono 11 do ácido linolênico gera o 13-hidroperóxido<sup>9,11,15</sup>, que pode ser decomposto formando radicais hidroxila e alcóxila, que, posteriormente, originam os compostos secundários da oxidação, como hidrocarbonetos (ex: penteno) e álcoois (ex: pentenol). Ainda, pode haver a formação de aldeídos (ex: hexenal) a partir da degradação dos hidroperóxidos (ARAÚJO, 2008).



**Figura 2.3** Produtos primários e secundários da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (adaptado de ARAÚJO, 2008)

Os compostos gerados a partir da oxidação dos APGI podem ser quantificados experimentalmente. Por exemplo, para a quantificação dos hidroperóxidos (compostos primários da oxidação), podem ser usados os métodos: índice de peróxidos e o teste colorimétrico *Ferrous Oxidation - Xylenol Orange* (FOX). Para a quantificação dos compostos secundários, podem ser realizados os testes: teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), índice de anisidina, índice de ranço, cromatografia gasosa com espectrometria de massa e termólise (SILVA et al., 1999).

Para evitar a oxidação dos óleos, com preservação de sua qualidade, vida de prateleira e propriedades sensoriais, antioxidantes são adicionados durante o processo de produção (TURNER et al., 2006; CAMERON-SMITH et al., 2015).

Os antioxidantes podem atuar eliminando radicais livres por sua atividade seqüestrante, sendo estes os antioxidantes primários, como os compostos fenólicos, sendo um deles a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). Amplamente utilizado como antioxidante de lipídios, o  $\alpha$ -tocoferol pode atuar reagindo com o radical peroxila para interromper a propagação da oxidação e com o radical alcoxila para inibir a decomposição de hidroperóxidos em aldeídos (FRANKEL, 1996).

Antioxidantes também podem atuar por mecanismos que não envolvem o sequestro direto de radicais livres (antioxidantes secundários), mas pela ligação de íons metálicos, sequestro de oxigênio, conversão de hidroperóxidos em espécies estáveis (não-radicais), absorção de radiação UV ou desativação de oxigênio

singlete. Como exemplo, o ácido cítrico é um agente seqüestrante, eficaz apenas na presença de íons metálicos. Já o ácido ascórbico, em sua ação redutora, é eficaz na presença de tocoferóis ou outros antioxidantes primários (FRANKEL, 1996). O ácido ascórbico ainda, pode causar o seqüestro de radicais livres, que é o principal mecanismo antioxidante de alimentos e são efetivos contra a auto-oxidação, pois tornam o oxigênio indisponível para propagar a oxidação (TURNER et al., 2006).

Especificamente em relação ao óleo de peixe, o processo oxidativo pode se iniciar ainda com o peixe vivo durante sua captura. O processamento do óleo, principalmente durante sua extração do tecido animal e centrifugação, pode expor os AG EPA e DHA a calor e oxigênio, com geração de hidroperóxidos. Após a etapa de purificação, o óleo geralmente é armazenado em tambores livres de luz, para evitar produção de peróxidos. A adição de antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol, e a ausência de espaço livre no tambor também previnem a oxidação do óleo (TURNER et al., 2006). Ainda, durante o processamento de óleo de peixe, podem ser realizados aspersão de nitrogênio para remoção de oxigênio e atmosfera inerte com nitrogênio para manutenção de ambiente livre de oxigênio durante o armazenamento (PACHECO, 2005). A quantidade de antioxidantes do óleo de peixe pode ser reduzida ao longo do seu tempo de prateleira, apesar de o produto estar dentro do prazo de validade (FRANKEL, 1996).

Quanto à saúde do consumidor, os AG oxidados podem causar diversos efeitos deletérios ao organismo, como: estresse oxidativo, inflamação, alterações na função vascular e aterosclerose (TURNER et al., 2006). O consumo de óleo de peixe oxidado pode, inclusive, reduzir o efeito compatível com sua propriedade funcional desejado. É possível que diversos estudos randomizados tenham encontrado limitados efeitos benéficos do óleo de peixe por terem utilizado OPC oxidado, sendo de extrema relevância a dosagem do IP, IA e TOTOX no produto a ser ofertado aos voluntários antes do início dos estudos (CAMERON-SMITH et al., 2015).

No entanto, baixos níveis de oxidação são permitidos por regulamentos oficiais internacionais sobre o tema. A ANVISA determina que os fabricantes sigam as diretrizes estabelecidas pelas principais referências oficiais reconhecidas como parâmetro para avaliar a qualidade do OPC (ANVISA, 2016). Diretrizes internacionais que tratam sobre o assunto incluem: *US Council For Responsible Nutrition* (US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, 2006), *Global*

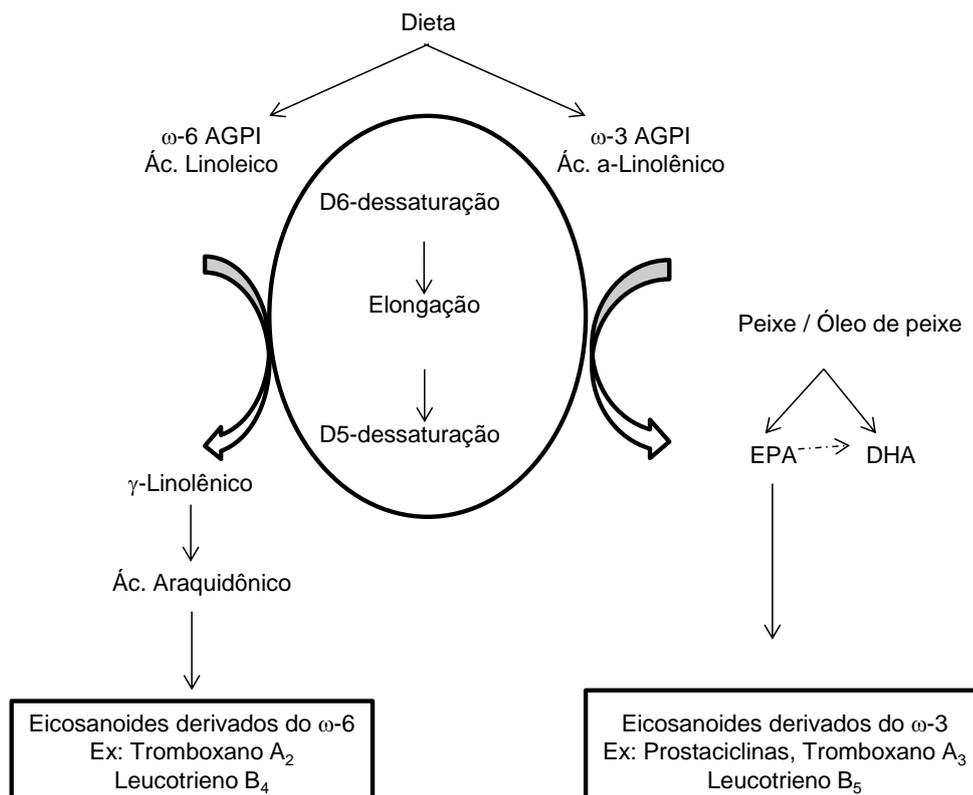
*Organization for EPA and DHA - GOED (GOED, 2012) e Health Canada (HEALTH CANADA, 2013).*

## **2.5 Ácidos Graxos Essenciais e Eicosanoides**

O organismo humano não produz certos tipos de ácidos graxos poli-insaturados, sendo considerados essenciais os seguintes ácidos graxos (AG) das famílias  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3: ácido linoleico (LA) C18:2  $\omega$ 6 e alfa-linolênico – ALA C18:3 (9,12,15)  $\omega$ -3, respectivamente. Os AG da família  $\omega$ -3 são: o ALA, o eicosapentenoico – EPA C20:5(5,8,11,14,17)  $\omega$ -3 e o docosaexenoico – DHA C22:6(4,8,12,15,19)  $\omega$ -3, que são derivados a partir do ALA, pelas enzimas elongases e dessaturases. Da mesma maneira, o LA pode ser convertido no organismo em ácido araquidônico (AA) 20:4- $\omega$ -6 (PLOURDE; CUNNANE, 2007).

Ambos ALA e LA, no organismo humano (principalmente no fígado), podem seguir um trajeto de dessaturações e alongamentos para gerar os outros ácidos graxos membros da família  $\omega$ -3 e  $\omega$ -6, respectivamente (PLOURDE; CUNNANE, 2007). Porém, a taxa de conversão de ALA para EPA e DHA no organismo humano é baixa, abaixo de 5 % e 0,5 %, respectivamente, podendo ser até não significativa ou negligenciável, dependendo do indivíduo, estado de saúde ou da fase da vida (Figura 2.4) (ISSFAL, 2009). Dietas ricas em  $\omega$ -6 podem reduzir essa taxa de conversão em até 40 - 50 % (GERSTER, 1998).

A taxa de conversão de ALA para EPA e DHA e de LA para seus derivados é influenciada pelo conteúdo de ácidos graxos da dieta, tendendo a aumentar quando a dieta é pobre em ALA/ LA ou quando o conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados nas membranas celulares está reduzido, mas podendo ser reduzida se houver deficiência de cofatores envolvidos nesse processo de conversão, como vitamina B<sub>6</sub>, zinco e ferro (PLOURDE; CUNNANE, 2007). A proporção de  $\omega$ -6: $\omega$ -3 na dieta deve ser de 2-5:1, para que haja maior eficiência de conversão de ALA para EPA e DHA (MARTÍN et al., 2006). Em crianças e neonatos, esta conversão é maior do que em adultos, e, em mulheres, maior do que em homens (ISSFAL, 2009).



**Figura 2.4** Trajeto endógeno do ácido α-linoleico e α-linolênico (adaptado de LEE; LIP, 2003)

Esses dados podem ser verificados pela utilização de isótopos e radioisótopos de ALA ou ainda pela avaliação da dosagem sérica de DHA após a ingestão de óleo de linhaça (composto majoritariamente por ALA), que permanece semelhante à dosagem anterior a este consumo na maioria dos casos (PLOURDE; CUNNANE, 2007).

Dados sugerem que o consumo de EPA também não é capaz de alterar significativamente os níveis séricos de DHA. A família ω-3 é precursora de eicosanóides (prostaglandinas da série 3 e leucotrienos da série 5) e outros mediadores anti-inflamatórios, o que é benéfico à saúde e combate doenças inflamatórias e cardiovasculares (SANTOS et al., 2013). Especificamente, benefícios são vistos com tratamentos à base de EPA e DHA, e não a base de ALA (WANG et al., 2006). Exceto em indivíduos saudáveis com dieta balanceada, para que haja o benefício à saúde proveniente dos ácidos graxos EPA e DHA, devido à baixa conversão de ALA para EPA e DHA no organismo humano, pode ser necessária uma fonte exógena desses nutrientes (BURDGE et al., 2005; PLOURDE; CUNNANE, 2007). O óleo de peixe é uma fonte exógena importante para este fim por conter altos níveis desses dois ácidos graxos (SEGURA, 2012).

Quantos aos ácidos graxos  $\omega$ -6, após a ingestão, o LA pode sofrer alterações de dessaturação e alongamento para formar o AA a partir da seqüência: ácido gamalinolênico; ácido di-homo-gamalinolênico; AA. No fim da conversão, apenas cerca de 0,1 % do LA ingerido é convertido a AA (PLOURDE; CUNNANE, 2007). O AA (20:04  $\omega$ -6), que serve de substrato para uma grande variedade de importantes eicosanoides com ação pró e anti-inflamatória, mas a maioria especialmente de algumas moléculas pró-inflamatórias, vasoconstritoras ou pró-agregantes, ex: prostaglandina E2, tromboxano A2 e leucotrieno B4 (PLOURDE; CUNNANE, 2007; SANTOS et al., 2013).

Os AG da série  $\omega$ -3 também são substratos de eicosanóides. Os AG  $\omega$ -6 e  $\omega$ -3, com 20 carbonos (AA e EPA) são substratos naturais das cicloxigenases (COX) e estas competem entre si pela enzima COX. Na presença de EPA os eicosanoides sintetizados, que são da série ímpar, são menos inflamatórios. Além disso, sabe-se atualmente que outras substâncias derivadas dos AG  $\omega$ -3, como resolvinas e protectinas, auxiliam no processo de retorno à homeostase pós-inflamatória (FLACHS et al., 2014).

## **2.6 Efeitos Fisiológicos do Ômega-3 nas DCNT**

Maiores níveis sanguíneos de EPA e DHA estão associados a um menor risco de mortalidade por DCV e infarto (SCHACKY, 2014). Mecanismos biológicos que explicam este efeito protetor indicam que a prevenção de DCV é decorrente da redução de arritmias, redução da trigliceridemia, redução da inflamação sistêmica, redução da pressão arterial e também da agregação plaquetária (WANG et al., 2006).

Como explicação para a redução da pressão arterial, tem-se que os AG  $\omega$ -3 promovem a redução da resistência vascular sistêmica e do tônus adrenérgico, promovendo a ativação do relaxamento endotelial induzido pelo óxido nítrico (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

O efeito anti-inflamatório pode ser explicado, pois o  $\omega$ -3 caracteriza-se pela produção de diversos eicosanoides e outros mediadores anti-inflamatórios, assim como a redução de marcadores com ação majoritariamente pró-inflamatória (ex: interleucinas IL-6 e IL-8, moléculas de adesão e a Proteína C Reativa). O EPA é capaz de substituir o AA nas membranas celulares e também de competir pelas

cicloxygenases, o que resulta na modulação dos eicosanoides com redução da produção de prostaciclina e de leucotrienos da série 4 e aumento da produção de leucotrienos da série 5. O DHA não inibe diretamente o metabolismo do AA, mas reduz a afinidade plaquetária dos receptores do tromboxano A<sub>2</sub> e da prostaglandina PGH<sub>2</sub> a seus respectivos ligantes, conhecidos por seus efeitos pró-inflamatórios (KRIS-ETHERTON et al., 2002). Achados consistentes indicam que o  $\omega$ -3 pode ser incorporado facilmente à placa aterosclerótica tornando-a menos vulnerável a rupturas e instabilidade por meio de suas propriedades anti-inflamatórias e da redução da expressão de moléculas de adesão (ex: molécula de adesão Intercelular-1 - ICAM-1; molécula de adesão da célula vascular 1 – VCAM-1 e E-selectina) e do fator de crescimento derivado de plaquetas (KRIS-ETHERTON et al., 2002; SANTOS et al., 2013).

Como explicação para redução das arritmias, tem-se a ação dos  $\omega$ -3 diretamente nos canais iônicos, na modulação do tônus autonômicos, na redução da frequência e na limitação da arritmia de reperfusão (SANTOS et al., 2013).

O efeito benéfico do consumo de óleo de peixe no metabolismo lipídico pode ser explicado por sua ação no fígado de acordo com os seguintes mecanismos: aumento da oxidação de AG nos peroxissomas e nas mitocôndrias; inibição da expressão de genes envolvidos na lipogênese (pela redução da expressão do gene SREBP-1), com consequente redução da formação de AG, TAG e VLDL; maior produção de mediadores anti-inflamatórios lipídicos derivados do  $\omega$ -3, como resolvinas E1 e D1 e protectina D1, que protegem o hepatócito do estresse oxidativo e do dano em seu DNA, em casos de esteatose e cirrose hepática (FLACHS et al., 2014).

Uma intervenção nutricional em pacientes com diabetes tipo 2, que associou 1,6 g/dia de EPA e 0,8 g/dia de DHA a uma dieta hiperproteica de baixo índice glicêmico, obteve uma melhora dos marcadores inflamatórios, controle glicêmico e circunferência da cintura (MOOSHEER et al., 2014). Flachs et al. (2014), sugeriram que o consumo de  $\omega$ -3 seja eficaz na prevenção de diabetes e, em pacientes diabéticos, reduza a hipertrigliceridemia, mas não melhore do controle glicêmico (FLACHS et al., 2014). Sugere-se que o  $\omega$ -3 interfere na sensibilidade à insulina e redução de sua secreção, com consequente aumento da glicemia, maior oxidação

de reservas corporais de gordura e menor oxidação de reservas de carboidrato (DELARUE et al., 2003).

Assim, para prevenção de DCNT, as recomendações baseiam-se em quantidades específicas de EPA e DHA, apesar de que o Instituto de Medicina americano (IOM) ainda não estabeleceu níveis diários recomendados (DRI) desses nutrientes para reduzir os danos causados pelas DCNT, mas apenas para ALA (FLOCK et al., 2013). Para a obtenção de resultados efetivos, o paciente deve ingerir na dosagem específica indicada para cada doença, segundo orientação médica (SCHACKY, 2014).

Em linhas gerais, de forma preventiva, recomenda-se o consumo de 0,5 a 1,8g de EPA + DHA para redução da mortalidade por DCV e por causas gerais (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para redução dos riscos de DCV indicam, com evidência B, o consumo de  $\omega$ -3 proveniente de OPC (1g/dia) ou 2 porções de peixe por semana (SANTOS et al., 2013). As diretrizes americanas, mais específicas, recomendam o consumo de EPA + DHA, de 500 mg/dia (ISSFAL, 2004; SMITH, 2011). Para o tratamento de DCV, a AHA (*American Heart Association*) recomenda o dobro da dose recomendada para prevenção, sendo de 1g de EPA + DHA por dia (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Quanto às dislipidemias em geral, revisão da literatura indica que o consumo de 2-4g/dia de óleo de peixe tem recomendação IA para tratamento de hipertrigliceridemia grave (> 500 mg/dL), com risco de pancreatite, refratária a tratamento medicamentoso (SANTOS et al., 2013). Esse efeito de redução da trigliceridemia pode ser visto tanto no jejum, como no período pós-prandial. No entanto, a AHA sugere que o consumo para este grau de patologia seja de 2 a 4 g de EPA + DHA, e não do óleo bruto (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

O consumo de óleo de peixe deve ser monitorado por profissional de saúde especializado, pois doses acima de 3 g por dia de EPA + DHA podem trazer danos à saúde, como hemorragias, distúrbio gastrointestinais, náuseas, aumento do LDL, em casos de hipertrigliceridemia e aumento da glicemia, em casos de pacientes com resistência à insulina ou diabetes mellitus tipo 2 (FDA, 1997; WANG et al., 2006). Assim, para que o consumo total diário de EPA e DHA não exceda o valor de 3 g, a FDA (2000) recomenda que os fabricantes de óleo de peixe estabeleçam no rótulo

uma porção diária que corresponda a, no máximo, 2 g de EPA e DHA, pois esses AG também podem ser ingeridos a partir de alimentos, como o peixe (FDA, 2000).

## **2.7 Rotulagem de óleo de peixe em cápsulas**

Na Anvisa, os OPC são classificados como novos alimentos – NA - (óleo de peixe com apresentação em cápsulas) e podem apresentar alegação de propriedade funcional ou de saúde (APFS) (ANVISA, 2005; ANVISA, 2016). Essa alegação indica que, se ingeridos em doses adequadas, os AG EPA e DHA: “... auxiliam na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, desde que associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (ANVISA, 2016). A APFS (ou sua ausência) deve constar na rotulagem, e é necessário que todos os OPC tenham registro, que deve ser explicitado no rótulo (BRASIL, 1969; BRASIL, 1999). Este controle é exercido pelos órgãos fiscalizadores do Estado, no caso pela Anvisa, que possui poder de polícia, limitado às atribuições descritas na Portaria nº 1.161/2012, vedado à iniciativa privada (BRASIL, 2012).

Ao longo das décadas, a legislação brasileira foi implementada e diversos regulamentos foram criados com diretrizes para a elaboração de rótulos de alimentos. Especificamente quanto ao OPC, dois regulamentos complementares foram publicados em 2005 e 2016, para classificação como novos alimentos ou como alimentos com APFS, respectivamente. Assim, os rótulos de OPC devem atender às exigências dos seguintes regulamentos:

1 - Decreto-Lei nº 986 / 69: Institui normas básicas sobre alimentos (BRASIL, 1969);

2 - RDC nº 19 / 1999: Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde em sua Rotulagem (BRASIL, 1999);

3 - RDC nº 259 / 2002: Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados (BRASIL, 2002);

4 - RDC nº 360 / 2003: Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional (BRASIL, 2003);

5 - Site Anvisa: Alimentos. Assuntos de Interesse. Novos Alimentos e Novos Ingredientes. (ANVISA, 2005);

6 - Site Anvisa: Assuntos de Interesse. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde (ANVISA, 2016).

O regulamento para OPC com APFS foi primeiramente publicado em 2005, e exigia que o produto deveria conter, no mínimo, 100 mg de EPA e DHA por porção diária recomendada no rótulo (ANVISA, 2008). No entanto, também era exigido que os fabricantes de OPC obrigatoriamente comprovassem a APFS declarada com base na recomendação diária indicada no rótulo. Essas duas exigências geravam conflito de informação e base inconsistente para o estabelecimento, pela indústria, de quantas cápsulas representariam uma porção.

Em 2016, o regulamento para APFS dos AG EPA e DHA foi revisto. A quantidade de EPA e DHA por porção pode variar, não havendo quantidades mínimas destes AG estabelecidas, desde que a indústria comprove a APFS em estudos realizados em humanos que utilizaram seu produto (ANVISA, 2016).

## **2.8 Estudos prévios de relevância**

No Brasil, há poucos estudos publicados em periódicos indexados que tenham analisado a composição de OPC adquiridos no comércio. Fantoni et al. (1996) analisaram a composição e o rótulo de 16 amostras de óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau. Os autores encontraram um índice de peróxidos (IP) variável de 2,1 a 20,3 mEq de O<sub>2</sub>/kg de óleo (alta) nas diversas amostras e componentes polares entre 0,1 a 8,3%. Quanto ao rótulo, apenas 5 amostras declararam a quantidade de EPA e DHA. Em alguns casos, a quantidade e qualidade estavam inadequadas para este tipo de produto, sendo uma amostra provavelmente adulterada com óleo de soja. Carvalho et al. (2000) analisaram 7 amostras de OPC e a variação de EPA + DHA em relação ao declarado no rótulo foi de 29 a 106 %.

Outro estudo realizado no Brasil por Hirashima et al. (2013) analisou 21 amostras de óleos. No entanto, nenhum era óleo de peixe, sendo de linhaça; prímula; cártamo, borage e groselhas negras. Foi encontrada adulteração em 9 amostras, e, de acordo com os autores, 5 provavelmente sofreram adição de óleo de soja, de acordo com os autores. Apenas cerca de 10% (n = 2) das amostras estavam de acordo com a composição declarada no rótulo.

No cenário internacional, encontram-se maior quantidade de estudos científicos sobre o tema, realizados em diversos países, como: Estados Unidos,

Reino Unido, Áustria, Austrália, Canadá e África do Sul. A maioria dos estudos analisou o perfil lipídico de OPC pelos métodos de cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC) ou cromatografia líquida (Tabela 2.1).

**Tabela 2.1** Estudos que avaliaram a adequação da composição de EPA e DHA em óleos de peixe em cápsulas.

<b>Estudo</b>	<b>Porcentagem de amostras adequadas (%)<sup>a</sup></b>	<b>Varição da porcentagem de adequação do conteúdo de EPA e/ou DHA em relação à quantidade declarada no rótulo (mín.% - máx.%)</b>
Ackman et al. (1989)	70 (EPA); 88 (DHA)	63-101 (EPA); 66-123 (DHA)
Chee et al. (1990)	62,5 (EPA); 75 (DHA)	75-94 (EPA); 57-115 (DHA)
Shim et al. (2003)	29 (EPA); 9% (DHA)	51-124 (EPA); 61-153 (DHA)
Tatarczyk et al. (2007)	80 (EPA + DHA)	100-144 (EPA + DHA)
Kolanowski (2010)	93 (EPA); 93 (DHA)	95-124 (EPA); 93-122 (DHA)
Hamilton et al. (2010)	83 (EPA); 67 (DHA)	97-155 (EPA); 72-119 (DHA)
Ritter et al. (2013)	69 (EPA); 62,5 (DHA)	27-132 (EPA); 64-495 (DHA)
Srigley et al. (2014)	83 (EPA); 80 (DHA)	48-300 (EPA); 65-?(DHA)
Kleiner et al. (2015)	83 (EPA); 74 (DHA)	66-184 (EPA); 62-184 (DHA)
Albert et al. (2015)	22 (EPA + DHA)	32-144 (EPA + DHA)

<sup>a</sup>80 A 120% de adequação em relação ao valor declarado no rótulo adaptada para fins de comparação.

Quanto à rotulagem, Tatarczyk et al. (2007) observaram que apenas uma das nove amostras estudadas apresentavam ausência de informação quanto ao conteúdo de EPA e DHA no rótulo. O estudo de Zargar & Ito (2011) concluiu que apenas 22% dos produtos estudados atingiam 3360mg de EPA + DHA com o consumo inferior a 8 porções (porção equivalente à dosagem recomendada pelo fabricante). De acordo com os autores, este parâmetro de 3360mg foi estabelecido por ser a dose recomendada pela FAO para o tratamento de trigliceridemia grave (ZARGAR; ITO, 2011).

Em quatro estudos, houve a análise da presença de compostos primários da oxidação: índice de peróxidos (IP) e dienos conjugados (DC). Quanto ao IP, 25 e 80% das amostras excederam o valor permitido de peróxidos, de acordo com os estudos de Ritter et al. (2013) e Opperman et al. (2013), respectivamente. Quanto aos DC, Opperman et al. (2013) observaram que 44% dos suplementos estavam em estágios iniciais de oxidação. Albert et al. (2015) e Jackowski et al. (2015) analisaram os níveis de IP, IA e TOTOX de OPC e detectaram que apenas 8 e 50 % dos produtos analisados atendiam todas essas recomendações internacionais, respectivamente (ALBERT et al., 2015; JACKOWSKI et al., 2015).

Foran et al. (2003) quantificaram mercúrio em 5 amostras de OPC adquiridas pela internet ou no comércio dos Estados Unidos, pelo método de espectroscopia de absorção atômica por vaporização à frio, com prévia digestão da amostra. Duas amostras apresentaram mercúrio acima do limite de detecção do equipamento, entre 10 e 12 ppb. Ainda pelo mesmo método, mas com limite de quantificação de 1,5 ppb declarado no estudo, Levine et al. (2005) dosaram mercúrio em diversos tipos de suplementos e, entre eles, 3 amostras de óleo de peixe/salmão. As concentrações de mercúrio detectadas nessas amostras variaram de 9,89 a 123 ppb, sendo a maior, em uma amostra de óleo de salmão (LEVINE et al., 2005).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a composição lipídica qualitativa e quantitativa de óleos de peixe em cápsulas comercializados em Brasília – DF.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Determinar a quantidade de EPA e DHA nas amostras;
- Analisar a conformidade das informações declaradas no rótulo quanto ao conteúdo de EPA e DHA em relação às quantidades analisadas laboratorialmente;
- Determinar o índice de peróxido (IP) nas amostras;
- Determinar o índice de anisidina (IA) nas amostras;
- Determinar o valor de oxidação total (TOTOX) nas amostras;
- Determinar a presença de mercúrio nas amostras;
- Avaliar a conformidade das informações presentes nos rótulos dos produtos de acordo com os requisitos exigidos na legislação brasileira;
- Avaliar o custo financeiro de se ingerir óleo de peixe em cápsulas em doses compatíveis com sua propriedade funcional;
- Avaliar o valor calórico associado à ingestão de óleo de peixe em cápsulas em doses compatíveis com sua propriedade funcional;
- Avaliar a carga de comprimidos atribuída à ingestão de óleo de peixe em cápsulas em doses compatíveis com sua propriedade funcional.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento do estudo**

Neste estudo foram analisados: a composição de ácidos graxos, o nível de oxidação (índice de peróxido e índice de anisidina), metais pesados, custo financeiro e rotulagem de amostras de OPC comercializadas em Brasília, DF. Os experimentos foram realizados nos seguintes laboratórios: Laboratório de Química Analítica e Ambiental do Instituto de Química a cuidado do Prof. Dr. Jurandir Rodrigues de Souza; Laboratório de Bioquímica da Nutrição do Departamento de Nutrição a cuidado da Prof<sup>a</sup>. Dra. Marina Kiyomi Ito; Laboratório de Fluidos Complexos do Instituto de Física a cuidado do Prof. Dr. Alex Fabiano Cortez Campos.

### **4.2 Aquisição e transporte das amostras**

Todos os produtos foram adquiridos no maior comércio local especializado em saúde de Brasília, que abrange 21 drogarias e farmácias. As amostras foram adquiridas de acordo com a disponibilidade do comércio no momento da coleta e foram abrangidas todas as marcas disponíveis. Como critério de inclusão, selecionou-se apenas os produtos que possuem registro na Anvisa e que estivessem dentro do prazo de validade. Adotou-se como critério de exclusão: ausência da informação de composição lipídica no rótulo ou presença de outros tipos de óleo, além do de peixe. Além disso, foram excluídas as marcas que já foram adquiridas em outros estabelecimentos previamente, para evitar duplicidade de dados.

A fim de manter sigilo dos dados, as marcas dos produtos analisados foram omitidas, sendo substituídas por números sequenciais por ordem de aquisição. Os produtos foram transportados para o local de análise à temperatura ambiente, em recipiente livre de calor, luz e umidade e armazenados a -18°C até o momento da análise em suas respectivas embalagens primárias e, quando havia, também em suas embalagens secundárias.

### 4.3 Pesagem e preparo da Amostra Composta

A quantidade de óleo em cada cápsula foi determinada pela diferença da massa entre a cápsula íntegra e a massa apenas do invólucro (envoltório de gelatina da cápsula), determinada em balança analítica. A massa estimada foi a média do valor encontrado em 10 cápsulas, de acordo com o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira, utilizando o hexano como solvente (BRASIL, 2010b):

“Pesar, exatamente e individualmente, 10 cápsulas, preservando a identidade de cada uma. Cortar as cápsulas com lâmina e retirar o conteúdo, lavando os invólucros com solvente adequado. Deixar os invólucros à temperatura ambiente, por 30 minutos, para completa evaporação do solvente, tomando precauções para evitar adição ou perda de umidade. Pesar as cápsulas vazias e calcular o peso do conteúdo de cada cápsula”.

Com o conteúdo das 10 cápsulas utilizadas para a determinação da massa média das cápsulas foi preparada a amostra composta de cada produto. Esta foi armazenada em frasco de vidro envolvido com papel alumínio, fechado em atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) e com batoque de borracha, tampa e *Parafilm*<sup>®</sup>. Realizou-se homogeneização da amostra por 5 minutos em agitador orbital Gehaka<sup>®</sup> a 200 rpm. Em seguida, esta foi mantida em congelamento a -18<sup>o</sup> C até o momento das análises laboratoriais. As análises seguintes foram realizadas retirando as alíquotas correspondentes da amostra composta, em triplicata, a fim de minimizar possíveis erros de análise.

### 4.4 Quantificação dos ácidos graxos EPA e DHA

Reagentes:

- Trifluoreto de boro (BF<sub>3</sub>) 14 % em metanol (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Isoctano PA (Vetec<sup>®</sup>);
- Hidróxido de potássio PA (KOH) (Vetec<sup>®</sup>);
- Metanol PA (Merck<sup>®</sup>);
- Cloreto de sódio (NaCl) (Cromoline<sup>®</sup> Química Fina);
- Hexano PA (Merck<sup>®</sup>).

Padrões:

- Padrão interno: tricosanoato de metila (C23:0) com pureza  $\geq 99,0\%$  (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Padrão externo: éster metílico de ácido eicosapentenoico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 10 mg/mL em heptano;
- Padrão externo: éster metílico de ácido docosaexenoico (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 10 mg/mL em heptano;
- Padrão Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) 10 mg/mL em cloreto de metileno.

#### Equipamento:

- Cromatógrafo a gás utilizado modelo GC 17A – Shimadzu, com detector de ionização de chama (CG-DIC).

#### Métodos:

O conteúdo de ácidos graxos de cada amostra foi analisado por CG-DIC, com prévia metilação básica com  $\text{BF}_3$ . As quantificações dos ácidos graxos EPA e DHA foram realizadas com adição de padrão interno (PI) às amostras de óleo de peixe e comparação com curvas de calibração construídas com padrões externos referentes aos ácidos graxos de interesse, com adição PI em cada ponto da curva. O PI foi adicionado à amostra e a cada um dos pontos das curvas de calibração a uma concentração definida de 1mg/ mL para compensação de possíveis perdas do analito durante o preparo e análise das amostras (SKOOG et al., 2006).

#### Metilação

Os ésteres metílicos de ácidos graxos (EMAG) foram obtidos a partir das amostras de óleo, por metilação básica, de acordo com os métodos descritos por Ichihara (2010) e ISO 5509 (2000) adaptados. Para cada amostra de óleo foram realizadas duas metilações.

A solução do PI foi preparada na concentração de 1,0 mg/ mL em isoctano. Adicionou-se no recipiente de esterificação 1 mL da solução de PI e evaporou-se o

solvente sob fluxo de N<sub>2</sub>, antes da pesagem do óleo. Adicionou-se uma massa conhecida de óleo de peixe, no mesmo recipiente, aproximadamente 20 mg, aferida em balança analítica.

Em seguida, adicionou-se 1,5 mL de solução de KOH 0,5 mol/ L em metanol, seguido de agitação em vórtex. Aqueceu-se o recipiente a 100 °C, por 5 minutos, com resfriamento em água corrente imediatamente. Adicionou-se 2 mL de BF<sub>3</sub>, seguido de agitação em vórtex. Novamente, aqueceu-se o recipiente a 100 °C, por 5 minutos, com resfriamento em água corrente imediatamente. Acrescentou-se 2 mL de solução saturada de NaCl 30 % em água destilada, seguido de agitação em vórtex.

A fase orgânica (ésteres metílicos de ácidos graxos – EMAG) foi extraída com adição de 0,5 mL de hexano, agitação em vórtex e centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. Solubilizou-se a fase orgânica em 1 mL de isooctano. Esta foi armazenada em *vial* envolvido em papel alumínio a -18°C até a análise no cromatógrafo.

#### Análise por CG-DIC e quantificação dos ácidos graxos EPA e DHA

Foi injetado 1 µL de MEAG no cromatógrafo a gás para análise. Foi utilizada uma coluna capilar de sílica (Supelco SP<sup>TM</sup> 2560, 100 m x 0,25 mm x 0,2 mm), para separação dos MEAG presentes na amostra, e, hidrogênio, como gás de arraste. Para melhor separação dos compostos, foi utilizada uma rampa de temperatura na coluna cromatográfica com a seguinte programação: a temperatura inicial de 125 °C foi mantida por 3 minutos, com incremento de 10 °C/ min. até 170 °C; manutenção de 170 °C por 5 minutos, seguido de aquecimento de 170 a 175 °C a 5 °C/ min.; manutenção de 175 °C por 1 minuto, com incremento de 2 °C/ min. até 185 °C, manutenção de 185 °C por 1 minuto, aquecimento de 1 °C/ min. até 195 °C, manutenção de 190 °C por 1 minuto, incremento de 5 °C/ min. até 240 °C, e, após estabilização em 240 °C, a temperatura foi mantida constante até o término da corrida (8 minutos), totalizando 48 minutos para cada amostra analisada. Os ácidos graxos de cada cromatograma foram identificados com base no tempo de retenção relativa dos padrões de EMAG do FAME mix.

Para a quantificação dos ácidos graxos de interesse (EPA e DHA), foi realizada uma curva de calibração com 5 concentrações conhecidas (0,625 – 10 mg/ mL) dos padrões externos de éster metílico de ácido eicosapentenoico e de

éster metílico de ácido docosaexenoico, respectivamente. Cada ponto das curvas de calibração apresentava quantidade de PI constante de 1mg/ mL. A quantidade de EMAG dos ácidos graxos de interesse quantificada foi convertida em quantidade de EPA e DHA das amostras, de acordo com as respectivas massas molares.

A massa de EPA e DHA de cada cápsula foi calculada de acordo com a equação:

$$\text{massa de AG} \left( \frac{g}{\text{cápsula}} \right) = \frac{\text{concentração de AG aferida}}{\text{massa de óleo da cápsula}(g)} \quad (4.1)$$

A quantidade de EPA e DHA aferida experimentalmente foi comparada à quantidade declarada no rótulo por porcentagem de adequação, de acordo com a equação:

$$\text{Porcentagem (\%)} \text{ de adequação} = \frac{\text{quantidade aferida (g)}}{\text{quantidade declarada (g)}} \times 100 \quad (4.2)$$

De acordo com a FDA, para o produto cumprir as exigências de quantidade do produto em relação ao declarado na rotulagem, este deve conter pelo menos 80% da quantidade declarada no rótulo (FDA, 2010). Foi adotado o critério estabelecido pela Anvisa, em que, além deste limite mínimo de 80% da quantidade declarada no rótulo, o produto deve conter, no máximo, 120% da quantidade declarada, ou seja, a variação permitida é de  $\pm 20\%$  em relação à quantidade declarada (BRASIL, 2003; ANVISA, 2013).

#### 4.5 Determinação do índice de peróxido

Reagentes:

- Ácido acético PA glacial (Vetec<sup>®</sup>);
- Clorofórmio PA (Merck<sup>®</sup>);
- Iodeto de potássio – KI (Sigma<sup>®</sup>);
- Carbonato de sódio (Vetec<sup>®</sup>);
- Tiosulfato de sódio PA –Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (Pro Analisi<sup>®</sup>);
- Iodato de potássio (Vetec<sup>®</sup>);

- Amido solúvel PA (Vetec<sup>®</sup>);
- Ácido sulfúrico PA (Vetec<sup>®</sup>).

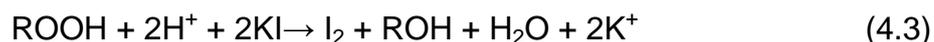
Equipamento:

- Bureta eletrônica Metrohm Dosimat 665.

Método:

O índice de peróxido (IP) foi determinado de acordo com o método AOCS Cd 8-53 adaptado por Crowie & White (2001), que reduz a 10 % a quantidade da alíquota de óleo de peixe e de todos os reagentes utilizados no experimento (AOCS, 1997). O método de determinação do IP consiste em uma titulação iodométrica com tiosulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) 0,001 mol/L<sup>1</sup>, padronizado com iodato de potássio pelo método AOAC #942.27 (AOAC, 1997).

O princípio do método IP baseia-se na reação de oxirredução entre hidroperóxidos - ROOH (compostos primários da oxidação) presentes no óleo de peixe e o excesso de KI em meio ácido, liberando iodo, que é titulado com solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , de acordo com as equações químicas a seguir (SAAD et al., 2006):



A uma alíquota de óleo de massa conhecida (aproximadamente 0,5 g), aferida em balança analítica, foram adicionados 1,8 mL de solução de ácido acético e 1,2 mL de solução de clorofórmio, com agitação magnética, sob aquecimento leve. Em seguida, foram adicionados 50 µL de solução saturada de iodeto de potássio a 60 %. Após 1 minuto, foram adicionados 3 mL de água destilada.

Procedeu-se a titulação do óleo com solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,001 mol/L, com agitação magnética, até o surgimento de coloração alaranjada. Foram acrescentados 150 µL de solução de amido a 1 %, resultando em coloração roxa. A titulação foi continuada até a solução ficar transparente. O mesmo procedimento foi realizado

---

<sup>1</sup> No método original a unidade de concentração da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  foi expressa em normal (N).

para o teste do branco. Os volumes de solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  gastos na titulação da amostra e do branco foram utilizados para o cálculo do IP, de acordo com a seguinte equação:

$$IP = \frac{(V_a - V_b) \cdot C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3} \cdot 1000 \cdot f}{m}, \quad (4.5)$$

em que:  $V_a$  = volume (mL) da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,001 mol/L gasto na titulação da amostra;  $V_b$  = volume (mL) de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,001 mol/L gasto na titulação do branco;  $C_{\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3}$  = concentração molar da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  igual a 0,001 mol/L;  $f$  = fator de correção da solução de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,001 mol/L;  $m$  = massa da amostra.

Para o presente estudo, foi utilizado como parâmetro o limite de peróxidos para óleos de peixe de 5 mEq/kg de óleo, estabelecido pelas diretrizes das organizações US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, GOED e HEALTH CANADA.

#### 4.6 Determinação do Índice de anisidina

Reagentes:

- Ácido acético PA glacial (Vetec<sup>®</sup>);
- P-anisidina  $\geq 99$  % (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>);
- Isoctano PA (Vetec<sup>®</sup>).

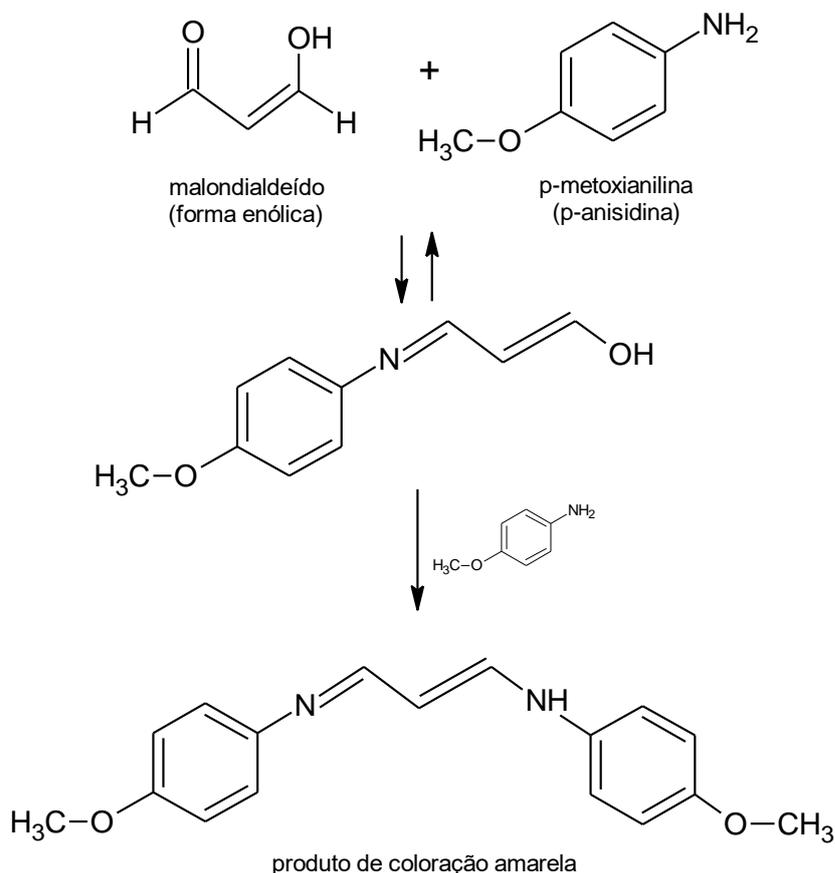
Equipamento:

- Espectrofotômetro UV-vis Biochrom Ltd<sup>®</sup>, Libra S60.

Métodos:

O índice de anisidina (IA) foi determinado de acordo com o método AOCS Cd 18-90 (AOCS, 1995). O IA é definido como 100 vezes a densidade óptica medida a 350 nm numa cubeta de 1 cm de uma solução contendo 1 g do óleo em 100 mL de

uma mistura de solvente e de reagente. O princípio do método baseia-se na reação de condensação de compostos aldeídicos (compostos secundários da oxidação de lipídios), como o malondialdeído, com a p-anisidina, em solução de ácido acético, formando produtos coloridos (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Reação de condensação entre a p-anisidina e o malondialdeído com formação de produto de coloração amarelada (adaptado de SHAHIDI; WANASUNDARA, 2002)

Os compostos aldeídicos possuem curta vida de prateleira e são responsáveis pelo sabor desagradável de óleos e gorduras oxidadas. A determinação do IA é útil para a verificação da qualidade de óleos oxidados, que possuem baixo IP (ROBARDS et al., 1988).

Para o preparo da solução teste, uma alíquota de óleo de cada amostra, de massa conhecida (aproximadamente 0,5 g), aferida em balança analítica, foi adicionada de 25 mL de isoctano.

A absorvância de 3 mL da solução teste foi medida a 350 nm em cubeta de quartzo, e a mesma quantidade de isoctano foi usada como branco. Em seguida, adicionou-se nas duas cubetas 0,6 mL de solução de p-anisidina 2,5 g/L em ácido

acético glacial. Após 10 minutos e livre de luz, com agitos constantes, as absorvâncias foram medidas novamente.

O cálculo do IA foi realizado a partir da seguinte formula:

$$IA = \frac{25 \times (1,2A_1 - A_2)}{m}, \quad (4.6)$$

em que  $A_1$  = absorvância da solução teste adicionada da solução de p-anisidina a 350 nm frente à solução de referência;  $A_2$  = absorvância da solução teste a 350 nm frente ao isoctano;  $m$  = massa do óleo examinada na solução teste em gramas.

Para o presente estudo, foi utilizado como parâmetro o limite de IA para óleos de peixe estabelecido pela GOED de 20<sup>2</sup>, estabelecido pelas diretrizes das organizações US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, GOED e HEALTH CANADA.

#### 4.7 Cálculo do TOTOX

O cálculo do valor de oxidação total (TOTOX) é importante para se obter uma real avaliação do nível de oxidação, a partir da realização de mais de um teste em uma mesma amostra, pois um alto IP nem sempre corresponde a um baixo IA (GUILLEN; CABO, 2002).

O TOTOX é calculado pela fórmula:

$$TOTOX = 2 \cdot IP + 1 IA \quad (4.7)$$

Utilizou-se como parâmetro o limite de 26<sup>3</sup>, estabelecido pelas diretrizes das organizações US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, GOED e HEALTH CANADA.

---

<sup>2</sup> Não há unidade de medida para esta variável.

<sup>3</sup> Não há unidade de medida para esta variável.

#### 4.8 Determinação de mercúrio

Reagentes:

- Ácido Nítrico (HNO<sub>3</sub>) Suprapuro 60 % (Merck®).

Padrões:

- Padrão de Mercúrio 1000µg/mL de Hg em NHO<sub>3</sub> 10% (Aldrich Chemical Company®)

Equipamento:

- Monitor de vapor de mercúrio portátil RA-915+ Zeeman (Lumex®) acoplado a PYRO-915.

Métodos:

O método de detecção direta de vapor de mercúrio se baseia na vaporização térmica da amostra por pirólise em dois estágios com aquecimento a 350 e 450 °C.

Uma alíquota de óleo de cada amostra, de massa conhecida (aproximadamente 0,01 g), foi aferida em balança analítica. Não houve pré-tratamento da amostra. A amostra foi inserida no equipamento, o vapor de mercúrio e a fumaça formados pela combustão da matriz orgânica foram transportados por uma célula analítica com comprimento óptico de 0,4 m. O ruído foi eliminado pelo sistema de correção Zeeman.

A quantificação de mercúrio foi feita por curva de calibração com 5 concentrações conhecidas (5 – 20 ppb) do padrão de mercúrio solubilizado em ácido nítrico. A quantidade de mercúrio em uma cápsula foi calculada a partir da massa de óleo determinada no preparo da amostra composta e a concentração de mercúrio.

Os limites de detecção (LD = 3 S/a) e de quantificação (LQ = 10 S/a) do aparelho foram calculados a partir de dados da curva de calibração, apresentada de forma geral, como  $y = ax + b$ , em que S é o desvio padrão da resposta y (área do pico) e a é a sensibilidade da calibração (coeficiente angular da reta). Foi utilizada

para cálculo dos LD e LQ, solução de mercúrio em ácido nítrico a 0,25 ppb (diluição de 20 vezes o menor ponto da curva).

O limite máximo de tolerância adotado como parâmetro foi inferior a 0,1 ppm, estabelecido pelas diretrizes das organizações US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, GOED e HEALTH CANADA.

#### **4.9 Adequação da Rotulagem**

O rótulo de cada produto foi analisado de acordo com quesitos especificados nos seguintes documentos, por meio de um *check-list* (APÊNDICE):

1 - Decreto-Lei nº 986/69: Institui normas básicas sobre alimentos (BRASIL, 1969);

2 - RDC nº19/1999: Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde em sua Rotulagem (BRASIL, 1999);

3 - RDC nº 259/ 2002: Aprova o Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados (BRASIL, 2002);

4 - RDC nº 360/ 2003: Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional (BRASIL, 2003);

5 - Site Anvisa: Alimentos. Assuntos de Interesse. Novos Alimentos e Novos Ingredientes. (ANVISA, 2005);

6 - Site Anvisa: Assuntos de Interesse. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde (ANVISA, 2016).

Em seguida, foi atribuída uma porcentagem de adequação para cada quesito supracitado, em relação a quantos rótulos estão de acordo com cada um desses. Consideraram-se conformes apenas os produtos que apresentarem 100% de percentual de adequação para os itens aplicáveis.

A adequação dos rótulos dos produtos em relação aos quesitos da legislação foi verificada de forma vertical e horizontal:

1 - Por rótulo de produto: número total de quesitos em conformidade, em cada rótulo. Foram considerados conformes apenas os rótulos de produtos que apresentaram 100% de adequação para os itens aplicáveis;

2 - Por quesito do *check-list* presente na legislação: quantos rótulos de produto estavam de acordo com cada um dos itens analisados.

Outra avaliação em relação à rotulagem de dos produtos é a adequação do conteúdo de EPA e DHA declarado no rótulo em relação às diretrizes nacionais e internacionais para o tratamento de doenças crônicas. Foi dado destaque à quantidade de EPA e DHA e a quantidade de cápsulas contidas em uma dose de ingestão, conforme indicação do fabricante.

O conteúdo de EPA e DHA (em miligramas) declarado no rótulo de cada produto foi utilizado para se calcular a quantidade de doses necessárias para se atingir as recomendações de EPA e DHA para prevenção e tratamento de doenças crônicas das diretrizes. Esta análise incluiu: a quantidade de cápsulas; de porções indicadas pelo fabricante; de calorias; e o custo mensal (considerando 30 dias) calculado em dólares americanos (US\$) para se atingir estas recomendações. Para análise do custo, foi utilizado o preço do produto determinado pela farmácia no dia da pesquisa de campo.

#### **4.10 Análises estatísticas**

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa R<sup>®</sup> (versão 3.3.0). As variáveis foram testadas quanto à sua normalidade para avaliação pelo teste de Shapiro-Wilk. Para análise em sub-grupos, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon Mann-Whitney. As análises de correlação foram realizadas utilizando o teste de correlação de Spearman. Adotaram-se valores significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão estão organizados no formato de artigos. Serão apresentados dois artigos como resultados da pesquisa.

O primeiro artigo apresenta os resultados relativos às análises laboratoriais de óleos de peixe em cápsulas disponíveis para venda no comércio de Brasília para avaliação do perfil de ácidos graxos, quantificação de EPA e DHA, determinação do nível de oxidação e da concentração de mercúrio.

O segundo artigo revisa as doses relativas à propriedade funcional do óleo de peixe para tratamento de doenças crônicas em diretrizes e consensos atuais. Ainda, analisa a carga de cápsulas, calorias e custo necessários para se atingir essas doses a partir do consumo de óleos de peixe em cápsulas disponíveis para venda no comércio de Brasília. São apresentados também os atuais documentos legais que regulam a rotulagem desses suplementos e a adequação dos produtos em relação a esses documentos.

Toda a referência bibliográfica foi listada em uma única lista ao final da dissertação.

## 6. ARTIGO 1- Aspectos quali e quantitativos de suplementos de óleo de peixe comercializados em Brasília, Brasil

### Resumo

**Introdução:** Suplementos de óleo de peixe são boas fontes dos ácidos graxos eicosapentenoico (EPA) e docosaexenoico (DHA), recomendados para prevenção e tratamento de hipertrigliceridemia. O objetivo do presente estudo foi avaliar o conteúdo de mercúrio, EPA e DHA e o nível de oxidação de suplementos de óleo de peixe comercializados em Brasília, Brasil. **Métodos:** Os suplementos de óleo de peixe foram adquiridos em drogarias de Brasília. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado por cromatografia gasosa (CG-DIC), utilizando padrões interno (C23:0) e externos de ésteres metílicos de EPA e DHA. Para esta análise, as amostras foram preparadas por metilação básica com trifluoreto de boro (14% em metanol). Foi aceita uma variação definida pela Anvisa de  $\pm 20\%$  de EPA e DHA, em relação ao declarado no rótulo. O mercúrio foi determinado por método de detecção direta de vapor, com monitor de vapor de mercúrio portátil RA-915+ Zeeman (Lumex®) acoplado a PYRO-915. O índice de peróxidos (IP) foi determinado de acordo com o método A.O.C.S Cd 8-53 adaptado por Crowe et al., (2001), e o índice de anisidina (IA), pelo método A.O.C.S Cd 18-90. O valor de oxidação total (TOTOX) foi calculado pela fórmula:  $2 \cdot IP + IA$ . Níveis de IP, IA e TOTOX aceitáveis por organizações internacionais reconhecidas são  $<5 \text{ mEq O}_2/\text{kg}$  de óleo,  $<20$  e  $<26$ , respectivamente. **Resultados:** A porcentagem de adequação de EPA e DHA estava dentro dos valores permitidos pela legislação em 88,8 % e 81,4 % dos produtos, respectivamente. As adequações variaram de 75,9 a 105,1% para EPA e de 88,9 a 137,4 para DHA. Concentrações de mercúrio acima do limite de quantificação do equipamento, entre 11 e 15 ppb, foram detectadas em 14,3% dos produtos. Vinte por cento dos produtos excederam os níveis de IP e Totox recomendados, com o produto mais oxidado atingindo 14,9 meq  $\text{O}_2/\text{kg}$  de óleo de IP e 44 de TOTOX. Nenhum dos produtos excedeu os níveis recomendados de IA. **Conclusão:** Apesar da alta porcentagem de adequação das variáveis analisadas, cerca de 2/3 dos produtos apresentaram alguma inadequação quanto à legislação. Esses fatores devem ser objeto de preocupação para que os potenciais efeitos colaterais não se sobreponham aos efeitos compatíveis com a propriedade funcional dos óleos de peixe.

## Qualitative and quantitative aspects of fish oil supplements marketed in Brasilia, Brazil

### Abstract

**Background:** Fish oil supplements are good sources of eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids. These fatty acids are important in the prevention and treatment of hypertriglyceridemia. The purpose of this study was to examine the content of EPA and DHA, total oxidation value (TOTOX), peroxide value (PV) and anisidine value (AV) of fish oil supplements marketed in Brazil. **Methods:** The fish oil supplements were obtained from local drugstores in the city of Brasilia. Fatty acid contents were determined by gas chromatography (GC-FID) using internal (C23:0) and external (EPA and DHA) methyl ester standards. For GC-FID analysis, samples were prepared by alkali-catalyzed methylation with boron trifluoride (14% in methanol). It was accepted of  $\pm 20\%$  of EPA and DHA, on the stated label. Mercury was determined by direct vapor detection method, with mercury vapor monitor portable RA- 915 + Zeeman (Lumex®) coupled to PYRO -915. PV was determined according to A.O.C.S Cd 8-53 method adapted by Crowe et al. (2001) and AV, according to A.O.C.S Cd 18-90 method. Total oxidation value (TOTOX) was calculated by the formula:  $2PV + 1AV$ . Recommended levels for PV, AV and TOTOX of  $< 5 \text{ mEq O}_2/\text{ kg oil}$ ,  $< 20$  and  $< 26$ , respectively, were used as oxidation parameters of the products. **Results:** EPA and DHA adequacy percentage were in the range of 20 % variation from the stated content of EPA and DHA in 88.8 % and 81.4 % of the products, respectively. The adequacy of EPA and DHA ranged from 75.9 to 105.1% and from 88.9 to 137.4 %, respectively, compared to the information in the label. Mercury concentration was above limit of quantification levels, between 11 and 15 ppb in 14.4 % of the products. Twenty percent of the products exceeded recommended levels of PV and TOTOX, with the most oxidized product reaching 14.9 mEq O<sub>2</sub>/ kg oil of PV and 44 of TOTOX. None of the products exceeded the recommended levels of AV. **Conclusion:** Despite the high percentage of adequacy of the parameters analyzed, about 2/3 of the products showed some inadequacies according to the law. These data deserves concern due to their potential side effects to the proclaimed health benefits of fish oils.

## 6.1 Introdução

As principais fontes alimentares de ácidos graxos (AG) ômega-3 ( $\omega$ -3) os peixes de águas frias, que não são consumidos rotineiramente pela população brasileira (IBGE, 2011; SARTORI, 2012) e ocidental, em geral (USDA, 2010; ALBERT; METIAN, 2013). Os suplementos de óleo de peixe em cápsulas (OPC) são uma alternativa eficiente para consumo dos AG  $\omega$ -3 eicosapentenoico (EPA) e docosaexenoico (DHA), importantes para a prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e hipertrigliceridemia (ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON, 2002; SANTOS et al., 2013; WANG, 2006). Estes são classificados como suplementos alimentares que podem ser vendidos sem prescrição médica (BRASIL, 2009).

Os OPC devem apresentar registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por serem classificados como novos alimentos (óleo de peixe com apresentação em cápsulas) e podem apresentar alegação de propriedade funcional, por potencialmente reduzirem os triglicerídeos séricos, se ingeridos em doses adequadas (ANVISA, 2005; ANVISA, 2016). A Anvisa determina que os fabricantes sigam as diretrizes estabelecidas pelas principais referências oficiais reconhecidas como parâmetro para avaliar a qualidade do OPC (ANVISA, 2016). Diretrizes internacionais que tratam sobre o assunto incluem: *US Council For Responsible Nutrition* (US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, 2006), *Global Organization for EPA and DHA - GOED* (GOED, 2012) e *Health Canada* (HEALTH CANADA, 2013). Ainda, a Anvisa determina que a quantidade dos ingredientes varie, no máximo,  $\pm 20\%$  em relação à quantidade declarada no rótulo (ANVISA, 2013). Porém, não há uma definição sobre as quantidades mínimas necessárias dos componentes principais e dosagem de consumo sugeridas no rótulo (ANVISA, 2016).

Os principais fornecedores mundiais de óleo de peixe são: Peru, Japão, Chile, EUA e Escandinávia (PIKE; JACKSON, 2010). No mercado brasileiro, tem-se produtos importados como produto final e produtos fabricados no Brasil, mas com matéria-prima importada. Se armazenados e transportados em condições adversas, como calor, luz e radiação, os AG presentes no óleo de peixe podem ser oxidados, com conseqüente produção de compostos prejudiciais à saúde, redução da quantidade de  $\omega$ -3 e do efeito benéfico à saúde do produto (KOLANOWSKI, 2010).

Além desse aspecto, deve ser considerada a segurança do consumidor quanto à toxicidade por contaminantes inorgânicos e metais pesados, como o mercúrio. O metil-mercúrio é uma neurotoxina capaz de causar efeitos deletérios graves sobre os sistemas nervoso em desenvolvimento, rins e fígado pelo aumento da produção de radicais livres e inativação de mecanismos antioxidantes (FAO, 2003; SHEEHAN, 2014), à sua associação com doenças cardiovasculares, como o aumento do risco de infarto agudo do miocárdio (MERGLER et al., 2007).

Os AG EPA e do DHA, são susceptíveis à deterioração oxidativa devido à grande quantidade de insaturações (KOLANOWSKI, 2010). Os AG oxidados podem causar diversos efeitos deletérios ao organismo, como: estresse oxidativo, inflamação, função vascular, aumento da colesterolemia e aterosclerose (TURNER et al., 2006; GARCÍA-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Foram encontrados poucos estudos realizados no Brasil que analisaram a composição de OPC adquiridos no comércio. Estes estudos foram realizados há mais de 15 anos, e detectaram algumas amostras com valores de índice de peróxido e adequação de AG fora dos valores atuais permitidos pela legislação (FANTONI et al., 1996; CARVALHO et al., 2000). Fantoni et al. (1996) detectaram índice de peróxidos (IP) variável de 2,1 a 20,3 mEq de O<sub>2</sub>/ kg de óleo em 16 amostras de óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau. Quanto ao rótulo, apenas 5 amostras declararam a quantidade de EPA e DHA. Carvalho et al. (2000) analisaram 7 amostras de OPC e a variação de EPA + DHA em relação ao declarado no rótulo foi de 29 a 106 %.

Deste modo, o objetivo do presente estudo foi avaliar aspectos qualitativos e quantitativos de OPC comercializados em Brasília, DF, como: conteúdo dos AG EPA e DHA, nível de oxidação e quantidade de mercúrio em relação às exigências da legislação brasileira e recomendações de organizações internacionais tais como a US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, GOED e HEALTH CANADA.

## **6.2 Materiais e Métodos**

6.2.1 Aquisição e transporte. Todas as amostras de óleo de peixe foram adquiridas em farmácias convencionais em um dos principais comércios locais, abrangendo 21 farmácias e drogarias de Brasília. Foram adquiridas todas as marcas disponíveis nos dois dias da coleta. Como critério de inclusão, selecionaram-se

apenas os produtos registrados na Anvisa e que estivessem dentro do prazo de validade. Adotou-se como critério de exclusão: ausência da informação de composição lipídica no rótulo ou presença de outros tipos de óleo, além do de peixe. Os produtos foram transportados para o Laboratório de Bioquímica da Nutrição da Universidade de Brasília à temperatura ambiente, em recipiente livre de calor, luz e umidade e armazenados a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  em suas respectivas embalagens primárias e, quando havia, também em suas embalagens secundárias. Os produtos foram identificados com omissão das marcas sendo, com números sequenciais por ordem de aquisição.

6.2.2 Preparo da amostra composta. A quantidade de óleo em cada cápsula foi determinada pela diferença da massa entre a cápsula íntegra e a massa do invólucro (envoltório de gelatina da cápsula), determinada em balança analítica. A massa estimada foi a média do valor encontrado em 10 cápsulas, de acordo com o método recomendado pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010b). Com o conteúdo dessas cápsulas, foi preparada amostra composta, que foi armazenada em frasco de vidro envolvido com papel alumínio para proteção contra luz, fechado em atmosfera inerte ( $\text{N}_2$ ) com batoque de borracha, tampa e *Parafilm*®. Realizou-se homogeneização da amostra por 5 minutos em agitador orbital Gehaka® a 200 rpm. Em seguida, esta foi mantida em congelamento a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento das análises químicas.

6.2.3 Derivatização dos AG e análise. Primeiramente foi adicionado 1 mL de padrão interno (PI) - tricosanoato de metila (C23:0) a 1 mg/ mL a uma alíquota de valor conhecido de óleo de peixe de aproximadamente 20 mg. O conteúdo de AG de cada amostra foi metilado com  $\text{BF}_3$  (14% em metanol), de acordo com o método descrito por Ichihara (2010) e ISO 5509 (2000) adaptado. A amostra adicionada de PI foi hidrolizada com 1,5 mL de solução de KOH 0,5 mol/ L em metanol e aquecida a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 5 minutos. Adicionou-se 2 mL de solução de  $\text{BF}_3$ , seguido de agitação e aquecimento a  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , por 5 minutos. Após resfriamento, acrescentou-se 2 mL de solução saturada de NaCl 30 % em água destilada, seguido de agitação. A fase superior apolar (ésteres metílicos de ácidos graxos – EMAG) foi extraída com adição de 0,5 mL de hexano, agitação e centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos. O solvente foi evaporado com jato de nitrogênio e a amostra ressuspensa em 1 mL de isooctano.

A análise de AG foi realizada em duplicata e as injeções em triplicata, totalizando seis injeções no cromatógrafo à gás (CG) por amostra. O CG utilizado foi do modelo GC 17A – Shimadzu, com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar de sílica (Supelco SP<sup>TM</sup>2560, 100 m x 0,25 mm x 0,2 mm) e, hidrogênio, como gás de arraste. O detector e o injetor (modo *split* com razão de 1:50) foram mantidos a 250 °C. Para melhor separação dos compostos, foi utilizada uma rampa de temperatura na coluna cromatográfica com a seguinte programação: a temperatura inicial de 125 °C foi mantida por 3 minutos, com incremento de 10 °C/min até 170 °C; manutenção de 170 °C por 5 minutos, seguido de aquecimento de 170 a 175 °C a 5 °C/minuto; manutenção de 175 °C por 1 minuto, com incremento de 2 °C/min até 185 °C, manutenção de 185 °C por 1 minuto, aquecimento de 1 °C/min até 195 °C, manutenção de 190 °C por 1 minuto, incremento de 5 °C/minuto até 240 °C, e, após estabilização em 240 °C, a temperatura foi mantida constante por mais 8 minutos, totalizando 48 minutos para cada amostra analisada.

6.2.4 Análise do Perfil de AG e Quantificação de EPA e DHA. O perfil de AG de cada cromatograma foi identificado com base nos tempos de retenção de padrões de MEAG (Padrão Supelco 37 Component FAME Mix (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), utilizando como referência para o tempo de retenção relativo o tempo de retenção do AG 20:5ω3. Os resultados foram expressos em porcentagem de área de detecção de cada AG em relação à área total dos ácidos graxos identificados nos cromatogramas.

A quantificação dos AG EPA e DHA foi realizada por curvas de calibração feitas com padrões externos (PE) de ésteres metílicos dos ácidos graxos EPA (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) e DHA (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>), ambos a 10 mg/mL em heptano, com adição do PI na mesma concentração que na amostra em cada ponto da curva. O PI foi utilizado para compensação de possíveis perdas do analito durante o preparo das amostras (SKOOG et al., 2006). A adequação do conteúdo de EPA e DHA nos produtos foi avaliada de acordo com definição da Anvisa, com variação permitida de ± 20% em relação à quantidade declarada no rótulo (ANVISA, 2013).

6.2.5 Determinação do conteúdo de mercúrio. A quantificação de mercúrio nas amostras foi realizada com um monitor de vapor de mercúrio portátil RA-915+ Zeeman (Lumex<sup>®</sup>) acoplado a PYRO-915. O método de detecção direta de vapor de mercúrio se baseia na vaporização térmica da amostra por pirólise em dois estágios, com aquecimento a 350 e 450 °C. Uma alíquota de óleo de cada amostra, de massa

conhecida (aproximadamente 0,01 g), foi aferida em balança analítica. Não houve pré-tratamento da amostra. A quantificação de mercúrio foi feita por curva de calibração com 5 concentrações conhecidas (5 – 20 ppm) do padrão de mercúrio solubilizado em ácido nítrico. Os limites de detecção ( $LD = 3 S/a$ ) e de quantificação ( $LQ = 10 S/a$ ) do aparelho foram calculados a partir de dados da curva de calibração, apresentada de forma geral, como  $y = ax + b$ , em que  $S$  é o desvio padrão da resposta  $y$  (área do pico) e  $a$  é a sensibilidade da calibração (coeficiente angular da reta). Para o cálculo de LD e LQ, foi utilizada solução de mercúrio a 0,25 ppb em ácido nítrico (diluição de 20 vezes o menor ponto da curva). Utilizou-se como referência de adequação as diretrizes das organizações US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, GOED e HEALTH CANADA, que definem a concentração máxima de tolerância como  $<0,1$  ppm para os óleos de peixe.

6.2.6 Análise do nível de oxidação. Em uma subamostra de 10 produtos selecionada aleatoriamente por programa *Random Number Generator*<sup>®</sup>, versão 2.1.4, foi analisado o nível de oxidação pela determinação do índice de peróxido (IP), índice de anisidina (IA) e pelo cálculo do valor total de oxidação (TOTOX). Para essas análises, utilizou-se como referência de adequação as diretrizes das organizações US COUNCIL FOR RESPONSIBLE NUTRITION, GOED e HEALTH CANADA.

O TOTOX corresponde ao nível geral de oxidação de um óleo, deve estar abaixo de 26 em óleos de peixe e é calculado pela fórmula:

$$TOTOX = 2 \cdot IP + IA \quad (1)$$

, onde: IP = índice de peróxido e IA = índice de anisidina

Para análise dos compostos primários da oxidação, foi determinado o índice de peróxido (IP), de acordo com o método AOCS Cd 8-53 adaptado por Crowie & White (2001) (AOCS, 1997). O método de determinação do IP consiste em uma titulação iodométrica com tiosulfato de sódio ( $NaS_2O_3$ ) 0,001 mol/L. O  $NaS_2O_3$  foi padronizado com iodato de potássio pelo método AOAC #942.27 (AOAC, 1997). Foi utilizado como parâmetro o limite de peróxidos para óleos de peixe 5 mEq/kg de óleo.

O índice de ansidina (IA) foi determinado de acordo com o método AOCS Cd 18-90 (AOCS, 1995). Utilizou-se como parâmetro o limite de IA para óleos de peixe de 20.

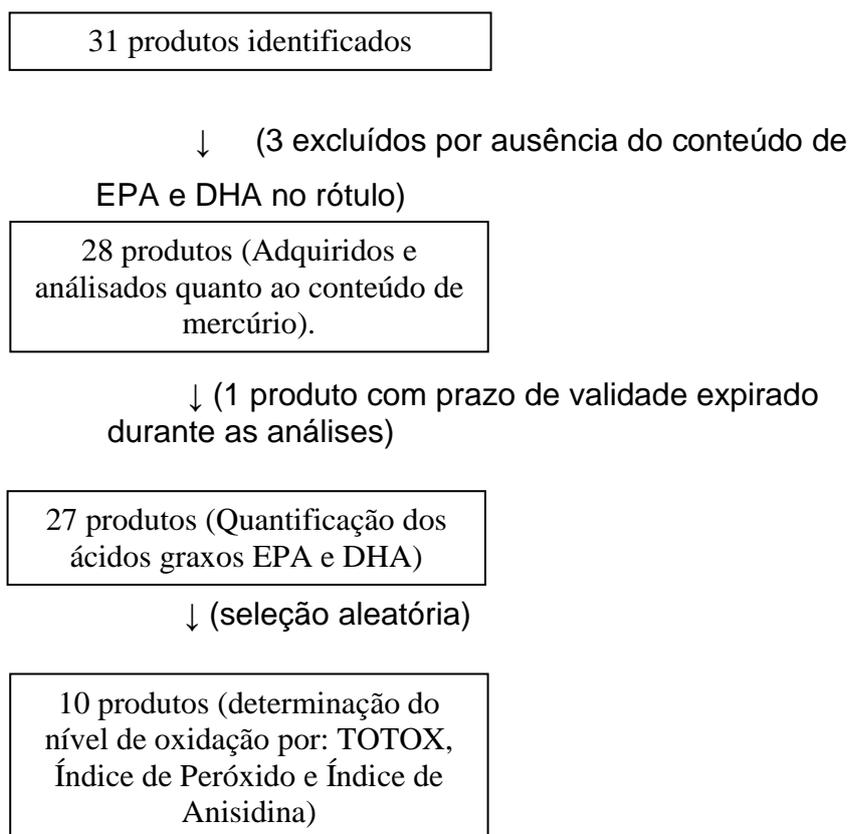
6.2.7 Análises estatísticas. Para as análises estatísticas foi utilizado o programa R<sup>®</sup> (versão 3.3.0). As variáveis foram testadas quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. Para análise em sub-grupos, foi utilizado o teste estatístico não paramétrico Wilcoxon Mann-Whitney. As análises de correlação foram realizadas utilizando o teste de Spearman. Adotaram-se valores significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

### 6.3 Resultados

Foram identificados 28 produtos que atendiam os critérios de seleção para o estudo, sendo 78,6 % ( $n = 22$ ) fabricados no Brasil a partir do óleo bruto importado, e os outros 6 produtos importados como produto final pronto para dispensação. Uma amostra foi excluída da análise de AG por ter atingido o prazo de validade durante os experimentos (Figura 6.1).

Os óleos de peixe apresentavam-se em cápsulas de diferentes tamanhos, cujas massas de óleo variou de 0,5 a 1,4 g por cápsula, sendo o valor mais prevalente, de 1,0 g em 64,3 % ( $n = 18$ ) das amostras.

A soma de EPA + DHA nos produtos variou de 26 a 78%. A partir da análise do perfil de AG dos suplementos, esses foram subdivididos em 4 grupos, de acordo com o teor de EPA e DHA: um grupo com concentração padrão de EPA e DHA (G1); um com alto teor de EPA (G2); um com alto teor de DHA (G3); e um com alto teor de EPA e DHA (G4). O percentual mediano de EPA e DHA no G1 (44,70 %) em relação aos grupos G2 (86,10), G3 (86,81) e G4 (74,69) foi estatisticamente diferente (Tabela 6.1). Ainda, o G1 apresentou maior porcentagem mediana de AG saturados, se comparado aos outros grupos (Tabela 6.1).



**Figura 6.1** Fluxograma da aquisição e análises das amostras de óleo de peixe em cápsulas.

Quanto às análises quantitativas de AG, o coeficiente de variação entre as 6 injeções foi < 10 %, e as curvas de calibração com padrões externos de ésteres metílicos de EPA ( $r^2 = 0,9922$ ) e DHA ( $r^2 = 0,9995$ ) consideradas satisfatórias. A quantidade de EPA e DHA por cápsula variou de 83 a 578 mg e 60 a 340 mg, respectivamente. Os conteúdos de EPA e DHA estavam dentro dos valores permitidos pela legislação em 88,8 % e 81,4 % dos produtos, respectivamente. As porcentagens de adequação das quantidades de AG aferidas em relação ao valor declarado no rótulo variaram de 75,9 a 105,1 % para EPA e de 88,9 a 137,4 para DHA (Figura 6.2).

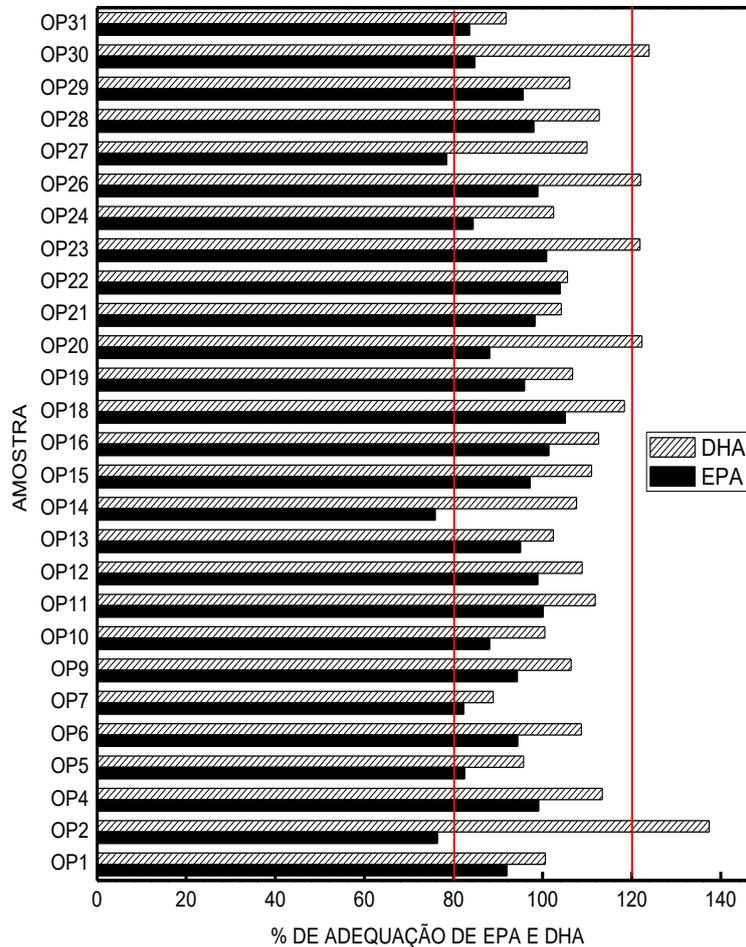
**Tabela 6.1** Perfil de ácidos graxos dos suplementos de óleo de peixe.

Ácido graxo (%)*	G1 – Óleo de peixe (n = 18)	G2 - Alto teor de DHA (n = 2)	G3 - Alto teor de EPA (n = 2)	G4 - Alto teor de EPA DHA (n = 5)
4:0	0,00 (0,00 - 1,16)	0,00	0,92	0,00 (0,00 - 0,46)
14:0	5,87 (4,92 - 7,12) <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,03 <sup>b</sup>	0,08 (0,00 - 0,25) <sup>b</sup>
15:0	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
16:0	14,79 (13,62 - 16,83) <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,18 <sup>b</sup>	1,89 (0,96 - 2,25) <sup>b</sup>
16:1 T	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
16:1 C	7,23 (6,44 - 8,19) <sup>a</sup>	0,00 <sup>b</sup>	0,05 <sup>b</sup>	0,46 (0,00 - 0,82) <sup>b</sup>
17:0	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
17:1	0,97 (0,81 ± 1,13)	0,00	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
18:0	3,41 (3,21 - 3,60) <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	1,17 <sup>b</sup>	2,93 (2,58 - 4,10) <sup>a</sup>
18:1 9C	8,60 (8,02 - 9,49) <sup>a</sup>	0,29 <sup>b</sup>	1,27 <sup>b</sup>	6,17 (4,37 - 6,67) <sup>b</sup>
18:1 9T	1,12 (0,00 - 1,36)	0,00	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
18:1 11T	2,93 (2,71 - 3,16)	0,00	0,38	2,14 (1,57 - 2,26)
18:2 T	0,00 (0,00 - 0,00)	0,00	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
18:2 C	1,17 (0,00 - 1,39)	0,00	0,25	0,89 (0,70 - 1,06)
18:3 n6	0,00 (0,00 - 0,47)	0,00	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
20:0	0,00 (0,00 - 0,00)	0,13	0,00	0,40 (0,00 - 0,75)
20:1 + 18:3 n3	1,72 (1,57 - 1,89) <sup>a</sup>	0,57 <sup>b</sup>	1,61 <sup>a</sup>	2,05 (1,01 - 3,43) <sup>a</sup>
21:0	0,00 (0,00 - 0,00)	0,15	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
20:2	2,90 (2,47 - 3,11) <sup>a</sup>	0,13 <sup>b</sup>	3,09 <sup>a</sup>	1,66 (0,37 - 2,74) <sup>b</sup>
22:0	0,00 (0,00 - 0,00)	1,20	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
20:3 n6	0,73 (0,00 - 1,28)	7,14	0,33	1,25 (0,37 - 1,79)
22:1	0,00 (0,00 - 0,00) <sup>a</sup>	1,14 <sup>a</sup>	1,96 <sup>b</sup>	0,00 (0,00 - 1,24) <sup>a</sup>
20:4 n6	1,17 (1,08 - 1,37) <sup>a</sup>	1,30 <sup>a</sup>	0,94 <sup>a</sup>	2,11 (1,92 - 2,30) <sup>b</sup>
22:2 n6	0,46 (0,00 - 1,96) <sup>a</sup>	0,61 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>	1,57 (0,74 - 1,90) <sup>b</sup>
20:5 n3 (EPA)	23,95 (22,40 - 24,91) <sup>a</sup>	14,89 <sup>a</sup>	53,66 <sup>b</sup>	38,93 (35,72 - 39,38) <sup>b</sup>
24:0	0,00 (0,00 - 0,00)	0,79	0,00	0,00 (0,00 - 0,00)
24:1	0,00 (0,00 - 0,00)	0,25	0,00	0,00 (0,00 - 0,45)
22:6 (DHA)	20,91 (19,49 - 21,92) <sup>a</sup>	71,21 <sup>b</sup>	33,15 <sup>b</sup>	34,93 (30,41 - 35,89) <sup>b</sup>
% EPA + DHA	44,70 (42,78 - 46,53) <sup>a</sup>	86,1 <sup>b</sup>	86,81 <sup>b</sup>	74,69 (66,88 - 76,27) <sup>b</sup>
%AG saturados	24,79 (22,77 - 28,70) <sup>a</sup>	2,46 <sup>b</sup>	2,3 <sup>b</sup>	5,55 (5,22 - 5,87) <sup>b</sup>

\*Valores expressos em Mediana (Percentil 25 - 75%) quando n > 2 e Mediana quando n = 2.

<sup>a, b</sup> indicam diferença significativa entre os grupos (p < 0,05).

Quanto ao conteúdo de mercúrio quantificado por curva de calibração ( $r^2 = 0,9948$ ), os LD e LQ determinados foram de 3,46 e 11,54 ppb, respectivamente. Em 60,7 % (17/ 28) das amostras não foi detectada presença de mercúrio em um quarto (7/ 28) das amostras, a quantidade de mercúrio estava abaixo do LQ. As outras 4 amostras apresentaram quantidades de mercúrio acima do LQ, porém abaixo do máximo permitido pelas diretrizes internacionais, e variaram entre 11,62 e 14,48 ppb nas amostras OP23, OP15, OP4 e OP9, em ordem crescente. Destas 4 amostras, 3 apresentavam alto teor de EPA e/ ou DHA.

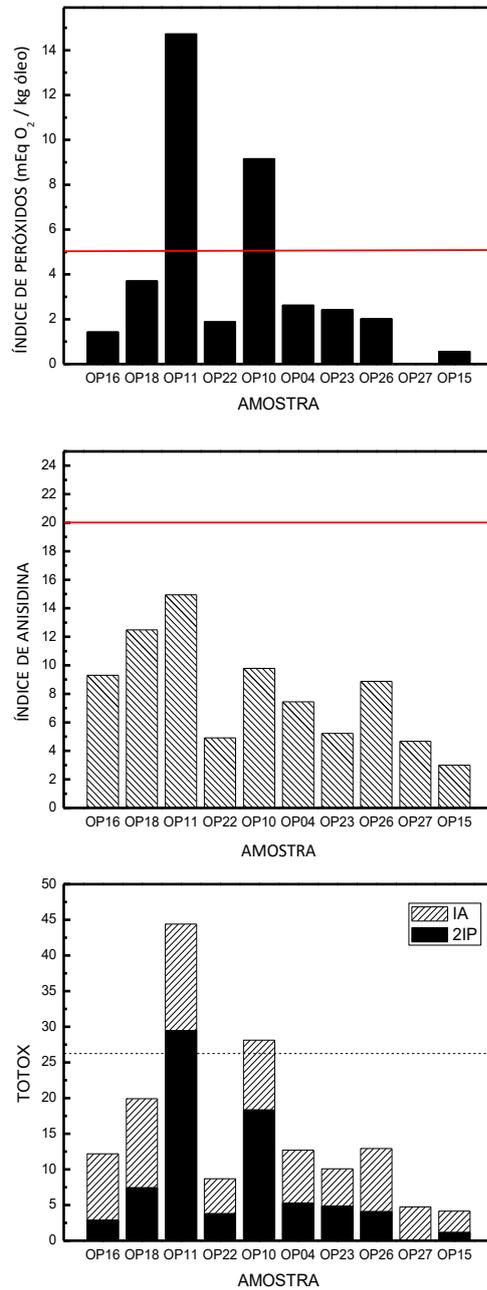


**Figura 6.2** Adequação de EPA e DHA dos suplementos de óleo de peixe em relação à quantidade declarada no rótulo.

O nível de oxidação estava acima do recomendado em 20% ( $n = 2/10$ ) das amostras analisadas, quanto ao IP e ao TOTOX. O IA esteve adequado em 100% ( $n = 10$ ) das amostras analisadas (Figura 6.3).

Quanto à origem dos produtos, os importados apresentaram maior IP e TOTOX, quando comparados aos nacionais ( $p = 0,044$ ). Análises de correlação mostraram que os valores de TOTOX estavam positivamente associados ao IP ( $\rho = 0,903$ ;  $p < 0,000$ ) e ao IA ( $\rho = 0,952$ ;  $p < 0,000$ ). Ainda, o IP e o IA apresentaram correlação positiva ( $\rho = 0,818$ ;  $p = 0,004$ ). No entanto, as porcentagens de adequação de EPA e DHA não se correlacionaram com nenhum dado de nível de oxidação. A presença de vitamina E na fórmula, possivelmente utilizada como

antioxidante, foi mencionada no rótulo de 32,3 % (10/ 31) produtos e não foi associada a nenhuma variável avaliada quanto ao nível de oxidação (Tabela 6.2).



**Figura 6.3** Nível de oxidação determinado nos suplementos de óleo de peixe: Índice de peróxido, Índice de anisidina e TOTOX.

**Tabela 6.2** Nível de oxidação das amostras com e sem vitamina E declaradas no rótulo.

	<b>Amostras com vitamina E (n = 5)</b>	<b>Amostras sem vitamina E (n = 5)</b>	<b>P<sup>b</sup></b>
Índice de Peróxido <sup>a</sup>	1,89 (0,74 – 5,60)	2,63 (1,50 – 9,22)	0,310
Índice de Anisidina	8,87 (4,79 – 9,54)	7,45 (4,12 – 13,72)	0,841
TOTOX	12,18 (6,71 – 20,52)	12,71 (7,12 – 32,16)	0,841

<sup>a</sup>Valores expressos em Mediana (Percentil 25 - 75%)

<sup>b</sup>Valores significativos se  $p < 0,05$

## 6.4 Discussão

A análise do perfil de AG em OPC é um desafio devido à sua complexa composição de ácidos graxos, à sua susceptibilidade a oxidação e isomerização durante seu processamento. O perfil das amostras analisadas neste estudo sugere que cápsulas com alto teor de EPA e/ou DHA tinham também a vantagem de possuírem menor teor de AG saturados, que pode chegar até ser 10 vezes menor do que em OPC na formulação de triacilglicerol (TAG), com concentração padrão de EPA e DHA. É relevante ressaltar que, caso o consumidor opte pelo OPC na forma de TAG, doses compatíveis com sua propriedade funcional de EPA e DHA podem vir acompanhadas da ingestão de quantidades de AG saturados semelhantes às dos AG de interesse.

A avaliação da qualidade de OPC é importante, pois a presença de contaminantes inorgânicos e altos níveis de oxidação podem trazer efeitos adversos à saúde e reduzir o efeito desejado (KOLANOWSKI, 2010). Foram encontrados dois estudos anteriores que avaliaram a qualidade de OPC comercializados no Brasil (FANTONI et al., 1996; CARVALHO et al., 2000). O presente estudo indicou que 32,1 % das amostras apresentavam alguma das variáveis analisadas fora dos valores de referência para adequação de AG e/ou nível de oxidação. Fantoni et al. (1996) observou que 43,8 % (7/ 16) das amostras apresentavam baixa adequação de EPA + DHA e/ou IP. Carvalho et al. (2000) avaliaram o conteúdo de EPA e DHA dos óleos de peixe e detectaram 85,7 % (6/ 7) das amostras com adequação abaixo de 80 % ou acima de 120 %.

A partir do óleo de peixe na forma de TAG, podem ser realizadas transformações laboratoriais, conhecidas como interesterificação, para se atingir uma versão mais concentrada nos AG de interesse (DYERBERG et al., 2010). Formulações concentradas incluem o etil éster (EE) e o triacilglicerol reesterificado (rTAG), que possuem biodisponibilidade menor e maior que o óleo de peixe padrão,

respectivamente (SCHUCHARDT; HAHN, 2013). O rTAG possui a vantagem de ser o mais concentrado em EPA e DHA e o mais biodisponível. O ácido graxo livre possui maior biodisponibilidade do que todas as formulações EE, rTAG e TAG, mas é bastante suscetível à oxidação e é o maior responsável pelos sintomas gastrointestinais decorrentes da ingestão de OPC. Por esses motivos, são retirados da composição do OPC durante o processo de desacidificação industrial (SCHUCHARDT; HAHN, 2013). De uma forma geral, os produtos analisados neste estudo são majoritariamente TAG. Dos suplementos com alto teor de EPA e/ ou DHA (n = 9) analisados neste estudo, apenas 2 mencionaram na lista de ingredientes formulação diferente de óleo de peixe, mas “extrato de ácidos graxos poli-insaturados marinhos  $\omega$ -3” ou “ácidos graxos  $\omega$ -3”. Como 77,8 % (7/ 9) destes produtos eram vendidos como “óleo de peixe”, não foi possível uma análise mais exata do produto.

O teor de EPA e DHA dos suplementos analisados no presente estudo por curvas de calibração mostrou que há grande variação de adequação de EPA e DHA entre as amostras analisadas, o que está condizente com resultados de estudos realizados por Tatarckzyk et al. (2007) na Áustria; Ritter et al. (2013) nos EUA; e Albert et al. (2015) na Nova Zelândia. Tatarckzyk et al. (2007) encontraram uma variação de adequação de 100 a 144 % (EPA + DHA); Ritter et al. (2013), de 27 a 132 (EPA) e 64 a 495 (DHA); e Albert et al. (2015), de 32 a 144% (EPA + DHA). Nenhum desses estudos estabeleceu como parâmetro uma porcentagem de adequação de EPA e DHA específica, o que pode ser visto apenas no estudo realizado recentemente, de Kleiner et al. (2015), que quantificou EPA e DHA em óleo de peixe por metodologia distinta à utilizada no presente estudo.

O parâmetro de adequação de nutrientes atual regulamentado no Brasil de  $\pm$  20 % do valor declarado no rótulo foi estabelecido pela Anvisa em 2013 (ANVISA, 2013). O parâmetro adotado por Kleiner et al. (2015) foi estabelecido pela *Food and Drug Administration* (FDA) em 2010, e determina que o produto deve conter pelo menos 80 % dos valores de nutrientes declarados no rótulo (FDA, 2010). Deste modo, estudos anteriores a 2010, como o de Tatarckzyk et al. (2007) não compararam seus resultados a valores de referência, possivelmente, pela falta de legislação sobre o tema na época em que o estudo foi realizado.

Apesar da alta porcentagem de produtos conformes, a variação permitida de 20 % a menos de EPA e DHA significaria 200 mg a menos de EPA + DHA por

cápsula, se considerarmos o produto mais concentrado analisado neste estudo, o qual declara no rótulo conter 1 g de EPA + DHA por cápsula. Essa menor quantidade pode prejudicar a ingestão de doses específicas para atingir o efeito benéfico à saúde desejado. Porém, valores mais rígidos de adequação ainda não foram estabelecidos pelas agências reguladoras FDA e Anvisa.

A variação de adequação de EPA e DHA entre os produtos pode ser explicada, pois diferenças geográficas, a sazonalidade e diferentes tamanhos dos peixes podem alterar o conteúdo de EPA e DHA em seus tecidos (BUDGE et al., 2002; KAYA; ERDEM, 2009; RITTER et al., 2013). A oxidação não parece ter sido uma das razões para a baixa porcentagem de adequação de EPA e DHA de alguns produtos analisados neste estudo, considerando que não houve associação entre estes fatores. Sugere-se que o método de análise de AG possa interferir na quantidade de AG encontrada. É possível que a diferença de adequação entre os valores de AG aferidos e os declarados no rótulo tenha acontecido, entre outros fatores, devido a diferentes métodos de quantificação de AG que podem ter sido utilizados pelos fabricantes (ALBERT et al., 2015). O método utilizado no presente estudo apresenta validade interna aceitável, considerando que o coeficiente de variação baixo determinado pelas análises em duplicata e três injeções a partir de cada metilação (TVRZICKÁ et al., 2002).

O TOTOX é uma variável que fornece um panorama completo acerca do nível de oxidação de óleos, pois leva em consideração os estágios iniciais de oxidação a partir da presença de peróxidos determinados pelo IP e sua possível decomposição em produtos secundários da oxidação, como: aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos, determinados pelo IA (SILVA et al., 1999; WAI et al., 2009). Desse modo, a literatura sugere que altos níveis de peróxidos (alto IP) nem sempre estão relacionados à alta taxa de decomposição em compostos secundários da oxidação (alto IA), e vice-versa (GUILLEN; CABO, 2002). Por exemplo, a determinação do IA é útil para avaliar a oxidação de óleos de fritura, que geralmente apresentam baixo IP por serem submetidos a altas temperaturas e serem reutilizados (LABRINEA ET AL., 2001). No entanto, neste estudo, o IP, o IA e o TOTOX apresentaram correlação positiva entre si, sugerindo que os produtos não foram expostos a fatores oxidantes determinantes para a degradação dos hidroperóxidos em compostos secundários.

A oxidação dos AG pode ocorrer por diversos fatores. Durante a cadeia produtiva do óleo de peixe, evitar contato com oxigênio, luz e calor é necessário. Como a matéria bruta geralmente é importada a granel de outros países, há possibilidade de oxidação do óleo durante o encapsulamento e adição de antioxidantes (KOLANOWSKI et al., 2007). Pode-se também atribuir altos níveis de oxidação, especialmente de IP, devido a transporte e armazenamento inapropriados do produto final (RITTER et al., 2013). No presente estudo, níveis acima dos parâmetros legais de IP e TOTOX detectados em 20 % dos produtos sugerem que a oxidação foi recente e sugestivo de inadequado armazenamento. Durante todo o processo das análises químicas do presente estudo, as amostras foram armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$ , ao abrigo de luz e, quando necessário, transportadas em caixa térmica com gelo, também ao abrigo de luz. Ainda, a amostra composta foi armazenada em frasco âmbar e mantida em atmosfera inerte de  $\text{N}_2$ , para evitar oxidação devido ao  $\text{O}_2$  atmosférico, evitando assim efeitos oxidativos nas amostras durante a análise.

Estudos semelhantes realizados no Brasil, Nova Zelândia, EUA e África do Sul detectaram que apenas 8 % dos produtos analisados atendiam as recomendações internacionais para IP, IA e TOTOX (ALBERT et al., 2015) e 62, 68 e 16% dos produtos, para IP, analisados por Fantoni et al. (1996), Ritter et al. (2013) e Opperman et al. (2013), respectivamente. Albert et al., (2015) e Ritter et al. (2013) sugerem que, entre outros fatores, baixo controle da cadeia de produção dos OPC pode ter contribuído para altos níveis de oxidação encontrados. Ritter et al. (2013) ainda analisaram que produtos contendo etil éster de óleo de peixe apresentaram maior IP do que os produtos na forma de TAG, sugerindo que a formulação pode interferir na suscetibilidade à oxidação. Para evitar a oxidação de EPA e DHA, a indústria pode adicionar antioxidantes, como  $\alpha$ -tocoferol e butilhidroxitolueno (BHT) ao óleo de peixe durante seu processo de fabricação. Esses compostos possuem mecanismos distintos de interrupção da cadeia oxidativa ou de inibição de seu desencadeamento (TURNER et al., 2006). No presente estudo, menos de 1/3 dos produtos declarou a presença de vitamina E ou qualquer antioxidante no rótulo, e esta declaração não se associou com o nível de oxidação.

No presente estudo, o mercúrio foi encontrado em níveis quantificáveis em menos de 15 % (4/ 28) das amostras, e todos estavam de acordo com a legislação atual, que permite uma concentração de até 100 ppb (ANVISA, 2016). De acordo

com a legislação brasileira anterior, o limite máximo de tolerância de mercúrio era <10 ppb (BRASIL, 1965; ANVISA, 2008). No entanto, em 2016, a Anvisa atualizou seu regulamento para alimentos com alegação de propriedade funcional, indicando que os fabricantes devem seguir farmacopeias brasileira ou internacionais e outras referências oficiais conhecidas (ANVISA, 2016). Dessa forma, a legislação passou a ser 10 vezes mais flexível. O LD e LQ determinados no presente estudo foram pelo menos 9 vezes menores do limite atual permitido por lei. O alto teor de EPA e/ ou DHA na maioria das amostras com quantidade de mercúrio acima do limite de quantificação sugere que possa ter havido concentração deste metal pesado durante o processamento industrial.

Não foram encontrados na literatura estudo que quantificasse mercúrio em OPC pelo método de detecção direta de vapor de mercúrio. Foran et al. (2003) realizaram esta quantificação pelo método de espectroscopia de absorção atômica por vaporização à frio e observaram que 40 % (2/ 5) apresentaram concentrações entre 10 e 12 ppb de mercúrio. Semelhantemente, no presente estudo, foi detectado mercúrio de 11,62 a 14,48 ppb, mas em menor porcentagem de amostras (15 %). O LD determinado por Foran et al. (2003) foi de 6 ppb, valor superior ao LD do presente estudo, e eles não relataram valores de LQ. Por método semelhante ao do presente estudo, com LQ estabelecido de 1,5 ppb, Levine et al. (2005) dosaram mercúrio em diversos tipos de suplementos e, entre eles, 3 amostras de óleo de peixe ou salmão. As concentrações de mercúrio detectadas foram de 9,89, 38,8 e 123ppb, sendo a maior, em uma amostra de óleo de salmão (LEVINE et al., 2005).

Os peixes são a maior fonte alimentar de mercúrio. O metil-mercúrio (MeHg) é a forma de armazenamento do mercúrio no organismo dos peixes após sua biotransformação, e sua concentração nos peixes pode variar de 0,4 a 5 ppm, aumentando de acordo com o aumento do nível trófico do peixe na cadeia alimentar. Assim, peixes mais antigos e maiores na cadeia predatória, como o peixe-espada e os tubarões, bem como certos mamíferos marinhos contêm os maiores níveis de mercúrio (FAO, 2003). O óleo de peixe é extraído dos tecidos dos peixes sob vapor e seu refino é semelhante ao dos óleos vegetais. Porém, o óleo sofre uma etapa essencial de purificação: destilação molecular ou extração supercrítica de fluidos, em que ocorre a remoção de contaminantes inorgânicos, como o MeHg (LIN et al., 2014; HAJEB et al., 2014). No presente trabalho, observou-se uma concentração de

mercúrio abaixo de 15 ppb em todos os produtos analisados, condizente com processo adequado de purificação durante a cadeia de produção do suplemento.

De acordo com a FAO (2003), o limite de ingestão tolerável provisória de MeHg é de 1,6 µg/ kg de peso corporal/ semana, inclusive para feto e crianças. O comitê científico da *European Food Safety Authority* (EFSA) estabeleceu recentemente valor tolerável inferior, de 1,3 µg/ kg de peso corporal/ semana (EFSA, 2015). Cerca de 95 % do MeHg ingerido via oral é rapidamente absorvido pelo organismo, podendo ultrapassar as barreiras hematoencefálica e placentária. Sua excreção se dá majoritariamente pela bile e pelas fezes e sua meia-vida é de 44 a 80 dias (FAO, 2003). De acordo com os cálculos realizados neste estudo, o mercúrio ingerido corresponderiam a 40,6 a 99,9 ng de Hg por dia, considerando o consumo diário de 2 g de EPA e DHA. Essa quantidade resultaria em uma ingestão de 280 a 700 ng de Hg por semana. Para um paciente de porte médio, homem de 70 kg de peso corporal, esta quantidade representaria uma ingestão de 0,004 a 0,010 µg/kg de peso corporal, o que estaria dentro do limite sugerido pela FAO (2003) e EFSA (2015). Análise realizada por Vieira et al. (2015) sugere que o consumo de 1-2 porções de 50g de certas espécies de peixe por semana pode exceder esta recomendação, e também outras recomendações mais restritivas, como da US/EPA de 0,1 mg/ kg de peso corporal/ dia (VIEIRA et al., 2015). Deste modo, o consumo de OPC é capaz de fornecer os AG EPA e DHA em concentrações suficientes para trazer benefícios, de forma segura, sem causar toxicidade por MeHg. Este é um tema de grande preocupação em saúde pública, pois peixes ricos em EPA e DHA, geralmente são os mais ricos em MeHg na cadeia trófica (MAHAFFEY et al., 2011).

O presente estudo possui limitações. É possível que parte das diferenças encontradas entre as informações do rótulo e o quantificado seja em função do método analítico empregado. Sobre a determinação de mercúrio, o método escolhido não foi validado para este tipo de amostra. Porém, o método foi validado para quantificar mercúrio em amostras de tecidos de peixes em relação à espectroscopia de absorção atômica por vaporização à frio e tem a vantagem de ser um método mais rápido, fácil e com menor geração de resíduos químicos nocivos ao meio ambiente (PANICHEV; PANICHEVA, 2015). Ainda, este estudo não é representativo do lote ou de vários lotes de OPC.

No entanto, este trabalho fornece um panorama sobre todos os suplementos de óleo de peixe comercializados no maior centro comercial especializado em

produtos farmacêuticos da capital do país. Ainda, como a maioria dos suplementos comercializados em todo o mundo contém óleo de peixe proveniente de regiões definidas e restritas, como a costa pacífica da América do Sul, Japão, EUA e Escandinávia, os resultados encontrados são de relevância local e internacional.

## **6.5 Conclusão**

Mais de 80 % dos óleos de peixe em cápsula apresentaram adequação de EPA e DHA de acordo com o exigido pela legislação nacional ou diretrizes internacionais. Nível de oxidação acima do recomendado foi encontrado em 20 % das amostras, sugerindo oxidação recente. Quanto ao mercúrio, foi detectado em quase 15 % das amostras, mas em níveis aceitáveis para o consumo humano. Apesar da alta porcentagem de adequação em cada variável analisada, cerca de 2/3 dos produtos apresentou alguma inadequação quanto à legislação, o que sugere a importância e a necessidade de monitoramento constante da qualidade dos óleos de peixe comercializados.

## 7. ARTIGO 2- Suplementos de óleo de peixe para o tratamento de doenças crônicas: o desafio de se evitar alta carga de comprimidos e de se atingir doses compatíveis com sua propriedade funcional

### Resumo

**Introdução:** Diretrizes e consensos de sociedades científicas recomendam a ingestão de dosagens específicas dos ácidos eicosapentenoico (EPA) e docosaexenoico (DHA) a partir de óleo de peixe para prevenir ou para tratar doenças crônicas. A rotulagem dos alimentos ajuda o consumidor a fazer escolhas apropriadas, e essa deve ser fidedigna, clara e completa. O objetivo deste estudo foi avaliar os rótulos de suplementos de óleo de peixe disponíveis no mercado local, a fim de analisar a informação sobre dosagens de EPA e DHA para tratar doenças crônicas, os custos envolvidos e sua conformidade com a legislação. **Métodos:** Rótulos de suplementos de óleo de peixe foram avaliados com base nas declarações de rótulo. A adequação da rotulagem foi avaliada com base em requisitos legais, por meio de um *check-list* elaborado para este estudo. As doses diárias necessárias para cumprir a recomendação de sociedades científicas foram calculadas a partir da quantidade de EPA e DHA (mg) por porção; e o custo mensal de cada produto foi calculado a partir do preço estabelecido pelas farmácias. **Resultado:** Rótulos de 31 produtos foram avaliados, três estavam em conformidade com todos os quesitos analisados. Os quesitos com maior percentual de produtos não conformes estavam relacionados com: teor de aditivos intencionais; quantidade de vitaminas; outras gorduras além dos ácidos graxos EPA e DHA, com 81, 33 e 38% dos produtos inadequados, respectivamente. A quantidade de EPA e DHA por porção variou quase seis vezes entre os produtos e as cápsulas necessárias para alcançar uma ingestão de 2.000 mg de EPA + DHA/dia variou sete vezes. O custo médio mensal para uma ingestão de 2.000 mg de EPA + DHA/dia foi de US \$ 37,83. Os suplementos mais concentrados foram correlacionados com menos calorias ( $\rho = -0,904$ ;  $p < 0,001$ ) e menor quantidade de cápsulas necessárias para atingir a dose efetiva ( $\rho = -0,794$ ;  $p < 0,001$ ), mas com custos mais elevados ( $\rho = 0,531$ ;  $p = 0,002$ ). **Conclusão:** Há uma grande variação entre as cápsulas de EPA e DHA disponíveis no comércio. A ingestão de produtos concentrados permite que os pacientes atinjam a adequada ingestão das doses prescritas e evitem a carga de comprimidos, apesar do custo mais elevado. A legislação atual é fragmentada em 6 documentos legais, o que pode ser um fator complicador para os fabricantes se adequarem à legislação.

## **Fish oil supplements for the treatment of chronic diseases: the challenge of avoiding high pill burden and achieving doses related to their functional benefits**

### **Abstract**

**Background:** Guidelines worldwide have recommended specific combined dosages of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) intake from fish oil to prevent or to treat chronic diseases. The labeling of foods helps the consumer to make appropriate choices and it should be reliable, clear and complete. The aim of this study was to evaluate fish oil supplement labels available in the local market in order to evaluate consumer information provided about dosages of EPA and DHA to treat chronic diseases, costs incurred and other related variables. **Methods:** Commercial fish oil supplement labels were evaluated for fatty acid profiles based on the label statements and for labeling compliance based on legal requirements through a checklist developed for this study. Daily dosages needed to meet the scientific societies guideline's recommendation were calculated from the milligrams of EPA and DHA per serving, and the monthly cost of each product was calculated from the price established by the drugstores. **Results:** Labels of 31 products were evaluated and 3 labels were in accordance to all issues analyzed. The issues that presented higher percentage of products not complying were related to: content of intentional additives; amount of vitamins; other fats than the fatty acids EPA and DHA, with 81, 33 and 38% of unsuitable products, respectively. The amount of combined EPA and DHA per serving varied almost six-fold between products and the capsules needed to achieve a 2,000 mg serving varied seven-fold. The median monthly cost for a 2,000 mg serving of EPA and DHA was US\$ 37.83. The more concentrated supplements were correlated with lesser calories ( $\rho = -0.904$ ;  $p < 0.001$ ) and lesser pill ( $\rho = -0.794$ ;  $p < 0.001$ ), but higher costs ( $\rho = 0.531$ ;  $p = 0.002$ ). **Conclusions:** There is an immense variation among commercial EPA and DHA capsules. The intake of concentrated products will help patients attain prescribed dosages and avoid pill burden, despite the higher cost involved. Current legislation is fragmented into 6 legal documents, which can be a complicating factor for manufacturers to suit the law.

## 7.1 Introdução

O estilo de vida contemporâneo e o estresse estão associados com o aumento da incidência de doenças crônicas e da mortalidade (STRONG et al., 2005). As doenças crônicas contribuem para cerca de 63 % dos óbitos mundiais, e as mais prevalentes são as cardiovasculares (DCV) (SCHIMIDT et al., 2011; WHO, 2014). A ingestão de ácidos graxos (AG) ômega-3 ( $\omega$ -3) eicosapentenoico (EPA) e docosaexenoico (DHA) pode prevenir DCV pela redução dos seguintes aspectos: arritmia, hipertrigliceridemia, inflamação sistêmica, hipertensão arterial e agregação plaquetária (WANG et al., 2006). Esses benefícios foram documentados em diretrizes e consensos de sociedades científicas e médicas de diversos países (ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002, SANTOS et al., 2013; FDA, 1997). De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), se ingeridos em doses adequadas, os AG EPA e DHA podem ter a alegação da seguinte propriedade funcional e de saúde: "... auxiliam na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos, desde que associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis" (ANVISA, 2016).

O consumo de peixe ao menos duas vezes por semana é recomendado a fim de aumentar a ingestão de  $\omega$ -3 para prevenir DCV. No entanto, o pescado não é um alimento de primeira necessidade, sendo a carne bovina e o frango as fontes proteicas mais comuns em diversos países, como Estados Unidos e Brasil (SANTOS et al., 2013; BRASIL, 2010a; USDA, 2010). Em 2009, em nível mundial, o pescado e alimentos marinhos em geral contribuíram para 6,2 % do total de ingestão de alimentos proteicos (ALBERT; METIAN, 2013). Assim, óleos de peixe em cápsulas (OPC) são uma alternativa eficaz para o consumo de  $\omega$ -3. Diversos consensos e diretrizes recomendam dosagens específicas de EPA e DHA para prevenir e tratar doenças crônicas (ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002, SANTOS et al., 2013).

Pacientes portadores de doenças crônicas geralmente ingerem múltiplas drogas, resultando em uma ingestão diária média de 9 a 14 comprimidos e alto custo (HSU et al., 2015; SAASTAMOINEN; VERHO, 2015). A ingestão de 5 ou mais comprimidos por dia é considerada uma alta carga (HAUBER et al., 2013). É importante saber quantas cápsulas de óleo de peixe são necessárias para se atingir

as recomendações das diretrizes para evitar sua ingestão excessiva e para favorecer a adesão do paciente ao tratamento.

O OPC é o suplemento mais vendido em diversos países do mundo, sendo o Peru o principal país produtor e fornecedor, seguido do Japão, Chile, Estados Unidos e Escandinávia (PIKE; JACKSON, 2010; ZARGAR; ITO, 2011). No mercado brasileiro são encontrados produtos com matéria-prima importada, mas encapsulados e embalados nacionalmente e também produtos importados como produtos finais, prontos para dispensação. A venda de OPC teve um crescimento anual de mais de 15 % recentemente e são de venda livre (BRASIL, 2009; PIKE; JACKSON, 2010). Não há uma padronização da concentração de EPA e DHA nos OPC, e a população em geral, incluindo consumidores e profissionais de saúde, possui conhecimento limitado acerca das doses compatíveis com sua propriedade funcional e efeitos colaterais desses suplementos (LANDSTROM et al., 2007; McMANUS et al., 2011; MURGEL et al., 2013). Conseqüentemente, o consumo de OPC é passível de erros de dosagem causando efeitos colaterais ou falta de efeito benéfico à saúde (MEYER, 2011; MURGEL et al., 2013). Os possíveis efeitos colaterais incluem: diarreia, náusea e hemorragia (FDA, 1997).

A fim de auxiliar o consumidor na compra do suplemento adequado, o rótulo do produto deve ser consultado. De acordo com a Anvisa, os OPC são classificados como novos alimentos – NA - (óleo de peixe com apresentação em cápsulas) e podem apresentar alegação de propriedade funcional e/ou de saúde (APFS) (ANVISA, 2005; ANVISA, 2016). Esta alegação deve constar no rótulo e na propaganda, e é necessário que todos os OPC tenham seu registro explicitado no rótulo (BRASIL, 1969; BRASIL, 1999). As informações dos rótulos devem ser fidedignas, claras e completas para que o consumidor esteja menos vulnerável, mais seguro e orientado quanto à qualidade do produto adquirido (STRINGHETA et al., 2007; CAMARA et al., 2009; BAGGIO; EFING, 2009; VERZOLA, 2011). Desse modo, é necessário que haja controle do registro, rotulagem, propaganda e comercialização de OPC, além de harmonização da legislação para que esta seja clara e seguida corretamente pela indústria. Este controle é exercido pelos órgãos fiscalizadores do Estado, no caso pela Anvisa, e é vedado à iniciativa privada.

O objetivo do presente estudo foi analisar os rótulos de OPC em relação às exigências da legislação brasileira e em relação às doses compatíveis com a

propriedade funcional de EPA e DHA para o tratamento de doenças crônicas, assim como seu custo e outras variáveis relacionadas.

## 7.2 Métodos

Foram analisados, entre setembro e novembro de 2015, rótulos de OPC disponíveis em 21 drogarias e farmácias da região comercial em Brasília conhecida como “rua das farmácias”. Como critério de inclusão selecionou-se apenas os produtos que possuíam registro na Anvisa. Adotou-se como critério de exclusão: presença de outros tipos de óleo, além do de peixe; e outras formas de apresentação, que não fossem cápsulas. A fim de manter sigilo dos dados, as marcas dos produtos analisados foram omitidas, sendo substituídas por números sequenciais por ordem de aquisição.

A quantidade de EPA e DHA dos produtos foi avaliada de acordo com o valor declarado na tabela nutricional dos rótulos e comparada às recomendações de EPA e DHA das principais diretrizes científicas para o tratamento de doenças crônicas (ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002, SANTOS et al., 2013; FDA, 1997; FDA, 2000). Analisou-se a quantidade de EPA e DHA por porção sugerida pelo fabricante e também quantas porções são necessárias para se atingir as recomendações de EPA e DHA das diretrizes, que consideramos como critério de uso neste estudo (2.000 mg/ dia). Essa análise ainda incluiu a quantidade de calorias, de cápsulas e o custo mensal (30 dias) em dólar americano (US\$) envolvido para se atingir esse critério de uso.

O rótulo de cada produto foi analisado por meio de um *check-list* (Material suplementar 1) que foi elaborado com base em 6 documentos legais, publicados em épocas distintas (ANVISA, 2005; ANVISA, 2016; BRASIL, 1969; BRASIL, 1999; BRASIL, 2002; BRASIL, 2003).

Em seguida, foi atribuída uma porcentagem de adequação para cada quesito do *check-list*, em relação a quantos rótulos estão de acordo com cada um desses. Consideraram-se conformes apenas os produtos que apresentaram 100% de percentual de adequação para os itens aplicáveis.

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa R<sup>®</sup> (versão 3.3.0). As variáveis foram testadas quanto à sua normalidade para avaliação pelo teste de Shapiro-Wilk. Para dados que não cumpriam a suposição de distribuição normal, as

análises descritivas foram expressas como medianas e quartis; e as análises de correlação foram realizadas utilizando o teste de correlação de Spearman. Adotaram-se valores significativos aqueles com  $p < 0,05$ .

### 7.3 Resultados

As diretrizes internacionais e brasileiras para a prevenção e tratamento de doenças crônicas foram analisadas e suas recomendações quanto à ingestão de óleo de peixe e ômega-3 foram resumidas na Tabela 7.1. De acordo com as seguintes sociedades: *Food and Drug Administration* (FDA), *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids* (ISSFAL), *American Heart Association* (AHA) e a Sociedade Brasileira de Cardiologia (SBC), a dose diária recomendada de EPA e DHA para tratamento de hipertrigliceridemia é de, no mínimo, 2.000 mg (ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002, SANTOS et al., 2013; FDA, 1997; FDA, 2000).

**Tabela 7.1** Recomendações de óleo de peixe e ômega-3 de diretrizes nacionais e internacionais para prevenção e tratamento de doenças crônicas.

Diretriz	Indicação	Dose de EPA + DHA (mg/dia)
ISSFAL	Redução do risco de DCV	500
AHA	Redução da mortalidade por DCV	500 to 1.800
AHA	Tratamento de DCV	1.000
AHA	Hipertrigliceridemia	2.000 to 4.000
SBC	Hipertrigliceridemia severa	2.000-4.000*
SBC	Redução do risco de DCV	1.000*
FDA	Efeitos colaterais	>3.000
FDA	Qtde. máxima recomendada por porção	2.000

\*Qtde. de óleo de peixe em miligramas.

Abrev.: ISSFAL, *International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids*; AHA, *American Heart Association*; SBC, *Sociedade Brasileira de Cardiologia*; FDA, *Food and Drug Administration*; DCV, doenças cardiovasculares.

(ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002, SANTOS et al., 2013; FDA, 1997; FDA, 2000)

Nas 21 drogarias e farmácias visitadas foram identificadas 26 marcas de OPC, sendo que 4 marcas apresentavam mais de um produto, totalizando 31 rótulos de produtos distintos analisados. Um quarto (8/ 31) eram produtos importados prontos para dispensação. No material suplementar 2 são apresentadas as informações sobre cada produto. Oitenta e quatro por cento (n=26) dos produtos declararam no rótulo alegação de propriedade funcional ou de saúde. Todos os outros produtos sem esta alegação, foram classificados como “novos alimentos”.

A quantidade de EPA + DHA por porção variou quase 6 vezes entre os produtos, de 300 a 1.700 mg. Ainda, a quantidade de cápsulas para se atingir a recomendação diária de, no mínimo, 2.000 mg de EPA + DHA variou 7 vezes entre os produtos, de 2 cápsulas de 1 g a 14 cápsulas de 500 mg, o que representou uma variação de 1,3 a 8 porções sugeridas pelo fabricante. O consumo de 14 cápsulas por dia para atingir o nosso critério de uso contribuiu com a ingestão de 63 kcal por dia. A concentração de EPA e DHA/ cápsula dos diferentes produtos variou de 30 a 80 %, e a mais prevalente foi 30 % (n = 13). (Tabela 7.2). O custo mediano mensal para se atingir nosso critério de uso foi de US\$ 37,83. Ainda, entre o produto mais caro e o mais barato, houve uma variação de cerca de 4 vezes, de US\$ 20,94 a US\$ 79,29 por mês.

Seguindo as porções sugeridas dos rótulos pelo fabricante, 19 % (6/ 31) dos produtos não atingiram a menor recomendação das diretrizes para prevenção de DCV de 500 mg de EPA + DHA/ dia. Apenas um produto apresentava porção diária recomendada próxima ao critério de uso de 2.000 mg, mas nenhum produto atingiu este valor. Considerando a definição de carga de comprimidos, apenas 19 % (6/ 31) dos produtos atingiram o nosso critério de uso com menos de 5 cápsulas por dia.

**Tabela 7.2** Doses diárias, custo e calorias de suplementos de óleo de peixe, de acordo com informações do rótulo.

<b>Variáveis analisadas</b>	<b>N (%) ou Mediana (Percentil 25 - 75%)</b>
EPA + DHA/ porção (mg)	900 (600 - 900)
DHA e EPA/ mg de óleo (%)	30,17 (30,00 – 54,19)
30-40 % de DHA + EPA	22 (71)
40-60 % de DHA + EPA	3 (10)
60-80 % de DHA + EPA	6 (19)
Quantidade para atingir 2.000 mg de EPA + DHA/ dia	
Cápsulas (unidades)	7 (5,5 – 7,0)
Porções (unidades)	2,3 (2,3 – 3,5)
Custo mensal (US\$)	37,83 (28,17 – 47,61)
Energia (kcal)	63 (37,8 - 63)

Abrev.: EPA, ácido eicosapentenoico; DHA, ácido docosaexenoico.

Análises de correlação mostram que a concentração de EPA + DHA nos produtos se associou positivamente ao custo mensal necessário para se atingir 2.000 mg de EPA + DHA/ dia ( $\rho = 0.531$ ;  $p = 0.002$ ), e negativamente à quantidade de calorias ( $\rho = - 0.904$ ;  $p < 0.001$ ) e número de cápsulas ingeridas ( $\rho = - 0.794$ ;  $p < 0.001$ ).

Em relação à adequação dos rótulos, apenas 3 produtos apresentaram conformidade com o *check-list*, sendo que dois apresentaram APFS e todos os produtos eram de marcas distintas entre si. A maior parte dos produtos possui de 1 a 3 itens não conformes, e não houve produto com mais de cinco itens não conformes.

Quanto aos itens exigidos pela legislação analisados pelo *check-list*, os itens 6, 11 e 13 apresentaram menor porcentagem de produtos adequados (Tabela 7.3).

**Tabela 7.3** Adequação dos produtos em relação a cada quesito analisado.

Quesitos	Informação exigida	Rótulos conformes (%)	Produtos não conformes (OP)
1	Natureza do produto	100	-
2	Marca	100	-
3	Fabricante	100	-
4	Sede da fábrica	100	-
5	Nº registro	100	-
6	Aditivos intencionais	19	02 - 06; 08 - 17; 20 - 23; 25 - 29; 31
7	Peso líquido	100	-
8	Lista de ingredientes	97	02, 16
9	Qtde. calorias e nutrientes	100	-
10	Qtde. nutriente referente à alegação	92	03, 08
11	Qtde. Gordura e colesterol	62	02, 09, 10, 12, 13, 15 - 17, 27, 29
12	Valor energético (kcal e kJ)	94	24, 25
13	Qtde. Vitamina	67	05, 08, 25, 31
14	Gorduras, EPA e DHA	88	09, 12, 13
15	Adv: consultar medico	96	20
16	Falta de evidência p/ prevenção ou cura	100	-
17	Adv: alergia a crustáceos	81	09, 19, 25
18	EPA e DHA facultativos	80	09, 25
19	Adv: consultar medico	97	20

Abrev.: EPA, ácido eicosapentenoico; DHA, ácido docosaexenoico; OP, óleo de peixe.

A inadequação nos itens 6 e 13 se refere à falta de clareza no rótulo quanto à presença de aditivos, que no caso do óleo de peixe seriam os antioxidantes. Ainda que fosse mencionada a adição de algum aditivo intencional, seu código foi expresso em apenas 6 rótulos. Já quanto ao item 13, 33,3 % (4/ 12) dos produtos que declararam a presença de vitamina E na lista de ingredientes não declararam sua quantidade na tabela de informações nutricionais. A presença de vitamina E na fórmula foi mencionada na lista de ingredientes ou na tabela nutricional de 38,7 %

(12/ 31) produtos, que apresentaram maior custo mensal do que os produtos sem vitamina E ( $p = 0,032$ ).

O item 11 diz respeito à informação de colesterol e outros tipos de gordura presentes no produto, além das dos ácidos graxos poli-insaturados. Os produtos não conformes apenas discriminaram a quantidade de gorduras totais e poli-insaturadas.

#### 7.4 Discussão

Foram analisados suplementos de óleo de peixe disponíveis no comércio para avaliar a adequação dos seus rótulos em relação às doses recomendadas de EPA e DHA para tratar doenças crônicas. Foi observada uma grande variação (quase seis vezes) em porções diárias recomendadas no rótulo de EPA e DHA, entre os produtos analisados. Grande variação também foi relatada por Zargar & Ito (2011) e Roth & Harris (2010), quanto a suplementos disponíveis no comércio dos Estados Unidos, podendo resultar na ingestão de dose errada ou falta de efeito benéfico à saúde (ISSFAL, 2004; KRIS-ETHERTON et al., 2002, SANTOS et al., 2013; FDA, 1997; FDA, 2000).

A falta de padronização nas recomendações da orientação de EPA e DHA (Tabela 7.1) e sua venda livre podem explicar, em parte, a variabilidade da composição dos produtos e das porções diárias sugeridas nos rótulos. No comércio, existe uma variedade de formulações de óleo de peixe, que varia entre 30 % a 90 % de EPA + DHA (SANTOS et al., 2013; ROTH; HARRIS, 2010) em cada cápsula. Do mesmo modo, verificou-se uma ampla variação entre os produtos analisados neste estudo, e o produto mais concentrado tinha 80 % desses dois AG. Para cumprir o critério de uso de 2.000 mg/ dia de EPA + DHA, dependendo do produto, os consumidores devem ingerir até 14 cápsulas de 500 mg por dia. Assim, a prescrição de suplementos de óleo de peixe deve, preferencialmente, especificar a dosagem exata de EPA e DHA, em vez do número de cápsulas por dia.

Os resultados deste estudo indicam que a concentração de EPA + DHA foi positivamente correlacionada com o custo e ingestão calórica, e negativamente, com o número de cápsulas necessárias para atingir uma dose diária de 2.000 mg. As doenças crônicas são associadas a elevados custos de tratamento e, geralmente, relacionados com o uso simultâneo de mais de 10 drogas, conhecido como o termo “*excessive polypharmacy*” (SAASTAMOINEN; VERHO, 2015). Sabe-se que a

adesão ao tratamento é inversamente correlacionada com o número de pílulas prescritas (KULKARNI et al., 2006). O uso de formulações concentradas de OPC ajudaria a reduzir a carga de comprimidos, minimizar efeitos colaterais e contribuir para maior adesão ao tratamento (ZARGAR; ITO, 2011; HSU et al., 2015). A ingestão diária de 63 kcal pelos suplementos representa as calorias provenientes de uma maçã com casca, o que pode ser considerado um lance saudável para pacientes com doenças crônicas (USDA, 2016). Portanto, para alcançar máxima efetividade, é necessário que os profissionais e pacientes considerem fatores, como: carga de comprimidos, custo e adesão ao tratamento. Nesse sentido, a escolha de uma fórmula mais concentrada, porém mais cara, pode ser uma boa escolha.

A baixa quantidade de produtos com rótulos em conformidade com a legislação (3/31) é condizente com a fragmentação de exigência das diferentes leis, o que torna a adequação à lei mais difícil. A alta porcentagem de produtos com APFS declarada sugere que os fabricantes acompanharam os regulamentos estabelecidos pela Anvisa, com base em diretrizes e consensos internacionais sobre doenças cardiovasculares e hipertrigliceridemia. Esta alegação pode ser entendida pela indústria como estratégia de marketing e atrativo para que os consumidores adquiram seus produtos. No entanto, por ser um produto de venda livre (BRASIL, 2009), é necessário que a rotulagem esteja completa para que o consumidor possa comparar os rótulos no momento da compra. Não houve diferença quanto à porcentagem de quesitos conformes entre o grupo de OPC que apresentaram ou não APFS, o que sugere que esta declaração não foi um fator considerado pela indústria para adequar seus rótulos à legislação com mais rigor.

Aditivos antioxidantes e vitaminas, como o  $\alpha$ -tocoferol, podem ser adicionados ao óleo de peixe durante seu processo de fabricação. Amplamente utilizado como antioxidante de lipídios, o  $\alpha$ -tocoferol pode atuar reagindo com o radical peroxila para interromper a propagação da oxidação e com o radical alcoxila para inibir a decomposição de hidroperóxidos em aldeídos (FRANKEL, 1996; TURNER et al., 2006). No entanto, estudos recentes indicam que a presença da vitamina E reduz o efeito do  $\omega$ -3 em relação ao seu efeito anticancerígeno (COLAS et al., 2005; XIONG et al., 2012).

O quesito 11 se refere à menção de colesterol e outros tipos de gorduras na tabela de informações nutricionais, como a saturada. A indústria tem utilizado recursos tecnológicos para reformular óleos de peixe brutos em produtos mais

concentrados em EPA e DHA (DYERBERG et al., 2010). Consequentemente, neste tipo de formulação, há uma menor quantidade de colesterol e outros tipos de gordura. A legislação brasileira não exige a discriminação no rótulo do tipo de formulação em que o óleo se apresenta, dificultando a identificação de óleos mais concentrados (ANVISA, 2005; ANVISA, 2016).

Desde 1999 a Anvisa tem dificuldade de legislar sobre APFS diante do crescimento do número de solicitações de registros de produtos com APFS e da existência de rótulos irregulares que apresentam APFS não autorizada (ANVISA, 2004; ANVISA, 2008). Dessa forma, hoje há 6 documentos legais que regulamentam a rotulagem de OPC. Em 2005 foi exigido que os fabricantes de OPC comprovassem a APFS declarada com base na recomendação diária indicada no rótulo, havendo no mínimo, 100 mg de EPA e DHA por porção. Em 2016, o regulamento para APFS dos AG EPA e DHA foi revisto e não há quantidade mínima de EPA e DHA por porção estabelecida, desde que a indústria comprove a APFS em estudos realizados em humanos que utilizaram seu produto. Algumas informações permanecem sem exigência na rotulagem, como: a origem ou fonte de obtenção do produto; teor de mercúrio, chumbo, cádmio e arsênio (ANVISA, 2008; ANVISA, 2016).

O fato de OPC serem considerados alimentos passíveis de APFS, e não medicamentos, não impede que ações sejam desenvolvidas, para evitar fraudes ou declaração de informações incompletas no rótulo, que induzam o consumidor a erros (STRINGHETA et al., 2007). Assim, a Anvisa e as vigilâncias sanitárias estaduais possuem importante papel no desenvolvimento de ações educativas para esclarecer a população sobre os riscos oriundos do consumo inadvertido destes produtos; fiscalizar estabelecimentos envolvidos na cadeia de produção e distribuição de OPC para garantir ao consumidor produtos que atendam aos padrões de identidade e qualidade e à legislação vigente; evitar riscos adicionais à saúde de quem o consome (CARVALHO; COELHO, 2008).

O presente estudo possui limitações. Pode haver outros suplementos de óleo de peixe disponível no mercado brasileiro que não foram incluídos no estudo por não estarem disponíveis nos dias da coleta de dados. Utilizou-se o preço sugerido pelas farmácias, o que é sujeito a mudanças. Dessa forma, ao calcular o custo mensal do produto, os consumidores podem encontrar outros suplementos com melhor relação custo-efetividade.

## **7.5 Conclusão**

Há uma grande variação entre as cápsulas de EPA e DHA disponíveis no comércio. A ingestão de produtos concentrados permite que os pacientes atinjam a adequada ingestão das doses prescritas e evitem a carga de comprimidos, apesar do custo mais elevado. A legislação atual é fragmentada em 6 documentos legais, o que pode ser um fator complicador para os fabricantes se adequarem à legislação.

Material Suplementar 1. *Check-list* para verificação da adequação dos rótulos.

Identificação do Produto:			
Quesitos analisados no rótulo do produto	C	NC	NA
1 - A qualidade, a natureza e o tipo do alimento, observadas a definição, a descrição e a classificação estabelecida no respectivo padrão de identidade e qualidade... <sup>1</sup>			
2 - Nome e/ou a marca do alimento. <sup>1</sup>			
3 - Nome do fabricante ou produtor. <sup>1</sup>			
4 - Sede da fábrica ou local de produção. <sup>1</sup>			
5 - Número de registro do alimento no órgão competente do Ministério da Saúde. <sup>1,2</sup>			
6 - Indicação do emprego de aditivo intencional, mencionando-o expressamente ou indicando o código de identificação correspondente com a especificação da classe a que pertencer. <sup>1</sup>			
7 - O peso ou o volume líquido. <sup>1</sup>			
8 - Todos os ingredientes devem constar em ordem decrescente, da respectiva proporção. <sup>3</sup>			
9 - A quantidade do valor energético e dos seguintes nutrientes: carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar, sódio. <sup>4</sup>			
10 - A quantidade de qualquer outro nutriente sobre o qual se faça uma declaração de propriedades nutricionais ou outra declaração que faça referência a nutrientes. <sup>4*</sup>			
11 - Quando for realizada uma declaração de propriedades nutricionais (informação nutricional complementar) sobre o tipo e ou a quantidade de gorduras e ou ácidos graxos e ou colesterol deve ser indicada a quantidade de gorduras saturadas, trans, monoinsaturadas, poli-insaturadas e colesterol, em conformidade com o estipulado no item 3.4.6. <sup>4*</sup>			
12 - Valor energético: quilocalorias (kcal) e quilojoules (kJ) <sup>4</sup>			
13 - As vitaminas e os minerais que constam no Anexo A, sempre e quando estiverem presentes em quantidade igual ou maior a 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo. <sup>4</sup>			
14 - A tabela de informação nutricional deve conter os três tipos de gorduras: saturadas, monoinsaturadas e poli-insaturadas, discriminando abaixo das poli-insaturadas o conteúdo de ômega-3 (EPA e DHA). <sup>6*</sup>			
15 - Advertência em destaque e em negrito: "Pessoas que apresentem doenças ou alterações fisiológicas, mulheres grávidas ou amamentando (nutrizes) deverão consultar o			

medico antes de usar o produto. <sup>6*</sup>			
16 - Informação: O Ministério da Saúde adverte: Não existem evidências científicas comprovadas de que este alimento previna, trate ou cure doenças. <sup>5**</sup>			
17 - Advertência em destaque e em negrito: “Pessoas alérgicas a peixes e crustáceos devem evitar o consumo deste produto”. <sup>5**</sup>			
18 - Caso a empresa queira declarar na informação nutricional (perfil de ácido graxo para EPA, DHA e alfa-linolênico), pode fazê-lo desde que declare os três tipos de gordura, conforme item 3.4.6 da Resolução RDC nº 360/2003. <sup>5**</sup>			
19 - Advertência: “Pessoas que apresentem doenças ou alterações fisiológicas, mulheres grávidas e lactantes devem consultar o medico antes de consumir este produto”. <sup>5**</sup>			

Abrev.: C, Conforme; NC, Não Conforme; NA, Não se Aplica; EPA, Ácido eicosapentenoico; DHA, Ácido docosaenoico; RDC, Resolução da Diretoria Colegiada.

<sup>1</sup> Decreto-Lei nº 986/69 (BRASIL, 1969);

<sup>2</sup> RDC nº 19/1999 (BRASIL, 1999);

<sup>3</sup> RDC nº 259/2002 (BRASIL, 2002);

<sup>4</sup> RDC nº 360/2003 (BRASIL, 2003);

<sup>5</sup> Site da Anvisa: Assuntos de Interesse. Novos Alimentos e Novos Ingredientes (ANVISA, 2005).

<sup>6</sup> Site da Anvisa: Assuntos de Interesse. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde (ANVISA, 2016).

\*Itens 10, 11, 14 e 15 para alimentos com alegação de propriedade funcional.

\*\*Itens 16 a 19 para novos alimentos (sem alegação de propriedade funcional).

**Tabela 7.4** Material Suplementar 2: Composição, custo e calorias de suplementos de óleo de peixe.

ID	Variável 1 (n) <sup>a</sup>	Variável 2 (mg) <sup>b</sup>	Variável 3 (%) <sup>c</sup>	Variável 4 (n) <sup>d</sup>	Variável 5 (n) <sup>e</sup>	Variável 6 (\$) <sup>f</sup>	Variável 7 (kcal) <sup>g</sup>
OP1	6	900	30,0	14	2,3	31.86	63
OP2	1	362	30,2	6	6,0	53.98	65
OP3	2	600	53,6	6	3,0	37.83	30
OP4	1	420	70,0	5	5,0	79.29	27
OP5	1	1.000	71,4	2	2,0	35.22	25
OP6	3	900	30,0	7	2,3	24.33	63
OP7	3	900	30,0	7	2,3	31.39	63
OP8	3	900	30,0	7	2,3	40.54	63
OP9	3	900	30,0	7	2,3	28.63	63
OP10	2	719	36,0	6	3,0	22.85	54
OP11	2	600	30,0	7	3,5	27.46	63
OP12	3	900	30,0	7	2,3	27.70	63
OP13	3	900	30,0	7	2,3	24.93	63
OP14	2	600	30,0	7	3,5	22.16	63
OP15	1	775	62,0	3	3,0	54.62	34
OP16	2	300	30,0	14	7,0	57.44	63
OP17	2	330	33,0	13	6,5	44.10	59
OP18	3	457	30,5	14	4,7	46.67	63
OP19	2	610	30,5	7	3,5	28.81	63
OP20	2	1.100	55,0	4	2,0	48.55	36
OP21	3	900	30,0	7	2,3	20.94	63
OP22	3	900	30,0	7	2,3	38.50	63
OP23	3	1.700	56,7	4	1,3	42.60	36
OP24	2	800	80,0	5	2,5	79.16	23
OP25	3	1.000	33,3	6	2,0	46.14	54
OP26	1	603	54,8	4	4,0	33.33	40
OP27	2	1.280	64,0	4	2,0	50.21	36
OP28	1	300	30,0	7	7,0	54.49	63
OP29	4	1.200	30,0	7	1,8	27.47	63
OP30	2	600	30,0	7	3,5	32.22	63
OP31	3	1.000	33,3	6	2,0	40.00	54

Abrev.: OP, óleo de peixe; EPA, ácidos eicosapentenoico; DHA, ácido docosaexenoico.

<sup>a</sup>Variável 1 = Porção (número de cápsulas)

<sup>b</sup>Variável 2 = EPA + DHA por porção (mg)

<sup>c</sup>Variável 3 = Porcentagem de EPA + DHA (mg)/ mg de óleo (%)

<sup>d</sup>Variável 4 = Cápsulas para se atingir 2.000 mg de EPA + DHA por dia (n)

<sup>e</sup>Variável 5 = Porções para se atingir 2.000 mg de EPA + DHA por dia (n)

<sup>f</sup>Variável 6 = Custo mensal de uma dose para se atingir 2.000 mg de EPA + DHA por dia (US\$)

<sup>g</sup>Variável 7 = Calorias para se atingir 2.000 mg de EPA + DHA por dia (kcal)

## 8. CONCLUSÕES GERAIS

A avaliação quali e quantitativa de óleos de peixe em cápsulas comercializados em Brasília, DF, abordou aspectos como perfil de ácidos graxos, nível de oxidação, presença de mercúrio, rotulagem e indicação quanto a seus efeitos benéficos relacionados aos níveis séricos de triglicerídeos e permitiu as seguintes conclusões:

- Mais de 80 % dos produtos apresentaram adequação de EPA e DHA de acordo com o exigido pela legislação. As adequações variaram de 75,9 a 105,1 % para EPA e de 88,9 a 137,4 % para DHA. Os produtos com maior porcentagem de adequação de DHA apresentaram maior custo.
- Produtos com maior concentração de EPA e DHA apresentaram significativamente, menor teor de AG saturados.
- Nível de oxidação acima do recomendado foi encontrado em 20 % das amostras, de acordo com as variáveis IP e TOTOX.
- O mercúrio foi quantificável em cerca de 15 % das amostras, e todos os valores estavam abaixo do valor máximo permitido pela legislação vigente.
- A maior parte dos suplementos (84 %) apresentou alegação de propriedade funcional e/ou de saúde. No entanto, este fator não foi determinante para maior porcentagem de adequação da rotulagem. Apenas 9,7 % dos produtos atendiam as exigências de rotulagem da legislação vigente. A legislação atual é fragmentada em 6 documentos legais, o que pode ter sido um fator complicador para os fabricantes se adequarem à legislação.
- Os produtos analisados apresentaram grande variação de porcentagem de EPA e DHA em sua composição e grande variação do número de cápsulas e de custo para se atingir a recomendação de 2g de EPA e DHA por dia. Produtos com maior concentração de EPA e DHA foram associados à menor ingestão de cápsulas e de calorias, mas a um maior custo.

A avaliação quantitativa dos suplementos é importante para garantir a qualidade dos produtos disponíveis no comércio.

Considerando a recomendação compatíveis com sua propriedade funcional de EPA e DHA, a ingestão de produtos mais concentrados favorece uma maior adesão do paciente ao tratamento, apesar do maior custo envolvido. A rotulagem

dos OPC deve ser clara e completa para que haja maior informação ao consumidor e proteção à sua saúde.

## REFERÊNCIAS

Ackman RG, Ratnayake WMN, Macpherson EJ. EPA and DHA Contents of Encapsulated Fish Oil Products. *JAOCS*. 1989;66(8):1162-4.

Albert GJT, Metian M. Fish Matters: Importance of Aquatic Foods in Human Nutrition and Global Food Supply. *Rev Fish Sci*. 2013;21(1):22-38.

Albert BB, Derraik JGB, Cameron-Smith D, Hofman PL, Tumanov S, Villas-Boas SG, et al. Fish oil supplements in New Zealand are highly oxidised and do not meet label content of n-3 PUFA. *Scientific Reports*. 2015;5(9728). [Online]. Disponível em: <http://www.nature.com/articles/srep07928>. [Acesso em 03 mai 2015].

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Assuntos de Interesse. Novos Alimentos e Novos Ingredientes. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2005. [Online]. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/cs>. [Acesso em: 02 mai 2014].

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Assuntos de Interesse. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, 2008. [Online]. Disponível em: <http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/wuE>. [Acesso em: 02 mai. 2014].

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerência Geral de Alimentos / Gerência de Produtos Especiais. Rotulagem de Alimentos, 2013. [atualizado em: 22 jan 2013]. [Online]. Disponível em: <http://pt.slideshare.net/andreiafaion/rotulagem-alimentos>. [Acesso em: 02 mai 2014].

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos. Assuntos de Interesse. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, 2016. [Online]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Alimentos/Assuntos+de+Interesse/Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude/Avaliacao+de+seguranca+e+comprovacao+de+eficacia>. [Acesso em: 20 abr. 2016].

AOAC. Method #942.27. In: *Official Methods of Analysis of AOAC International*. Gaithersburg: AOAC International; 1997.

AOCS. Method Cd 18-90. In: *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign: AOCS Press; 1995.

AOCS. Method Cd 8-53. In: Firestone D (ed.) *Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemists' Society*. Champaign: AOCS Press; 1997.

AOCS. AOCS Lipid Library. Marine Oils. Edible Oil Processing, 2011. [Online]. Disponível em: <http://lipidlibrary.aocs.org/OilsFats/content.cfm?ItemNumber=40332>. [Acesso em: 09 ago. 2016].

Araújo JMA. Oxidação de lipídios em alimentos. In: Araújo JMA (ed.) *Química de alimentos: teoria e prática*. 4ª ed. Viçosa: Editora UFV; 2008. p.15-123.

Baggio AC, Efiging AC. Informação para o Consumo de Alimentos Transgênicos: Atendimento da Dignidade do Cidadão Brasileiro. NEJ. 2009;14(2):54-83.

BRASIL. Decreto n. 55.871, de 26 de março de 1965. Modifica o Decreto nº 50.040, de 24 de janeiro de 1961, referente a normas reguladoras do emprêgo de aditivos para alimentos, alterado pelo Decreto nº 691, de 13 de março de 1962. Diário Oficial da União. [Online]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/1950-1969/D55871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/1950-1969/D55871.htm). [Acesso em: 02 mai., 2014].

BRASIL. Decreto-Lei n.986, de 21 de outubro de 1969. Institui normas básicas sobre alimentos. Diário Oficial da União. [Online]. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto-lei/Del0986.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto-lei/Del0986.htm). [Acesso em: 02 mai. 2014].

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n.19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde em sua Rotulagem. Diário Oficial da União. [Online]. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=110>. [Acesso em: 13 mai. 2015].

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 259, de 20 de setembro de 2002. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem de alimentos embalados. Diário Oficial da União. [Online]. Disponível em: [http://www.valinhos.sp.gov.br/portal/arquivos/saude/visa/rotulagem/RDC\\_25902.htm](http://www.valinhos.sp.gov.br/portal/arquivos/saude/visa/rotulagem/RDC_25902.htm). [Acesso em: 05 mai. 2015].

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. Diário Oficial da União. [Online]. Disponível em: <http://www.rio.rj.gov.br/dlstatic/10112/5125403/4132349/RESOLUCAORDCN360DE23DEDEZEMBRODE2003.pdf>. [Acesso em: 05 mai. 2015].

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 9, de 17 de agosto de 2009. Dispõe sobre a relação de produtos permitidos para dispensação e comercialização em farmácias e drogarias. Brasília, DF, 2009; 3p. [Online]. Disponível em: [http://www.cff.org.br/userfiles/file/noticias/in9\\_170809.pdf](http://www.cff.org.br/userfiles/file/noticias/in9_170809.pdf). [Acesso em: 24 abr. 2016].

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Diretoria de Pesquisas. Coordenação de Trabalho e Rendimento. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009: aquisição alimentar domiciliar *per capita*. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE; 2010. 282 p. [2010a]. [Online]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/2e71fe0047eaefbf89c8cd9ba9e4feaf/pof-consumo-alimentar-no-brasil-2008-2009.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=2e71fe0047eaefbf89c8cd9ba9e4feaf>. [Acesso em 02 abr 2014].

BRASIL. Farmacopeia Brasileira, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2010. 546p. [2010b]. [Online]. Disponível em:

[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf). [Acesso em 02 abr 2014].

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise de Situação de Saúde. Plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis (DCNT) no Brasil 2011-2022. Brasília : Ministério da Saúde; 2011. 148 p. [Online]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano\\_acoes\\_enfrent\\_dcnt\\_2011.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_acoes_enfrent_dcnt_2011.pdf). [Acesso em 02 abr 2014].

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 1.161, de 31 de julho de 2012. Brasília, DF, 2012. [Online]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/prt1161\\_31\\_07\\_2012.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/prt1161_31_07_2012.html). [Acesso em: 07 ago. 2016].

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. Vigitel Brasil 2014 : vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância de Doenças e Agravos não Transmissíveis e Promoção da Saúde. – Brasília: Ministério da Saúde; 2015. [Online]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel\\_brasil\\_2014.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/vigitel_brasil_2014.pdf). [Acesso em: 03 jun 2016].

Budge SM, Iverson SJ, Bowen WD, Ackman RG. Among- and within-species variability in fatty acid signatures of marine fish and invertebrates on the Scotian Shelf, Georges Bank, and southern Gulf of St. Lawrence. *Can J Fish Aquat Sci.* 2002;59(5):886–98.

Burdge GC, Calder PC. Conversion of alpha-linolenic acid to longer-chain polyunsaturated fatty acids in human adults. *Reprod Nutr Dev.* 2005;45(5):581-97.

Camara MCC, Marinho CLC, Guilam MCR, Nodari RO. Transgênicos: avaliação da possível (in)segurança alimentar através da produção científica. *Hist Ciênc Saúde – Manguinhos.* 2009;16(3):669-81.

Cameron-Smith D, Albert BB, Cutfield WS. Fishing for answers: is oxidation of fish oil supplements a problem? *JNS.* 2015;4(e36):1-2.

Carvalho PO, Bastos DHM, Noffs MD, Pastore GM. Fatty Acid Composition of Commercial Fish Oil Capsules. *LECTA.* 2000;18(1):27-31.

Carvalho PB, Coelho WCA. Rotulagem de suplementos vitamínicos e minerais: uma revisão das normas federais. *Ciênc Saúde Coletiva.* 2008;13(3):407-16.

Chee KM, Gong JX, Rees DMG, Meydani M, Ausman L, Johnson J, et al. Fatty Acid Content of Marine Oil Capsules. *Lipids.* 1990;25(9):523-8.

Colas S, Germain E, Arab K, Maheo K, Goupille C, Bougnoux P.  $\alpha$ -Tocopherol Suppresses Mammary Tumor Sensitivity to Anthracyclines in Fish Oil–Fed Rats. *Nutr Cancer.* 2005;51(2):178–83.

Crowie TD, White PJ. Adaptation of the AOCS Official Method for Measuring Hydroperoxides from Small-Scale Oil Samples. *JAOCS*. 2001;78(12):1267-9.

Delarue J, Labarthe F, Cohen R. Fish-oil supplementation reduces stimulation of plasma glucose fluxes during exercise in untrained males. *Br J Nutr*. 2003;90(4):777-86.

Dyerberg J, Madsen P, Moller JM, Aardestrup I, Schmidt EB. Bioavailability of marine n-3 fatty acid formulations. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids*. 2010;83:137-41.

EFSA. European Food Safety Authority. EFSA Scientific Committee, 2015. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *EFSA Journal*. 2015;13(1):3982, 36 pp. [Online]. Disponível em: [www.efsa.europa.eu/efsajournal](http://www.efsa.europa.eu/efsajournal). [Acesso em: 07 ago. 2016].

Fantoni CM, Cuccio AP, Barrera-Arellano D. Brazilian Encapsulated Fish Oils: Oxidative Stability and Fatty Acid Composition. *JAOCS*. 1996;73(2):251-3.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. The production of fish meal and oil. *FAO Fisheries technical paper 142*. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma; 1986. [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/003/x6899e/x6899e00.htm>. [Acesso em: 21 fev. 2015].

FAO. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. In: Sixty-first meeting, Rome, 10–19 June 2003: summary and conclusions. Food and Agriculture Organization of the United Nations & World Health Organization; 2003. [Online]. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/jecfa/jecfa61sc.pdf>. [Acesso em: 16 mai 2016].

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Globefish. Fishmeal and fish oil - Analysis of 3rd quarter 2015; 2015. [Online]. Disponível em: <http://www.fao.org/in-action/globefish/market-reports/resource-detail/en/c/384232/>. [Acesso em: 07 jun 2016].

FDA. Food and Drug Administration HHS. Department of Health and Human Services. Substances Affirmed as Generally Recognized and Safe: Menhaden Oil. *Federal Register/Rules and Regulations*. 1997;62(108):30751-7. Washington: U.S. Government Printing Office; 1997. [Online]. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-rpt0354-058-Ref-F-FR-Rules-Regulations-1997-vol273.pdf>. [Acesso em: 04 abr. 2014].

FDA. U.S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. Office of Nutritional Products, Labeling, and Dietary Supplements. Letter Regarding Dietary Supplement Health Claim for Omega-3 Fatty Acids and Coronary Heart Disease, 2000. Washington: U.S. Government Printing Office; 2000. [Online]. Disponível em: <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/dockets/95s0316/95s-0316-Rpt0272-38-Appendix-D-Reference-F-FDA-vol205.pdf>. [Acesso em: 04 abr. 2016].

FDA. U.S. Food and Drug Administration, Code of Federal Regulations. Title 21— Food and Drugs, 2010 [Internet]. Washington: U.S. Government Printing Office; 2010. [Online]. Disponível em:

<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?fr=101.60>. [Acesso em: 04 nov. 2014].

Flachs P, Rossmeisl M, Kopecky J. The Effect of n-3 Fatty Acids on Glucose Homeostasis and Insulin Sensitivity. *Physiol. Res.* 2014;63(Suppl. 1):s93-s118.

Flock MR, Harris SW, Kris-Etherton PM. Long-chain omega-3 fatty acids: time to establish a dietary reference intake. *Nutr Rev.* 2013;71(10):692-707.

Foran SE, Flood JG, Lewandrowski KB. Measurement of Mercury Levels in Concentrated Over-the-Counter Fish Oil Preparations Is Fish Oil Healthier Than Fish? *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127(12):1603-5.

Frankel EN. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. *Food Chem.* 1996;57(1):51-5.

García-Hernández VM, Gallar M, Sánchez-Soriano J, Micol V, Roche E, García-García E. Effect of omega-3 dietary supplements with different oxidation levels in the lipidic profile of women: a randomized controlled trial. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;64(8):993–1000.

Ghasemifard S, Turchini GM, Sinclair AJ. Omega-3 long chain fatty acid “bioavailability”: A review of evidence and methodological considerations. *Prog Lipid Res.* 2014;56(1):92–108.

Gerster, H. Can adults adequately convert alpha-linolenic acid (18:3n-3) to eicosapentaenoic acid (20:5n-3) and docosahexaenoic acid (22:6n-3)? *Int J Vitam Nutr Res.* 1998;68(3):159-73.

GOED. Global Organization for EPA and DHA, GOED Voluntary Monograph (V.4), 2012. Version effective May 1; 2012. [Online]. Disponível em: [www.goedomega3.com](http://www.goedomega3.com). [Acesso em: 02 nov 2014].

Guillen MD, Cabo N. Fourier transform infrared spectra data versus peroxide and anisidine values to determine oxidative stability of edible oils. *Food Chem.* 2002;77(4):503–10.

Hajeb P, Jinap S, Shakibazadeh SH, Afsah-Heijri L, Mohebbi GH, Zaidul ISM. Optimisation of the supercritical extraction of toxic elements in fish oil. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2014;31(10):1712-22.

Hamilton K, Brooks P, Holmes M, Cunningham J, Russell FD. Evaluation of the composition of omega-3 fatty acids in dietary oil supplements. *Nutrition & Dietetics.* 2010;67(3):182–9.

Harris WS, Schacky CV. The Omega-3 Index: a new risk factor for death from coronary heart disease? *Prev Med.* 2004;39(1):212-20.

Hauber AB, Han S, Yang JC, Gantz I, Tunceli K, Gonzalez JM, et al. Effect of pill burden on dosing preferences, willingness to pay, and likely adherence among patients with type 2 diabetes. *Patient Prefer Adherence.* 2013;18(7):937-49.

Health Canada. Natural Health Product. Fish Oil; 2013.33p. [Online]. Disponível em: <http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhp/nd/bdipsn/monoReq.do?id=88>. [Acesso em: 03 abr 2016].

Hirashima K, Silva SA, Caruso MSF, Aued-Pimentel S. Encapsulated specialty oils commercialized in São Paulo state, Brazil: evaluation of identity (fatty acid profile) and compliance of fatty acids and Vitamin E contents with nutrition labeling. Food Sci. Technol. 2013;33(1):107-15.

Hsu KL, Fink JC, Ginsberg JS, Yoffe M, Zhan M, Fink W, et al. Self-reported Medication Adherence and Adverse Patient Safety Events in CKD. Am J Kidney Dis. 2015;66(4):621-9.

Ichihara K, Fukubayashi Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. J Lipid Res. 2010; 51(3):635-40.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de orçamentos Familiares 2008-2009: análise do consumo alimentar pessoal no Brasil. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2011. [acesso em: 23 abr 2016]. Disponível em: [http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/).

INCA. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. 124p.[Online]. Disponível em: [http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa\\_cancer\\_24042014.pdf](http://www.saude.sp.gov.br/resources/ses/perfil/gestor/homepage/outros-destaques/estimativa-de-incidencia-de-cancer-2014/estimativa_cancer_24042014.pdf). [Acesso em: 04 nov 2014].

ISO 5509. INTERNATIONAL STANDARD. ISO 5509:2000(E). Animal and vegetable fats and oils — Preparation of methyl esters of fatty acids. 2ª ed, 2000. [Online]. Disponível em: [www.iso-standards.com.au](http://www.iso-standards.com.au). [Acesso em: 09 ago 2016].

ISSFAL. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. Report of the Sub-Committee on Recommendations for Intake of Polyunsaturated Fatty Acids in Healthy Adults, 2004.[Online]. Disponível em: <http://www.issfal.org/statements/pufa-recommendations/statement-3>. [Acesso em: 13 nov 2015].

ISSFAL. International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids. ISSFAL Official Statement Number 5:  $\alpha$ -Linolenic Acid Supplementation and Conversion to n-3 Long Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Humans; 2009. [Online]. Disponível em: <http://www.issfal.org/statements/pufa-recommendations/statement-5>. [Acesso em: 22 fev 2015].

Ito MK. A Comparative Overview of Prescription Omega-3 Fatty Acid Products. P T. 2015;40(12):826-57.

Jackowski SA, Alvi AZ, Mirajkar A, Imani Z, Gamalevych Y, Shaikh NA, Jackowski G. Oxidation levels of North American over-the-counter n -3 (omega-3) supplements and the influence of supplement formulation and delivery form on evaluating oxidative safety. JNS. 2015;4(e30):1-10.

Kaya Y, Erdem M. Seasonal comparison of wild and farmed brown trout (*Salmo trutta forma fario* L., 1758). *Int J Food Sci.* 2009; 60(5):412–23.

Kleiner AC, Cladis DP, Santerre CR. A comparison of actual versus stated label amounts of EPA and DHA in commercial omega-3 dietary supplements in the United States. *J Sci Food Agric.* 2015;95(6):1260-7.

Kolanowski W, Jaworska D, Weißbrodt J. Importance of instrumental and sensory analysis in the assessment of oxidative deterioration of omega-3 LC PUFA-rich foods. *J Sci Food Agric.* 2007; 87(2):181–91.

Kolanowski W. Omega-3 LC pufa contents and oxidative stability of encapsulated fish oil dietary supplements. *Int J Food Prop.* 2010; 13(3):498–511.

Kris-etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish Consumption, Fish Oil, Omega-3 Fatty Acids, and Cardiovascular Disease. *Circulation.* 2002; 106(21):2747-57.

Kulkarni SP, Alexander KP, Lytle B, Heiss G, Peterson ED. Long-term adherence with cardiovascular drug regimens. *Am Heart J.* 2006;151(1):185-91.

Labrinea EP, Thomaidis NS, Giorgiou CA. Direct olive oil anisidine value determination by flow injection. *Analytica Chimica Acta.* 2001;448(1):201–6.

Landstrom E, Sidenvall B, Hursti UKK, Magnusson M. Health-care professionals' perceived trust in and willingness to recommend functional foods: A qualitative study. *Appetite.* 2007;48(2):241-7.

Lee KW, Lip GYH. The role of omega-3 fatty acids in the secondary prevention of cardiovascular disease. *Q J Med.* 2003;96(7):465–80.

Levine KE, Levine MA, Weber FX, Hu Y, Perlmutter J, Grohse PM. Determination of Mercury in an Assortment of Dietary Supplements Using an Inexpensive Combustion Atomic Absorption Spectrometry Technique. *J Autom Methods Manag Chem.* 2005;2005(4):211–216.

Lin W, Wu FW, Yue L, Du QG, Tian L, Wang ZX. Combination of Urea Complexation and Molecular Distillation to Purify DHA and EPA from Sardine Oil Ethyl Esters. *J Am Oil Chem Soc.* 2014;91(4):687–95.

Mahaffey KR, Sunderland EM, Chan HM, Choi AL, Grandjean P, Marien K, et al. Balancing the benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids and the risks of methylmercury exposure from fish consumption. *Nutr Rev.* 2011;69(9):493–508.

McManus A, Merga M, Newton W. Omega-3 fatty acids. What consumers need to know. *Appetite.* 2011;57(1):80-3.

Martín CA, Almeida VV, Ruiz MR, Visentainer JEL, Matshushita M, Souza NE, et al. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: importância e ocorrência em alimentos. *Rev Nutr.* 2006;19(6):761-70.

Mergler D, Anderson HA, Chan LHM, Mahaffey KR, Murray M, Sakamoto M, et al. Methylmercury Exposure and Health Effects in Humans: A Worldwide Concern. *AMBIO*. 2007;36(1):3-11.

Meyer BJ. Are we consuming enough long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids for optimal health? *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids*. 2011;85(5):275–80.

Moosheer SM, Waldschutz W, Itariu BK, Brath H, Stulnig TM. A protein-enriched low glycemic index diet with omega-3 polyunsaturated fatty acid supplementation exerts beneficial effects on metabolic control in type 2 diabetes. *Prim Care Diabetes*. 2014;8(4):308-14.

Moura JMLN, Gonçalves LAG, Grimaldi R, Soares MS, Ribeiro APB. Otimização das condições de produção de ésteres etílicos a partir de óleo de peixe com elevado teor de ácidos graxos  $\omega$ -3. *Quím Nova*. 2006;29(5):956-9.

Murgel MF, Braga AMCB, Tancredi RCP. Avaliação sobre o consumo e efeitos terapêuticos de cápsulas de óleo de peixe. *Hig alimentar*. 2013;27(3):78-82.

Neubronner J, Schuchardt JP, Kressel G, Merkel M, Von Schacky C, Hahn A. Enhanced increase of omega-3 index in response to long-term n-3 fatty acid supplementation from triacylglycerides versus ethyl esters. *Eur J Clin Nutr*. 2011;65(2):247-254.

Oliveira D, Oliveira JV, Faccio C, Menoncin S, Amroginski C. Influência das variáveis de processo na alcoólise enzimática de óleo de mamona. *Ciênc Tecnol Aliment*. 2004;24(2):178-82.

Opperman M, Benade S. Analysis of the omega-3 fatty acid content of South African fish oil supplements: a follow-up study. *Cardiovasc J Afr*. 2013;24(8):297-302.

Pacheco SGA. Estabilidade oxidativa de óleo de peixe encapsulado em diferentes tipos de embalagem em condição ambiente [dissertação de mestrado]. Piracicaba (BR): Universidade de São Paulo, 2005. 63f.

Panichev NA, Panicheva SE. Determination of total mercury in fish and sea products by direct thermal decomposition atomic absorption spectrometry. *Food Chem*. 2015;166(1):432-41.

Pescador R. Aspectos nutricionais dos lipídios no peixe: uma revisão da literatura [dissertação de mestrado]. Brasília (BR): Universidade de Brasília, 2006. 69f.

Pike IH, Jackson A. Fish oil: production and use now and in the future. *Lipid Technology*. 2010;22(3):59-61.

Plourde M, Cunnane SC. Extremely limited synthesis of long chain polyunsaturates in adults: implications for their dietary essentiality and use as supplements. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2007;32(4):619-634.

Ritter JCS, Budge SM, Jovica F. Quality analysis of commercial fish oil preparations. *J Sci Food Agric*. 2013;93(8):1935–9.

Robards KL, Kerr AF, Patsalides E. Rancidity and its measurement in edible oils and snack foods. A review. *Analyst*. 1988;113(2):213–24.

Roth EM, Harris WS. Fish Oil for Primary and Secondary Prevention of Coronary Heart Disease. *Curr Atheroscler Rep*. 2010;12(1):66–72.

Saad B, WanTW, BoeyPL, Saleh MI. Flow injection determination of peroxide value in edible oils using triiodide detector. *Anal Chim Acta*. 2006;565:261–70.

Saastamoinen LK, Verho J. Register-based indicators for potentially inappropriate medication in high-cost patients with excessive polypharmacy. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2015;24(6):610-8.

Santos RD, Gagliardi ACM, Xavier HT, et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. I Diretriz sobre o consumo de Gorduras e Saúde Cardiovascular. *Arq Bras Cardiol*. 2013;100(1):1-40.

Sartori AGO, Amancio RD. Pescado: importância nutricional e consumo no Brasil. *Segur Aliment Nutr*. 2012;19(2):83-93.

Schacky CV. Omega-3 Index and Cardiovascular Health. *Nutrients*. 2014;6(2):799-814.

Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *The Lancet*. 2011;377(9781):1949-61.

Schuchardt JP, Hahn A. Bioavailability of long-chain omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukot Essent Fatty Acids*. 2013;89(1):1-8.

Segura JG. Extração e caracterização de óleos de resíduos de peixes de água doce [dissertação de mestrado]. Pirassununga (BR): Universidade de São Paulo, 2012. 95f.

Shahidi F, Wanasundara U. Methods for measuring oxidative rancidity in fats and oils. In: Akoh CC, Min DB (eds.) *Food Lipids Chemistry, Nutrition, and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker; 2002. p.465-488.

Sheehan MC, Burke TA, Navas-Acien A, Breyse PN, McGready J, Fox MA. Global methylmercury exposure from seafood consumption and risk of developmental neurotoxicity: a systematic review. *Bull World Health Organ*. 2014;92(4):254–69.

Shim SM, Santerre CR, Burgess JR, Deardorff DC. Omega-3 Fatty Acids and Total Polychlorinated Biphenyls in 26 Dietary Supplements. *Food Chem Toxicol*. 2003;68(8):2436-40.

Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. Método para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Quím Nova*. 1999;22(1):94-103.

Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR. Amostragem, Padronização e Calibração. In: Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch SR (eds.) *Fundamentos de Química Analítica*. São Paulo: Editora Thomson; 2006. p.162-210.

Smith SC, Benjamin EJ, Bonow RO, Braun LT, Creager MA, Franklin BA, et al. AHA/ACCF secondary prevention and risk reduction therapy for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2011 Update: A guideline from the American Heart Association and American College of Cardiology Foundation. *Circulation*. 2011;124(22):2458–73.

Srigley CT, Rader JI. Content and Composition of Fatty Acids in Marine Oil Omega-3 Supplements. *J Agric Food Chem*. 2014;62(29):7268–78.

Stringheta PC, Oliveira TT, Gomes RC, Amaral MPH, Carvalho AF, Vilela MAP. Políticas de saúde e alegações de propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. *RBCF*. 2007;43(2):181-94.

Strong K, Mathers C, Leeder S, Beaglehole, R. Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet*. 2005(9496); 366:1578–82.

Tatarczyk T, Engl J, Ciardi C, Laimer M, Kaser S, Salzmann K et al. Analysis of long-chain  $\omega$ -3 fatty acid content in fish-oil supplements. *Wien Klin Wochenschr*. 2007;119(13–14):417–22.

Turner R, McLean CH, Silvers KM. Are the health benefits of fish oils limited by products of oxidation? *Nutr Res Rev*. 2006;19(1):53–62.

Tvrzická E, Vecka M, Stanková B, Zák A. Analysis of fatty acids in plasma lipoproteins by gas chromatography–flame ionization detection. Quantitative aspects. *Anal Chim Acta*. 2002;465(1-2):337-50.

USDA. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. What We Eat in America, NHANES 2009-2010, individuals 2 years and over (excluding breast-fed children), day 1 dietary intake data, weighted. Food Patterns Equivalents Database (FPED) 2009-2010. [Online]. Disponível em: [https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400530/pdf/fped/Table\\_1\\_FPED\\_GEN\\_0910.pdf](https://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place/80400530/pdf/fped/Table_1_FPED_GEN_0910.pdf). [Acesso em: 19 abr 2016].

USDA. United States Department of Agriculture. Agricultural Research Service. National Nutrient Database for Standard Reference Release 28. [Online]. Disponível em: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/nutrients/report?nutrient1=208&nutrient2=&nutrient3=&fq=&max=25&subset=0&offset=100&sort=f&totalCount=8490&measureby=m>. [Acesso em: 17 abr 2016].

US Council for Responsible Nutrition. Voluntary monograph: Omega-3 DHA; Omega-3 EPA; Omega-3 DHA & EPA; 2006. 6p. [Online]. Disponível em: <http://www.crnusa.org/pdfs/O3FINALMONOGRAPHdoc.pdf>. [Acesso em: 03 abr 2016].

Verzola FC. Transgênicos e Violações ao Direito de Informação: A Supremacia do EIA/RIMA e Audiência Pública. *REID*. 2011;4(11):98-108.

Vieira HC, Morgado F, Soares AMVM, Abreu SN. Fish consumption recommendations to conform to current advice in regard to mercury intake. *Environ Sci Pollut Res*. 2015;22(13):9595–602.

Wai WT, Saad B, Lim BP. Determination of TOTOX value in palm oleins using a FI-potentiometric analyzer. *Food Chem.* 2009;113(1):285-90.

Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, et al. N-3 fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not  $\alpha$ -linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and second-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2006; 84(1):5-17.

WHO. World Health Organization. Noncommunicable diseases country profiles 2014. Geneva: WHO; 2014. [Online]. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128038/1/9789241507509\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/128038/1/9789241507509_eng.pdf). [Acesso em: 03 abr 2016].

Xiong A, Yu W, Tiwary R, Sanders BG, Kline K. Distinct roles of different forms of vitamin E in DHA-induced apoptosis in triple-negative breast cancer cells. *Mol Nutr Food Res.* 2012;56(6):923–34.

Zargar A, Ito MK. Long Chain Omega-3 Dietary Supplements: A Review of the National Library of Medicine Herbal Supplement Database. *Metab Syndr Relat Disord.* 2011;9(4):255-71.

## APÊNDICE

Quadro 1. Check-list para verificação da adequação dos rótulos quanto à legislação.

Identificação do Produto:			
Quesitos analisados no rótulo do produto	C	NC	NA
1- A qualidade, a natureza e o tipo do alimento, observadas a definição, a descrição e a classificação estabelecida no respectivo padrão de identidade e qualidade... <sup>1</sup>			
2- Nome e/ou a marca do alimento. <sup>1</sup>			
3- Nome do fabricante ou produtor. <sup>1</sup>			
4- Sede da fábrica ou local de produção. <sup>1</sup>			
5- Número de registro do alimento no órgão competente do Ministério da Saúde. <sup>1,2</sup>			
6- Indicação do emprego de aditivo intencional, mencionando-o expressamente ou indicando o código de identificação correspondente com a especificação da classe a que pertencer. <sup>1</sup>			
7- O peso ou o volume líquido. <sup>1</sup>			
8- Todos os ingredientes devem constar em ordem decrescente da respectiva proporção. <sup>3</sup>			
9- A quantidade do valor energético e dos seguintes nutrientes: carboidratos, proteínas, gorduras totais, gorduras saturadas, gorduras trans, fibra alimentar, sódio. <sup>4</sup>			
10-A quantidade de qualquer outro nutriente sobre o qual se faça uma declaração de propriedades nutricionais ou outra declaração que faça referência a nutrientes. <sup>4*</sup>			
11-Quando for realizada uma declaração de propriedades nutricionais (informação nutricional complementar) sobre o tipo e ou a quantidade de gorduras e ou ácidos graxos e ou colesterol deve ser indicada a quantidade de gorduras saturadas, trans, monoinsaturadas, poli-insaturadas e colesterol, em conformidade com o estipulado no item 3.4.6. <sup>4*</sup>			
12-Valor energético: quilocalorias(kcal) e quilojoules(kJ) <sup>4</sup>			
13-As vitaminas e os minerais que constam no Anexo A, sempre e quando estiverem presentes em quantidade igual ou maior a 5% da Ingestão Diária Recomendada (IDR) por porção indicada no rótulo. <sup>4</sup>			
14-A tabela de informação nutricional deve conter os três tipos de gorduras: saturadas, monoinsaturadas e poli-insaturadas, discriminando abaixo das poli-insaturadas o conteúdo de ômega 3 (EPA e DHA). <sup>6*</sup>			
15-Advertência em destaque e em negrito: "Pessoas que			

apresentem doenças ou alterações fisiológicas, mulheres grávidas ou amamentando (nutrizes) deverão consultar o medico antes de usar o produto. <sup>6*</sup>			
16-Informação: O Ministério da Saúde adverte: Não existem evidências científicas comprovadas de que este alimento previna, trate ou cure doenças. <sup>5**</sup>			
17-Advertência em destaque e em negrito: “Pessoas alérgicas a peixes e crustáceos devem evitar o consumo deste produto”. <sup>5**</sup>			
18-Caso a empresa queira declarar na informação nutricional (perfil de ácido graxo para EPA, DHA e alfa-linolênico), pode fazê-lo desde que declare os três tipos de gordura, conforme item 3.4.6 da Resolução RDC nº 360/2003. <sup>5**</sup>			
19-Advertência: “Pessoas que apresentem doenças ou alterações fisiológicas, mulheres grávidas e lactantes devem consultar o medico antes de consumir este produto.” <sup>5**</sup>			

Abrev.: C, Conforme; NC, Não Conforme; NA, Não se Aplica; EPA, Ácido eicosapentenoico; DHA, Ácido docosaexenoico; RDC, Resolução da Diretoria Colegiada.

<sup>1</sup> Decreto-Lei nº 986/69 (BRASIL, 1969);

<sup>2</sup> RDC nº 19/1999 (BRASIL, 1999);

<sup>3</sup> RDC nº 259/2002 (BRASIL, 2002);

<sup>4</sup> RDC nº 360/2003 (BRASIL, 2003);

<sup>5</sup> Site da Anvisa: Assuntos de Interesse. Novos Alimentos e Novos Ingredientes (ANVISA, 2005).

<sup>6</sup> Site da Anvisa: Assuntos de Interesse. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde (ANVISA, 2016).

\*Itens 10, 11, 14 e 15 para alimentos com alegação de propriedade funcional.

\*\*Itens 16 a 19 para novos alimentos (sem alegação de propriedade funcional).