

Oil characterization of sardine by-products and effluents from a canning factory: nutritional importance

Caracterização do óleo dos subprodutos de sardinha e dos efluentes de uma fábrica de conservas: importância nutricional

Paulo Bispo¹ , Irineu Batista² , & Narcisa M. Bandarra^{2,3} 

Keywords: Sardine by-products, effluents, fatty acid profile, atherogenic index, thrombogenic index

Palavras-chave: Subprodutos sardinha, efluentes, perfil ácidos gordos, índice aterogénico, índice trombogénico

To Cite:

Bispo, P., Batista, I., & Bandarra, N. M. (2025) Oil characterization of sardine by-products and effluents from a canning factory: nutritional importance. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 22(1), 41-55.

 <https://doi.org/10.19277/bbr.22.1.352>

1 - Santarém Polytechnic University, School of Agriculture, Quinta do Galinheiro - S. Pedro, 2001-904 Santarém, Portugal

2 - IPMA, I.P. - Portuguese Institute for the Sea and Atmosphere, Division of Aquaculture and Upgrading (DivAV), Av. Doutor Alfredo Magalhães Ramalho 6, 1495-165 Lisboa, Portugal

3 - CIIMAR - Interdisciplinary Centre of Marine and Environmental Research, University of Porto, Terminal de Cruzeiros do Porto de Leixões, Av. General Norton de Matos S/N, 4450-208 Matosinhos, Portugal

Correspondence to / Correspondência a:
paulo.bispo@esa.ipsantarem.pt

Received / Recebido: 9/2/2025
Accepted / Aceite: 24/4/2025

Abstract

The oil present in both sardine by-products and effluents generated in canning factories is highly valued worldwide. Therefore, the aim of this study was to characterise by chromatographic methods (gas chromatography and HPLC) the lipid profile of sardine by-products, both oil released during sardine cooking and oil present in the factory effluent and oil extracted from these by-products by a 10 % saline solution. Fatty acid profile of oil from by-products and released during the cooking process showed high levels of EPA (about 14.7 %), DHA (ca. 13.0 %) and an average n-3/n-6 ratio of 11.8. In contrast, the oil collected in the factory effluent had the typical lipid profile of a vegetable oil with high level of oleic acid (42.98 %) and 21.76 % of linoleic acid. These results show that the oil from the by-products and that released during cooking were a good source of n-3 fatty acids. However, the high peroxide content (132 meq O₂ kg⁻¹) of the oil extracted by the saline solution indicated that sardine by-products should be properly preserved.

Resumo

O óleo presente nos subprodutos da sardinha e nos efluentes das fábricas de conservas é um produto altamente valorizado a nível mundial. Por conseguinte, o objectivo deste estudo foi caracterizar por métodos cromatográficos (cromatografia em fase gasosa e HPLC) o perfil lipídico destes subprodutos, do óleo libertado na cozedura da sardinha e o presente no efluente geral da fábrica e do extraído destes subprodutos por uma solução salina 10 %. O perfil de ácidos gordos do óleo dos subprodutos e libertado no processo de cozedura apresentava níveis elevados de EPA (cerca de 14,7 %), DHA (ca. 13,0 %) e um valor da razão n-3/n-6 de 11,8. Em contrapartida, o óleo do efluente geral tinha o perfil lipídico de um óleo vegetal com um alto teor de ácido oleico (42,98 %) e 21,76 % de ácido linoleico. Estes resultados mostram que o óleo dos subprodutos e libertado durante a cozedura eram uma boa fonte de ácidos gordos n-3. No entanto, o elevado índice de peróxidos (132 meq O₂ kg⁻¹) do óleo extraído pela solução salina indicava que os subprodutos da sardinha deveriam ser devidamente conservados.

Introduction

Global production of aquatic products (excluding algae) reached 185.4 million tons in 2022, of which 91 million tons came from catches in marine and inland waters, with the remainder from marine and inland waters aquaculture (1). Approximately 89 % of these catches were reported to be used for direct human consumption; the remaining amount was mainly used to produce fishmeal and fish oil (83 %). According to Hou *et al.* (2), more than 70 % of total production is further processed, which corresponds to about 78.6 % of fish for human consumption. Moreover, Coppola *et al.* (3) indicated that approximately 20-80 % of by-products are generated depending on the size, species, and type of processing. In Portugal, the total estimated amount of fish by-products was 57,340 tonnes in 2018 (4). The majority of these by-products (about 52 %) came from the canning industry, followed by the frozen fish (27 %) and fresh fish (15 %) sectors, with lower values from the dried salting cod industry (6 %) and withdrawals and rejections in the fish auctions (1 %). These by-products consist of muscle trimmings, skin, fins, bones, heads, viscera, and scales. Their chemical composition is similar to that of whole fish and viscera, as well as liver and roe, which are particularly rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs), vitamins A, D, and B12, and minerals. A significant proportion of these by-products are used in the production of food and non-food products. As also mentioned in the FAO report (1), 34.5 % of the world's fishmeal production and 53.4 % of total fish oil was obtained from by-products. A significant share of fish oil (74 %) is destined for aquaculture, while 16 % and 10 % are used for human consumption and other uses (including pet food and biofuel), respectively. The high demand for fish oil has led to an increase in its price. The value of fish oil on the world market reached 2.37 billion dollars in 2023, with a CAGR (Compound Annual Growth Rate) of 5.98 % forecast for the period 2024 to 2032 (5).

The sardine canning industry generates large amounts of by-products rich in oil as well as different effluents including waste water from brining/washing, fish drip and oil from pre-cooking, overflowed oil from can filling, washing of cans after seaming, and cooling water from retorts (6).

Introdução

A produção mundial de produtos aquáticos (excluindo algas) atingiu 185,4 milhões de toneladas em 2022, em que 91 milhões de toneladas provêm de capturas em águas marinhas e interiores e o restante provém da aquacultura marinha e também de água doce (1). Tal como referido neste relatório, cerca de 89 % destas capturas foram utilizadas para consumo humano direto. Por outro lado, de acordo com Hou *et al.* (2), mais de 70 % da produção total é processada, o que corresponde a cerca de 78,7 % do peixe destinado ao consumo humano. Além disso, Coppola *et al.* (3) referiram que no processamento são gerados cerca de 20 a 80 % de subprodutos, dependendo do tamanho, da espécie e do tipo de transformação. Em Portugal, a quantidade total estimada de subprodutos de peixe foi de 57 340 toneladas em 2018 (4). A maioria destes subprodutos (cerca de 52 %) provém da indústria conserveira, seguindo-se os sectores do peixe congelado (27 %) e do peixe fresco (15 %) e os restantes resultam da indústria do bacalhau salgado seco (6 %) e das retiradas e rejeições nas lotas (1 %). Estes subprodutos são constituídos por “aparas”, pele, barbatanas, espinhas, cabeças, vísceras e escamas. A composição química destes subprodutos é semelhante à do peixe inteiro e as vísceras, bem como o fígado e as ovas, são particularmente ricos em ácidos gordos polinsaturados (PUFA), vitaminas A, D e B12 e minerais. Uma parte significativa destes subprodutos é utilizada na produção de produtos alimentares e não alimentares. Ainda de acordo com o relatório da FAO (1), 34,5 % da produção mundial de farinha de peixe e 53,4 % do óleo de peixe total foram obtidos a partir de subprodutos. Uma grande parte (74 %) do óleo de peixe destina-se à aquacultura e 16 % e 10 % são utilizados para consumo humano e outras utilizações (que incluem alimentos para animais e biocombustível), respetivamente. A elevada procura de óleo de peixe levou a um aumento do seu preço e, em 2023, o valor do óleo de peixe no mercado mundial atingiu 2,37 mil milhões de dólares, com uma taxa de crescimento anual composta (CAGR) prevista de 5,98% para o período de 2024 a 2032 (5).

A indústria de conservas de sardinha gera grandes quantidades de subprodutos ricos em óleo, mas também diferentes efluentes, incluindo águas residuais da salmoura/lavagem, exsudados e óleo da pré-cozedura, óleo transbordado do enchimento das latas, lavagem das latas após a cravação, água de arrefecimento dos autoclaves (6).

Fish oil is primarily produced from whole fish or fish by-products in fishmeal factories, but its high commercial value and its composition in polyunsaturated fatty acids, in particular EPA (eicosapentaenoic acid, C20:5 n-3) and DHA (docosahexaenoic acid, C22:6 n-3), have led to the development of alternative extraction processes. Among these processes, the following types of extraction stand out: (i) enzymatic hydrolysis using exogenous proteases (7). This process allows oil to be obtained under mild conditions and the protein hydrolysates obtained exhibit various biological activities; the main disadvantages are low yields, high costs and relative difficulty in scaling up; (ii) supercritical fluid extraction (SFE), usually using carbon dioxide to extract oil from freeze-dried material. This process makes it possible to obtain high yields and high-quality oil, but it is a very expensive technology that requires complex equipment, operating at high pressures and with high energy consumption (8); (iii) microwave-assisted extraction (MAE) in which microwave energy is used to heat the solid material in contact with the solvents to extract the oil (9). This technique allows high extraction rates at lower temperatures than usual solvent extractions; high energy consumption and difficulty in scaling up are the main disadvantages of this process; and (iv) ultrasound-assisted extraction (UAE) in which ultrasound is used to break up the tissues by acoustic cavitation, allowing better extraction of the oil by the solvent. This technique reduces extraction time and solvent consumption, but requires high energy consumption and is difficult to scale up (10). These recent and innovative extraction technologies are more environmentally friendly and efficient than traditional processes (wet and dry fishmeal production). However, relatively simple and low-investment technologies, such as ensiling or extraction with saline, acidic, or alkaline solutions, make it possible to remove the lipid fraction from fish by-products. Thus, the aim of this work was to characterize the lipid profiles of the oils present in sardine by-products from the canning industry, extracted from these by-products with a 10% saline solution, present in the effluent released during the cooking of sardines, and occurring in the general effluent of the factory.

O óleo de peixe é maioritariamente produzido a partir de peixe inteiro ou de subprodutos de peixe nas fábricas de farinha de peixe, mas o seu elevado valor comercial e a sua composição em ácidos gordos polinsaturados, em particular EPA (ácido eicosapentaenoico, C20:5 n-3) e DHA (ácido docosahexaenoico, C22:6 n-3), levaram ao desenvolvimento de processos de extração alternativos. Entre estes processos, destacam-se os seguintes tipos de extração: (i) hidrólise enzimática usando proteases exógenas (7). Este processo permite obter óleo em condições suaves e os hidrolisados proteicos obtidos exibem várias atividades biológicas; as principais desvantagens são o baixo rendimento, custos elevados e relativa dificuldade de aumento de escala; (ii) extração com fluidos supercríticos (SFE), utilizando usualmente dióxido de carbono para extrair o óleo de material liofilizado. Este processo permite obter elevados rendimentos e óleo de alta qualidade, mas é uma tecnologia muito dispendiosa que exige equipamento complexo, operando a altas pressões e com elevado consumo de energia (8); (iii) extração assistida por micro-ondas (MAE) em que a energia das micro-ondas é usada para aquecer o material sólido em contacto com os solventes para extrair o óleo (9). Esta técnica permite elevadas taxas de extração a temperaturas mais baixas do que nas extrações usuais com solventes; o elevado consumo de energia e a dificuldade de aumento de escala são as principais desvantagens deste processo; e (iv) extração assistida por ultrassons (UAE) na qual são usados ultrassons para romper os tecidos por cavitação acústica, permitindo uma melhor extração do óleo pelo solvente. Esta técnica diminui o tempo de extração e o consumo de solvente, mas exige elevado consumo de energia e é difícil aumentar de escala (10). Estas tecnologias de extração recentes e inovadoras são mais ecológicas e eficientes do que os processos tradicionais (produção de farinha de peixe pelos métodos húmido e seco). No entanto, tecnologias relativamente simples e de baixo investimento, como a ensilagem ou a extração com soluções salinas, ácidas ou alcalinas, permitem remover a fração lipídica dos subprodutos de peixe. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os perfis lipídicos dos óleos presente nos subprodutos da sardinha provenientes da indústria conserveira, extraído destes subprodutos com uma solução salina 10%, presente no efluente libertado durante a cozedura da sardinha, e ocorrendo no efluente geral da fábrica.

Materials and Methods

Sardine by-products included 1) rejected sardine, viscera, heads, and tails; 2) effluent 1 (E1) released during sardine cooking and consisting of fish drip and fish oil; and 3) effluent 2 (E2), the wastewater collected at the end of the manufacturing process. Sardine by-products and effluents were collected from a fish canning facility located in Peniche (Portugal) in September 2019. By-products were transported in isothermic boxes and stored at -20°C until use. Effluents were transported in bottles and kept at refrigerated temperature ($7-10^{\circ}\text{C}$) for less than 24 hours. All reagents were of analytical grade.

Oil recovery from effluents

Sardine oil present in E1 was recovered after centrifugation in a refrigerated centrifuge (Kubota 6800, Tokyo, Japan) at 10,000 rpm (12,100xg) for 20 min. Effluent E2 was previously sieved (Retsch, 500 μm) to remove coarse material and the oil recovered by centrifugation as effluent E1. Both oil samples from effluents E1 and E2 were stored at -80°C until further analysis.

Oil extraction from by-products

Sardine oil from the by-products was recovered by saline water (10 % NaCl solution w/v) extraction. Sardine by-products were previously ground in a silent cutter (Hobart, Troy, Ohio, USA), and approximately 500 g of minced by-products were mixed with saline water in a 1:3 (w/v) ratio. The mixture was stirred in a laboratory stirrer (Heidolph.RZR50, Schwabach, Germany) at approximately 1000 rpm at room temperature for 20 minutes. After extraction, the mixture was heated in a water bath (Grant Y14, JE Zevenhuizen, The Netherlands) at 60°C for 30 minutes and centrifuged at 10,000 rpm (12,100xg) for 20 minutes to separate the oil fraction, which was recovered and stored at -80°C until further analysis. The yield obtained was calculated as a percentage of the oil extracted relative to the mass of by-products used.

Lipid content

The total lipid content of solid by-products was determined according to the Bligh and Dyer (11) method. One gram of sample was mixed with 9 ml of methanol:chloroform (2:1) mixture and homogenized in a mechanical homogenizer (Kinematica Polytron

Material e Métodos

Os subprodutos da sardinha utilizados neste trabalho incluíam 1) a sardinha rejeitada, vísceras, cabeças e caudas; 2) o efluente 1 (E1) libertado durante a cozedura da sardinha e constituído por água e óleo de peixe; 3) e o efluente 2 (E2) recolhido no final do processo de fabrico. Os subprodutos da sardinha e os efluentes foram recolhidos numa fábrica de conservas em Peniche (Portugal) em Setembro de 2019. Os subprodutos foram transportados em caixas isotérmicas e armazenados a -20°C até à sua utilização e os efluentes foram transportados em frascos e mantidos a $7-10^{\circ}\text{C}$ durante menos de 24 horas. Todos os reagentes eram de grau analítico.

Recuperação do óleo dos efluentes

O óleo de sardinha presente no E1 foi recuperado após centrifugação numa centrífuga refrigerada (Kubota 6800, Tóquio, Japão) a 10 000 rpm (12 100xg) durante 20 minutos. O efluente E2 foi previamente passado num crivo (Retsch, 500 μm) para remover material grosseiro e o óleo recuperado também por centrifugação tal como o efluente E1. O óleo dos efluentes E1 e E2 foram conservados a -80°C até serem analisados.

Extração de óleo de subprodutos

O óleo de sardinha dos subprodutos foi extraído com solução salina (solução de NaCl a 10 %, m/v). Os subprodutos de sardinha foram previamente moídos num cutter para processamento de carne (Hobart, Troy, Ohio, USA) e aproximadamente 500 g dos subprodutos moídos foram misturados com a solução salina numa proporção de 1:3 (m/v). A mistura foi agitada num equipamento laboratorial (Heidolph.RZR50, Germany) a cerca de 1000 rpm à temperatura ambiente durante 20 minutos. Após a extração, a mistura foi aquecida em banho-maria (Grant Y14, JE Zevenhuizen, The Netherlands) a 60°C durante 30 minutos e centrifugada a 10000 rpm (12 100xg) durante 20 minutos para separar a fração de óleo que foi recuperado e armazenado a -80°C até ser analisado. O rendimento obtido foi calculado como percentagem do óleo extraído em relação à massa de subprodutos utilizados.

Teor de lípidos

O teor total de lípidos dos subprodutos sólidos foi determinado de acordo com o método de Bligh e Dyer (11). Uma mistura de 1 g de amostra com 9 ml de uma mistura de metanol:clorofórmio (2:1) foi homogeneizada num agitador mecânico (Kinematica

PT 2500, Malters, Switzerland) for 1 minute. An additional 3 ml of distilled water and 3 ml of chloroform were added and (re)homogenized (1 minute). The mixture was centrifuged (Kubota) at 5000 rpm (6050xg) for 10 minutes. The organic phase was recovered and dried with anhydrous sodium sulphate. After removal of sodium sulphate by filtration, the solvent was removed with nitrogen flow and the amount of extracted oil weighed to calculate the oil percentage in the sample.

Fatty acid analyses

Fatty acid methyl esters (FAME) were analysed following the conditions published by Bandarra *et al.* (12). Briefly, the FAME preparation was conducted using 300 mg of lipids and 5 ml of an acetyl chloride/methanol mixture (1:19, v/v). The transesterification was conducted at 80 °C for 1 hour. The GC analyses were performed using a Varian CP-3800 (Walnut Creek, CA, USA) gas chromatograph equipped with an autosampler and fitted with a flame ionization detector at 250 °C. The separation was achieved using a DB-WAX polyethylene glycol capillary column (30 m length, 0.25 mm i.d., and 0.25 µm film thickness) from Hewlett Packard (Albertville, MN, USA). After holding at 180 °C for 5 minutes, the temperature was increased at a rate of 4 °C/min to 220 °C and then held at 220 °C for 25 minutes, with the injector at 250 °C. The split ratio was 100:1. The identification of the sample peaks was made by comparison of the retention times with appropriate standards (Sigma). The fatty acid profile was obtained by calculating the relative area percent of the chromatographic peaks.

The Atherogenic Index (AI) and Thrombogenic Index (TI) were calculated according to the equations:

$$AI = \frac{[12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0 + 18:0]}{(\Sigma MUFA_s + \Sigma PUFA_{sn-6} + \Sigma PUFA_{sn-3})} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$TI = \frac{(14:0 + 16:0 + 18:0)}{[(0.5 \times \Sigma MUFA_s) + (0.5 \times \Sigma PUFA_{sn-6}) + (3 \times \Sigma PUFA_{sn-3}) + (\Sigma PUFA_{sn-3} / \Sigma PUFA_{sn-6})]} \quad (\text{Eq. 2})$$

Where MUFA_s are monounsaturated fatty acids.

Polytron PT 2500, Malters, Switzerland) durante 1 minutos. A seguir, adicionaram-se 3 ml de água destilada e 3 ml de clorofórmio e homogeneizou-se novamente (1 minuto). A mistura foi centrifugada numa centrífuga Kubota a 5000 rpm (6050xg) durante 10 minutos. A fase orgânica foi recuperada e seca com sulfato de sódio anidro. Depois de eliminação do sulfato de sódio por filtração, o solvente foi evaporado com uma corrente de azoto e a quantidade de óleo extraído foi pesada para calcular a percentagem de óleo na amostra.

Análise dos ácidos gordos

Os ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foram preparados de acordo com as condições referidas por Bandarra *et al.* (12). Resumidamente, a preparação de FAME foi efectuada utilizando 300 mg de lípidos e 5 ml da mistura cloreto de acetilo/metanol (1:19, v/v). A transesterificação foi efectuada a 80 °C durante 1 h. As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo de fase gasosa Varian CP-3800 (Walnut Creek, CA, EUA) equipado com um amostrador automático e um detetor de ionização de chama a 250 °C. A separação foi efectuada numa coluna capilar de polietilenoglicol DB-WAX (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e película com 0,25 µm de espessura da Hewlett Packard (Albertville, MN, EUA). A temperatura do injetor foi de 250 °C e na coluna a temperatura inicial de 180 °C foi mantida durante 5 minutos após o que foi aumentando com uma taxa de 4 °C/min até atingir 220 °C a qual foi mantida durante 25 minutos até ao final. A razão de 'split' foi de 100:1. A identificação dos picos das amostras foi efectuada por comparação dos tempos de retenção com os padrões da Sigma. O perfil de ácidos gordos foi obtido através do cálculo da percentagem da área relativa dos picos cromatográficos.

O Índice Aterogénico (IA) e o Índice Trombogénico (IT) foram calculados de acordo com as equações:

$$IA = \frac{[12:0 + (4 \times 14:0) + 16:0 + 18:0]}{(\Sigma MUFA_s + \Sigma PUFA_{sn-6} + \Sigma PUFA_{sn-3})} \quad (\text{Eq. 1})$$

$$IT = \frac{(14:0 + 16:0 + 18:0)}{[(0.5 \times \Sigma MUFA_s) + (0.5 \times \Sigma PUFA_{sn-6}) + (3 \times \Sigma PUFA_{sn-3}) + (\Sigma PUFA_{sn-3} / \Sigma PUFA_{sn-6})]} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que MUFA significa ácidos gordos monoinsaturados (*monounsaturated fatty acids*).

Lipid classes

Approximately 100 mg of oil were diluted in a hexane/ether ethylic mixture (1:1) and separated in a silica column (Isolute Ltd) previously conditioned with 5 ml of this mixture. The non-polar fraction was separated with 40 ml of the hexane/ether ethylic mixture (1:1), while the polar fraction was initially recovered with 20 ml of methanol and finally with 20 ml of a chloroform/methanol/water mixture (3:5:2). The polar fraction was characterized by high pressure liquid chromatography (HPLC) according Bandarra *et al.* (13). Briefly, samples were injected into a HPLC system (Jasco model PU-980, Boston, USA) equipped with a Jasco model AS-950-10 automatic injector. Analysis was performed using a cyanopropyl column (100 x 3.2 mm i.d.) with Spherisorb S3CN (3 µm) coupled to a 5 µm YMC PVA-Sil column (25 x 4.6 mm i.d.). The concentration of polar lipids used was 50 µg/20 µl. Polar lipids were identified by comparison with retention times of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine standards (Sigma/Aldrich). The peaks were integrated using Borwin software (Jasco).

Free fatty acid content

Free fatty acids (FFA) content in the oil was determined volumetrically by titrating the sample with a standardized solution of potassium hydroxide (0.1 N) in the presence of phenolphthalein indicator, following the method described in AOCS official method Ca5a-40 (14). The amount of KOH needed was used to calculate the FFA content, expressed as a percentage of oleic acid, and calculated by the following equation: $FFA = 28.2 \times V_{tit} \text{ (ml)} \times \text{KOH normality/oil (g)}$.

Peroxide value (PV)

The determination of the peroxide value was made according to the procedure described by Bandarra *et al.* (15). Thus, between 0.3 and 0.8 g of oil were weighed and dissolved in 10 ml of chloroform and 15 ml of glacial acetic acid, after which 1 ml of saturated potassium iodide solution was added. The mixture was stirred for 1 minute, then left to rest for 5 minutes in the dark, after which 75 ml of distilled water and 2 ml of 1 % starch cooking solution (as an indicator) were added. The titration was made with 0.01 N sodium thiosulfate. The PV was expressed as meq O₂/kg oil and calculated by the following equation: $\text{Peroxide index} = 10 \times V_{tit} \text{ (ml)} / \text{Oil (g)}$.

Classes de lípidos

Cerca de 100 mg de óleo foram diluídos numa mistura de hexano/éter etílico (1:1) e separados numa coluna de sílica (Isolute Ltd) previamente condicionada com 5 ml desta mistura. A fração não polar foi separada com 40 ml da mistura hexano/éter etílico (1:1), enquanto a fração polar foi inicialmente recuperada com 20 ml de metanol e finalmente com 20 ml da mistura clorofórmio/metanol/água (3:5:2). A fração polar foi caracterizada por cromatografia líquida de alta pressão (HPLC), de acordo com Bandarra *et al.* (13). Resumidamente, as amostras foram injectadas num sistema de HPLC (Jasco modelo PU-980, Boston, USA) equipado com um injetor automático Jasco modelo AS-950-10. A análise foi efectuada utilizando uma coluna de cianopropil (100 x 3,2 mm d.i.) com Spherisorb S3CN (3 µm) acoplada a uma coluna YMC PVA-Sil de 5 µm (25 x 4,6 mm d.i.). A concentração de lípidos polares utilizada foi de 50 µg/20 µl. Os lípidos polares foram identificados por comparação com os tempos de retenção de padrões de fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina da Sigma/Aldrich. Os picos foram integrados utilizando o software Borwin (Jasco).

Teor de ácidos gordos livres

O teor de ácidos gordos livres (AGL) no óleo foi determinado volumetricamente por titulação da amostra com uma solução padronizada de hidróxido de potássio (0,1 N) na presença de fenolftaleína, de acordo com o método descrito no método oficial AOCS Ca5a-40 (14). A quantidade de KOH necessária foi utilizada para calcular o teor de AGL, expresso em percentagem de ácido oleico, e calculado pela seguinte equação: $AGL = 28,2 \times V_{tit} \times \text{normalidade KOH/óleo (g)}$.

Índice de peróxidos (PV)

A determinação do índice de peróxidos foi efectuada de acordo com o procedimento descrito por Bandarra *et al.* (15). Assim, pesaram-se entre 0,3 e 0,8 g de óleo e solubilizaram-se em 10 ml de clorofórmio e 15 ml de ácido acético glacial, adicionando-se de seguida 1 ml de solução saturada de iodeto de potássio. Agitou-se durante 1 minuto e deixou-se repousar durante 5 minutos no escuro. Em seguida, adicionaram-se 75 ml de água destilada e 2 ml de solução de cozedura de amido a 1 % como indicador. A titulação foi efectuada com tiosulfato de sódio 0,01 N. O PV foi expresso em meq O₂/kg de óleo e calculado pela seguinte equação: $\text{Índice de peróxido} = 10 \times V_{tit} \text{ (ml)} / \text{Óleo (g)}$.

Statistical analysis

Two-way ANOVA was used to evaluate significant differences in the fatty acid profiles of different oil samples. Post-hoc Tukey HSD tests were conducted for multiple comparisons when significant differences were found at a significance level of 0.05. All statistical analyses were performed using STATISTICA™ software (Version 7.0, StatSoft Inc., USA).

Results

Sardine by-products used in the present work had a fat content of 12.3 %. The fatty acids profile of these lipids is shown in Table 1, as well as the profile of lipids extracted from these by-products by the saline solution and recovered from effluents E1 and E2. The oil recovered from the E1 effluent had a light yellowish colour typical of fish oil and similar to that of oil extracted by the saline solution. In contrast, oil from the E2 effluent had a dark colour and a very unpleasant smell as a result of the presence of bacterial degradation compounds. Table 1 also presents the n-3/n-6 and polyunsaturated fatty acids /saturated fatty acids (PUFA/SFA) ratios, atherogenic and thrombogenic indexes of these lipids, and their free fatty acid and peroxide index values. For dietary prevention of ischemic heart disease, a PUFA/SFA ratio higher than 0.4 is recommended (16). Trace levels of lauric acid (C12:0) were found in all the oil samples. AI represents the relationship between hypercholesterolemic acids (saturated fatty acids favouring the adhesion of lipids to cells of the immunological and circulatory systems) and protective fatty acids (unsaturated inhibiting the aggregation of plaque, preventing the appearance of micro- and macro-coronary disease), with an AI lower than 0.5 being recommended regarding human health (17). TI was defined as the ratio of pro-thrombogenic (saturated) and anti-thrombogenic (unsaturated) fatty acids, indicating the tendency to form clots in blood vessels. A TI value lower than 1.0 is recommended (18).

Table 2 shows the lipid class composition of sardine by-products. The presence of polar lipids – mainly phospholipids – in fish oils represents a disadvantage,

Análise estatística

Para avaliar diferenças significativas no perfil de ácidos gordos das diferentes amostras de óleo, foi efectuada uma análise de variância (ANOVA). Foram efectuados testes post-hoc Tukey HSD para comparações múltiplas quando foram encontradas diferenças significativas a um nível de significância de 0,05. Todas as análises estatísticas foram efectuadas com o software STATISTICA™ (Versão 7.0, StatSoft Inc., EUA).

Resultados

Os subprodutos de sardinha utilizados no presente trabalho tinham um teor de gordura de 12,3 % e o perfil de ácidos gordos destes lípidos é apresentado na Tabela 1. Esta tabela apresenta também o perfil dos lípidos extraídos destes subprodutos pela solução salina e recuperados dos efluentes E1 e E2. O óleo recuperado do efluente E1 apresentava uma cor amarelada típica do óleo de peixe e idêntica à do óleo extraído pela solução salina. Em contrapartida, a cor do óleo do efluente E2 era muito escura e tinha um cheiro muito desagradável devido à presença de compostos de degradação bacteriana. A Tabela 1 apresenta igualmente os rácios n-3/n-6 e ácidos gordos polinsaturados/ácidos gordos saturados (PUFA/SFA), os índices aterogénico e trombogénico destes lípidos e os teores de ácidos gordos livres e de índice de peróxidos. Para a prevenção dietética da doença cardíaca isquémica, recomenda-se uma relação PUFA/SFA superior a 0,4 (16). O nível de ácido láurico (C12:0) era vestigial em todas as amostras de óleo. O IA representa a relação entre os ácidos gordos hipercolesterolémicos (ácidos gordos saturados, favorecendo a adesão de lípidos às células dos sistemas imunológico e circulatório) e os ácidos gordos protectores (insaturados, inibindo a agregação das plaquetas, prevenindo o aparecimento de micro- e macro doenças coronárias), tendo sido recomendado um IA inferior a 0,5 no que diz respeito à saúde humana (17). O IT foi definido como a razão entre os ácidos gordos pró-trombogénicos (saturados) e antitrombogénicos (insaturados), indicando a tendência para formar coágulos nos vasos sanguíneos. Foi recomendado um valor de IT inferior a 1,0 (18).

A Tabela 2 mostra a composição das classes lipídicas dos subprodutos da sardinha. A presença de lípidos polares - principalmente fosfolípidos - nos óleos de

Table 1 - Fatty acid profile, FFA content and PV of sardine by-products lipids (SBL) and lipid effluents.**Tabela 1** - Perfil de ácidos gordos, teor de AGL e PV dos lípidos dos subprodutos da sardinha (LSS) e dos efluentes lipídicos.

Fatty acids / Ácidos gordos (%)	SBL / LSS	Saline solution / Solução salina	E1	E2
C14:0	7.71 ± 0.39 ^a	7.07 ± 0.35 ^a	7.62 ± 0.10 ^a	1.45 ± 0.11 ^b
C16:0	19.68 ± 0.37 ^a	16.95 ± 0.56 ^b	16.56 ± 0.21 ^b	10.41 ± 0.59 ^c
C18:0	3.69 ± 0.08 ^a	3.38 ± 0.04 ^b	3.36 ± 0.10 ^b	2.80 ± 0.05 ^c
Other / outros SFAs*	3.0	2.71	2.77	0.65
ΣSFAs	34.08 ^a	30.11 ^b	30.31 ^b	15.31 ^c
C16:1	8.53 ± 0.23 ^a	8.09 ± 0.32 ^a	8.58 ± 0.13 ^a	2.73 ± 0.08 ^b
C18:1	11.33 ± 0.69 ^b	10.78 ± 0.16 ^b	11.83 ± 0.15 ^b	42.98 ± 0.27 ^a
C20:1	2.48 ± 0.42 ^b	2.84 ± 0.07 ^b	3.99 ± 0.01 ^a	1.06 ± 0.07 ^c
C22:1	1.64 ± 0.42 ^b	2.30 ± 0.17 ^b	3.78 ± 0.35 ^a	0.65 ± 0.06 ^c
Other / outros MUFAs**	1.1	1.0	1.2	0.4
ΣMUFAs	25.09 ^c	25.04 ^c	29.34 ^b	47.79 ^a
C18:2n-6	1.20 ± 0.06 ^b	1.24 ± 0.03 ^b	1.16 ± 0.01 ^b	21.76 ± 0.03 ^a
C18:3n-3	0.91 ± 0.01 ^c	1.08 ± 0.02 ^b	0.91 ± 0.04 ^c	3.04 ± 0.02 ^a
C18:4n-3	2.86 ± 0.02 ^a	3.03 ± 0.10 ^a	2.92 ± 0.09 ^a	0.72 ± 0.05 ^b
C20:5n-3	13.58 ± 0.46 ^c	14.89 ± 0.13 ^b	15.67 ± 0.16 ^a	3.69 ± 0.24 ^d
C22:5n-3	1.91 ± 0.67 ^a	2.18 ± 0.46 ^a	1.69 ± 0.06 ^{bc}	0.80 ± 0.09 ^c
C22:6n-3	13.21 ± 0.36 ^{ab}	14.80 ± 0.98 ^a	11.15 ± 0.39 ^b	4.36 ± 0.34 ^c
Other / outros PUFAs***	5.2	5.7	5.4	1.3
ΣPUFAs	38.82 ^b	42.94 ^a	38.91 ^b	35.72 ^c
Σn6	3.19	3.31	2.88	22.04
Σn3	35.33	39.33	35.7	13.66
n-3/n-6	11.1	11.9	12.4	0.6
PUFA/SFA ratio / razão	1.14	1.42	1.28	2.33
AI	0.85	0.72	0.74	0.23
TI	0.24	0.20	0.20	0.19
FFA (%)	n.d.	n.d.	1.85	14.67
PV (meq O ₂ /kg)	n.d.	132	8.02	4.6

Mean values in the same line with the same superscript letters were not significantly different ($p > 0.05$).

* Ciso 14:0, C15:0, C17:0, C19:0, C20:0; ** C17:1; *** C16:2n-4, C16:3n-3, C16:4n-3, C18:3n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:3n-3, C20:4n-3, C21:5n-3, C22:5n-6; AI - Atherogenic Index; TI - Thrombogenic Index; n. d. – not determined /

Valores médios na mesma linha e com as mesmas letras não eram significativamente diferentes ($p > 0,05$)

* Ciso 14:0, C15:0, C17:0, C19:0, C20:0; ** C17:1; *** C16:2n-4, C16:3n-3, C16:4n-3, C18:3n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C20:3n-3, C20:4n-3, C21:5n-3, C22:5n-6; IA - Índice Aterogénico; IT - Índice Trombogénico; n. d. – não determinado

Table 2 - Percentage of non polar and polar lipids present in the oil extracted by the B&D method.

Tabela 2 - Percentagem de lípidos não polares e polares presentes no óleo extraído pelo método B&D.

Lipid classes / Classes de lípidos	%
Non polar lipids / Lípidos não polares	89.1
Polar lipids / Lípidos polares	10.9
PC (Phosphatidylcholine / Fosfatidilcolina)	87.8
PE (Phosphatidylethanolamine / Fosfatidiletanolamina)	5.3
Others / outros	6.9

as they must be removed in the usual oil refining processes. Phospholipids may combine with metals present in the oil (19) and contribute to its oxidative instability (20,21). Furthermore, phospholipids present in fish oil, even in small amounts, can affect the action of lipases in biocatalysis reactions (22).

Discussion

The level of lipid content of sardine by-products was in the variation range (1.2-18.4 %) of this constituent in sardine muscle reported by Bandarrra *et al.* (12). A simple technology for the oil extraction similar to that commonly used in the production of surimi was tested. This extraction process was assayed as a first step for obtaining good quality oil under mild conditions, with a remaining defatted material to be further processed. However, the total lipids extracted by the saline solution were only 2 %, which represented about 16 % of total lipids obtained by the B&D (Bligh and Dyer) method. Chakraborty & Joseph (23) compared various methods for extracting lipids from Indian oil sardine (*Sardinella longiceps*) muscle, including the B&D method, distilled water extraction, and cooking/pressing. These authors obtained a percentage of lipids extracted with distilled water of 2.68 %, *i.e.*, approximately 31.5 % of total lipids. This significant difference between the results reported by these authors and those obtained in the current study indicates that the lipids present in the Indian oil sardine muscle are more easily released than those found in the viscera and liver of sardine by-products. In the case of sardine muscle, similar (unpublished) results were previously obtained in the IPMA laboratories, using extraction with a saline solution.

peixe representa uma desvantagem porque têm de ser removidos nos processos habituais de refinação do óleo. Os fosfolípidos podem combinar-se com metais presentes no óleo (19) e contribuir para a instabilidade oxidativa do óleo (20,21). Além disso, os fosfolípidos presentes no óleo de peixe, embora em pequenas quantidades, podem afetar a ação das lipases nas reacções de biocatálise (22).

Discussão

O teor de lípidos dos subprodutos da sardinha (LSS) situava-se na gama de variação (1,2-18,4 %) deste constituinte no músculo da sardinha, tal como referido por Bandarrra *et al.* (12). Foi testada uma tecnologia simples para a extração de óleo semelhante à habitualmente utilizada na produção de surimi. Este processo de extração foi ensaiado como um primeiro passo para obter óleo de boa qualidade em condições suaves e o restante material desengordurado para posterior processamento. No entanto, o total de lípidos extraídos pela solução salina foi de apenas 2 %, o que representou cerca de 16 % do total de lípidos obtidos pelo método B&D (Bligh e Dyer). Chakraborty & Joseph (23) compararam vários métodos de extração de lípidos do músculo da sardinela-da-Índia (*Sardinella longiceps*) que incluíram o método B&D, a extração com água destilada e a cozedura/prensagem. Estes autores obtiveram uma percentagem de lípidos extraídos com água destilada de 2,68 %, ou seja, aproximadamente 31,5 % dos lípidos totais. Esta grande diferença entre os resultados indicados por estes autores e os obtidos no presente estudo indica que os lípidos presentes no músculo da sardinela-da-Índia são mais facilmente libertados do que os encontrados nas vísceras e no fígado dos subprodutos da sardinha. Aliás, no caso do músculo da sardinha foram previamente obtidos, nos laboratórios do IPMA, resultados (não publicados) semelhantes, usando a extração com uma solução salina.

As shown in Table 1, the fatty acid profile of sardine by-products, lipids extracted by the saline solution and also present in E1 effluent had the same order of abundance of the three fatty acid groups (PUFAs>SFAs>MUFAs). However, there are some differences in their fatty acid profiles, which may be related to the origin of lipids and the extraction method. Thus, the sardine by-products lipids (SBL) had higher levels (34.08 %) of SFAs ($p<0.05$) than saline extraction (30.11 %) and E1 (30.31 %). lipids. Among SFAs, SBL were also richer in palmitic (C16:0) and stearic (C18:0) acids, 19.68 and 3.69 %, respectively, than lipids from the saline extraction method and E1 lipids. Regarding MUFAs, SBL and lipids extracted by the saline solution had similar percentages but lower ($p<0.05$) than E1 lipids. Oleic acid (C18:1) was the main MUFA in the sardine by-products and in the oil released during cooking, and no significant differences on its content were recorded among them, although the E2 oil contained 42.98 %. Saline extraction lipids were the richest in PUFAs and also in DHA (C22:6 n-3) ($p<0.05$) whereas E1 lipids showed the highest percentage of EPA (C20:5 n-3). The high level of EPA in E1 lipids may be related to its presence in the storage sardine lipids which are more easily released during cooking. On the contrary, the lowest level of DHA in E1 lipids can be explained because it is a structural fatty acid, present in the cell membrane phospholipids that are more retained during heating treatment.

The fatty acid profile of sardine by-products had higher levels of SFAs and MUFAs and lower levels of PUFAs than those previously reported by Bandarra *et al.* (18) for sardine caught in different seasons. These authors reported the following ranges of the three fatty acid groups: 25.61-28.80 % SFA; 18.17-24.74 % MUFAs; and 39.82-50.17 % PUFAs. These differences are related to variations in the fatty acid profile that are highly dependent on exogenous conditions. Daidji & Lamri-Senhadjji (24) also determined the fatty acid profile of sardine (*Sardina pilchardus*) by-products. They reported a slightly lower MUFA content (23.3 %) and practically the same level of SFAs (34.9 %), but higher levels of PUFAs (41.9 %), EPA (14.3 %) and DHA (13.6 %) than the oil present in the sardine by-products collected at the Portuguese factory.

Como se pode verificar na Tabela 1, o perfil de ácidos gordos dos subprodutos da sardinha, dos lípidos extraídos pela solução salina e também dos lípidos presentes no efluente E1 apresentaram a mesma ordem de abundância dos três grupos de ácidos gordos (PUFA>SFA>MUFA). No entanto, registaram-se algumas diferenças nos seus perfis de ácidos gordos que podem estar relacionadas com a origem dos lípidos e o método de extração. Assim, os lípidos dos subprodutos da sardinha (LSS) apresentaram níveis mais elevados (34,08 %) de SFA ($p<0,05$) do que os lípidos da extração com a solução salina (30,11 %) e do efluente E1 (30,31 %). Os SFA dos LSS eram também mais ricos em ácidos palmítico (C16:0) e esteárico (C18:0), 19,68 e 3,69 %, respetivamente, do que os lípidos obtidos pelo método de extração com a solução salina e os lípidos do efluente E1. Em relação aos MUFA, os LSS e os lípidos extraídos pela solução salina apresentaram percentagens semelhantes, mas inferiores ($p<0,05$) às dos lípidos do efluente E1. O ácido oleico (C18:1) foi o principal MUFA nos LSS e no óleo libertado durante a cozedura, não se registando diferenças significativas entre eles, mas atingiu 42,98 % no óleo do efluente E2. Os lípidos da extração com a solução salina foram os mais ricos em PUFA e também em DHA (C22:6 n-3) ($p<0,05$), enquanto os lípidos do efluente E1 apresentaram a percentagem mais elevada de EPA (C20:5 n-3). O elevado nível de EPA nos lípidos do efluente E1 pode estar relacionado com a sua presença nos lípidos de armazenagem da sardinha, que são mais facilmente libertados durante a cozedura. Pelo contrário, o nível mais baixo de DHA nos lípidos deste efluente pode ser explicado por se tratar de um ácido gordo estrutural, presente nos fosfolípidos da membrana celular, sendo mais retido durante o tratamento térmico.

Os LSS apresentavam níveis mais elevados de SFA e MUFA e mais baixos de PUFA do que os anteriormente referidos por Bandarra *et al.* (18) para a sardinha capturada em diferentes estações do ano. Estes autores obtiveram os seguintes valores para os três grupos de ácidos gordos: 25,61-28,80 % de SFA; 18,17-24,74 % de MUFA; e 39,82-50,17 % de PUFA. Estas diferenças estão relacionadas com variações no perfil de ácidos gordos que são altamente dependentes de condições exógenas. Daidji & Lamri-Senhadjji (24) também determinaram o perfil de ácidos gordos dos LSS (*Sardina pilchardus*). Estes autores apresentaram um teor ligeiramente inferior de MUFA (23,3 %) e praticamente o mesmo nível de SFA (34,9 %), mas eram mais ricos em PUFA (41,9 %), EPA (14,3 %) e DHA (13,6 %) do que o óleo presente nos LSS recolhidos na fábrica portuguesa.

Lipids extracted from Indian oil sardine by the above-mentioned methods also presented significantly different fatty acid profiles (23). Thus, the decreasing order of abundance of the three groups of fatty acids in the lipids extracted by the B&D method was PUFAs>SFAs>MUFAs, however, for lipids obtained by the distilled water and cooking/pressing methods, the order was SFAs>MUFAs>PUFAs. Concerning PUFAs, the highest percentage of this group (30.78 %) was obtained in the lipids extracted by the B&D method followed by cooking/pressing (26.48 %) and distilled water (21.30 %) extraction, which differs from those achieved in the current study. In the case of EPA, the highest level of this fatty acid (17.10 %) was recorded in the B&D method, whereas in current study, the oil released during cooking was the richest in EPA. In the case of DHA, the highest percentage of this fatty acid (4.22 %) was recorded in the lipids from the B&D method, while in the current work, lipids from the saline solution extraction were the richest in this fatty acid.

Oil recovered from effluent E2 had a somewhat different fatty acid profile than that from sardine by-products and E1 lipids. It is first worth highlighting the order of abundance of the three groups of fatty acids - MUFAs>PUFAs>SFAs. Oleic acid was the main fatty acid, followed by linoleic acid (C18:2 n-6), accounting for 42.98 and 21.76 %, respectively. The high levels of these two acids are typical of vegetable oils used as covering oil for canned fish. On the contrary, EPA and DHA levels were very low compared with those of sardine oil.

The very high n-3/n-6 ratio of by-products and oil in E1 should also be highlighted. The intake of n-3 PUFA, in particular EPA and DHA, has been associated with the prevention of cardiovascular diseases, and DHA is fundamental in the development of the newborn neurological system. In addition, n-3 PUFA and their metabolites seem to suppress angiogenic and inflammatory factors, and, on the other hand, n-6 PUFA and their derived metabolites show pro-inflammatory activity and stimulate angiogenesis and tumour progression (25,26). In comparison, the oil of E2 had a low n-3/n-6 ratio. Oil extracted by the saline solution and present in E1 effluent had a PUFA/SFA ratio much higher than 0.4 and TI index lower than 1.0, but exceeded the recommended AI value (0.5). E2 oil presented good indices (PUFA/SFA ratio > 0.4, AI < 0.5, and TI < 1.0), but it was inedible.

Os lípidos extraídos da sardinela-da-Índia pelos métodos acima mencionados, tinham também diferenças significativas (23). Assim, os lípidos desta espécie da Índia extraídos pelo método de B&D apresentava a seguinte ordem decrescente de abundância dos três grupos de ácidos gordos: PUFA>SFA>MUFA. Porém, nos lípidos obtidos pelos outros métodos (água destilada e cozedura/prensagem) a ordem foi SFA>MUFA>PUFA. No que diz respeito aos PUFA, a maior percentagem deste grupo (30,78 %) foi obtida nos lípidos extraídos pelo método B&D, seguido da cozedura/prensagem (26,48 %) e da extração com água destilada (21,30 %), o que foi bastante diferente do obtido no presente estudo. No caso do EPA, o nível mais elevado deste ácido gordo (17,10 %) foi registado no método B&D, enquanto no presente estudo, o óleo libertado durante a cozedura foi o mais rico em EPA. Relativamente ao DHA, a percentagem mais elevada deste ácido gordo (4,22 %) foi registada nos lípidos provenientes do método B&D, enquanto no presente trabalho os lípidos provenientes da extração com a solução salina foram os mais ricos neste ácido gordo.

O perfil de ácidos gordos do óleo recuperado do efluente E2 era bastante diferente dos lípidos dos subprodutos da sardinha e do efluente E1. Em primeiro lugar, é de salientar a ordem de abundância dos três grupos de ácidos gordos - MUFA>PUFA>SFA. O ácido oleico (C18:1 n-9) era o principal ácido gordo, seguido do ácido linoleico (C18:2 n-6), que representavam 42,98 e 21,76 %, respetivamente. Os níveis elevados destes dois ácidos são típicos dos óleos vegetais utilizados como óleo de cobertura nas conservas de peixe. Pelo contrário, os níveis de EPA e DHA eram muito baixos em comparação com os do óleo de sardinha.

É de salientar a razão n-3/n-6 muito elevada dos LSS e do óleo do efluente E1. A ingestão de PUFA n-3, em particular EPA e DHA, tem sido associada à prevenção de doenças cardiovasculares e o DHA é fundamental no desenvolvimento do sistema neurológico dos recém-nascidos. Além disso, os PUFA n-3 e os seus metabolitos parecem eliminar os factores angiogénicos e inflamatórios e, por outro lado, os PUFA n-6 e os metabolitos derivados apresentam actividade pro-inflamatória e estimulam a angiogénese e a progressão de tumores (25,26). Em comparação, o óleo do efluente E2 tinha uma relação n-3/n-6 baixa. O óleo extraído pela solução salina e presente no E1 tinha uma relação PUFA/SFA muito acima de 0,4 e índice trombogénico (IT) era inferior a 1,0, mas excedia o valor recomendado de IA (0,5). O óleo do E2 apresentava bons índices (relação PUFA/SFA > 0,4, IA < 0,5 e IT < 1,0), mas não tinha grau alimentar.

According to FAO & WHO (27), the quality parameters of fish oils for human consumption should comply with: acid value ≤ 3 mg KOH/g oil and PV ≤ 5 meq O_2 /kg oil. As shown in Table 1, the FFA content of the oil from effluent E1 (1.85 %) or its acid value of 3.68 mg KOH/g oil was close to the reference value, but the PV value of this oil was slightly above its reference value. These results reflected the quality of sardine oil. In general, the cooking process does not affect the level of FFA and may decrease the PV because peroxides are heat-labile. Conversely, oil extracted by the saline solution had very high PV as a result of the rapid oxidation of lipid by-products. These by-products are stored at room temperature and sometimes for a few days before being transported to fishmeal factories. However, it should be noted that this crude oil must be refined and purified to meet the quality criteria for edible oils. In a previous study, Batista *et al.* (28) obtained oil from sardine by-products with lower PV (between 45 and 68 meq O_2 /kg oil), however, the quality of the starting raw material used in that study differed from that used in the current study. On the other hand, oil from effluent E2 had low PV but very high FFA content, perhaps due to the presence of lipolytic bacteria. The quality of oil present in the by-products and particularly in E2 gives clear evidence of the importance of their adequate preservation as well as good hygiene requirements for food processing factories.

Non-polar lipids (mainly triacylglycerols) represented approximately 89% of total sardine by-products lipids (Table 2). This value was relatively lower than that (96 %) reported by Bandarra *et al.* (18) for sardine muscle with 18.4 % fat, which may be due to the lipid distribution in different structures (muscle, viscera, liver, and by-products). On the other hand, the percentages of phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) were similar to those reported by the previous authors.

De acordo com FAO & WHO (27), os parâmetros de qualidade dos óleos de peixe destinados ao consumo humano devem ser os seguintes: índice acidez ≤ 3 mg KOH/g óleo e PV ≤ 5 meq O_2 /kg óleo. Como indicado na Tabela 1, O teor de AGL do óleo do efluente E1 (1,85 %) ou 3,368 mg KOH/g de óleo era próximo do valor de referência, mas o valor de PV estava um pouco acima do respetivo valor de referência. Estes resultados refletiam basicamente a qualidade do óleo de sardinha. Em geral, o processo de cozedura não afecta o nível de AGL e pode diminuir o PV porque os peróxidos são lábeis ao calor. Por outro lado, o óleo extraído pela solução salina tem um PV elevado devido à rápida oxidação dos lípidos dos subprodutos. Estes subprodutos são armazenados à temperatura ambiente e por vezes durante alguns dias antes de serem transportados para as fábricas de farinha de peixe. No entanto, deve ter-se em conta que se trata de óleo bruto que deve ser refinado e purificado para obedecer aos critérios de qualidade de óleos edíveis. Num estudo anterior, Batista *et al.* (28) obtiveram óleo, também a partir de LSS, com menor PV (entre 45 e 68 meq O_2 /kg de óleo), mas a diferença deveu-se basicamente à qualidade da matéria-prima inicial utilizada nesse estudo. Por outro lado, o óleo do efluente E2 tinha um baixo PV, mas um teor muito elevado de AGL, talvez devido à presença de bactérias lipolíticas. A qualidade do óleo presente nos subprodutos e, particularmente no E2, evidencia a importância da sua adequada preservação e também os requisitos de higiene para as fábricas de processamento de produtos alimentares.

Os lípidos não polares (constituídos principalmente por triacilgliceróis) representaram cerca de 89% dos lípidos totais dos subprodutos de sardinha (Tabela 2). Este valor foi relativamente mais baixo do que o indicado por Bandarra *et al.* (18) que obtiveram 96 % no caso dos lípidos do músculo de sardinha com 18,4% de gordura, o que pode ser devido às diferentes estruturas em que os lípidos estão distribuídos no músculo e nas vísceras e fígado dos subprodutos. Por outro lado, as percentagens de fosfatidilcolina (PC) e fosfatidiletanolamina (PE) foram semelhantes às referidas pelos autores anteriores.

Conclusions

The results obtained in the current study indicate that the oil present in sardine by-products was rich in n-3 PUFA, with an average n-3/n-6 ratio of 11.8. The oil collected after cooking the sardine was also rich in n-3 PUFA and had a low content of free fatty acids (1.85 %) and peroxides (8.02 meq O₂/kg).

The yield obtained from the extraction with the saline solution was low, but it was a relatively simple process that made it possible to obtain oil rich in n-3 PUFA. The solid residue obtained after extraction can be converted into fishmeal or used in the production of fish protein hydrolysates. Moreover, the extracted oil had high level of peroxides, which indicates that sardine by-products should be properly preserved to limit lipid oxidation.

The oil present in the factory's effluent was mostly oleic acid and was of poor quality (high levels of free fatty acids). Its use as biofuel would therefore be recommended.

These results highlight the nutritional importance of the lipid fraction of sardine by-products as well as the utmost importance of their proper storage in order to guarantee the quality of the products obtained from both the lipidic and proteic fractions. Freezing sardine by-products in vertical plate freezers, followed by cold storage, could be a suitable method of preservation, despite the associated costs.

Authors Contributions Statement

Experimental work and manuscript writing, P.B. and I.B.; conceptualization and revision of the manuscript, I.B. and N.B.

Funding

This work was supported by FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia) under the project PTDC/SAUNUT/30455/2017.

Conclusões

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que o óleo presente nos subprodutos da sardinha era rico em PUFA n-3, com uma razão média n-3/n-6 de 11,8. O óleo recolhido após a cozedura da sardinha era também rico em PUFA n-3 e apresentava um baixo teor de ácidos gordos livres (1,85 %) e peróxidos (8.02 meq O₂/kg).

O rendimento obtido na extração com a solução salina foi baixo, mas trata-se de um processo relativamente simples que permite obter um óleo rico em PUFA n-3. O resíduo sólido obtido após a extração, pode ser convertido em farinha de peixe, ou utilizado na produção de hidrolisados proteicos de peixe. Além disso, o óleo apresentava um elevado nível de peróxidos, indicando que os subprodutos da sardinha deviam ser devidamente conservados para limitar a oxidação lipídica.

O óleo presente nos efluentes da fábrica (E2) era constituído principalmente por ácido oleico e apresentava má qualidade (níveis elevados de ácidos gordos livres). A sua utilização como biocombustível seria, por conseguinte, recomendada.

Estes resultados evidenciam a importância nutricional da fração lipídica dos subprodutos da sardinha e também a extrema importância do seu armazenamento para garantir a qualidade dos produtos obtidos tanto da fração lipídica como da proteica. A congelação dos subprodutos da sardinha em congeladores de placas verticais e a armazenagem em congelado poderia ser um processo adequado para a sua conservação pese embora os custos associados.

Declaração sobre as contribuições do autor

Realização do trabalho experimental e escrita do manuscrito, P.B. e I.B.; Concepção e revisão do trabalho, I.B e N.B.

Financiamento

Este trabalho foi financiado pela FCT (Fundação para a Ciência e a Tecnologia) no âmbito do projeto PTDC/SAUNUT/30455/2017.

Acknowledgements

The authors are indebted to colleague Carla Pires who performed the statistical analysis of the data.

Conflict of Interests

The authors declare no conflict of interests.

Agradecimentos

Os autores agradecem à colega Carla Pires que efectuou a análise estatística dos dados.

Conflito de Interesses

Os autores não têm conflitos de interesses.

References / Referências

1. FAO (2024). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2024 – Blue Transformation in action*. Rome. <https://doi.org/10.4060/cd0683en>
2. Hou, Y., Shavandi, A., Carne, A., Bekhit, A.A., Ng, T.B., Cheung, R. C.F. & Bekhit, A.E.A. (2016). Marine shells: Potential opportunities for extraction of functional and health-promoting materials. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 46 (11–12), 1047–1116. <https://doi.org/10.1080/10643389.2016.1202669>
3. Coppola, D., Lauritano, C., Palma Esposito, F., Riccio, G., Rizzo, C., & de Pascale, D. (2021). Fish Waste: From Problem to Valuable Resource. *Marine drugs*, 19(2), 116. <https://doi.org/10.3390/md19020116>
4. Interreg Atlantic Area. Seafood Age Project (2020). Evaluation of biomasses to be used to produce ingredients for RTE in Portugal. Retrieved 17 September 2024. <https://seafoodage.eu/wp-content/uploads/2020/10/Deliverable-4-Portugal.pdf>
5. Straits Research (2024). Fish oil market. In: Straits Research. Retrieved 17 September 2024. <https://straitresearch.com/report/fish-oil-market>
6. Bratt, L. (2013). Technical guide to fish canning. GLOBEFISH Research Programme, Vol. III. Rome, FAO. 69 p.
7. Vázquez, J. A., Fraguas, J., Mirón, J., Valcárcel, J., Pérez-Martín, R.I. & Antelo, L.T. (2020). Valorisation of fish discards assisted by enzymatic hydrolysis and microbial bioconversion: Lab and pilot plant studies and preliminary sustainability evaluation. *Journal of Cleaner Production*, 246, 119027. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.119027>
8. Melgosa, R., Sanz, M.T. & Beltrán, S. (2021). Supercritical CO₂ processing of omega-3 polyunsaturated fatty acids – Towards a biorefinery for fish waste valorization. *Journal of Supercritical Fluids*, 169, 105121. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2020.105121>
9. De la Fuente, B., Pinela, J., Mandim, F., Heleno, S.A., Ferreira, I.C.F.R., Barba, F.J., Berrada, H., Caleja, C. & Barros, L. (2022). Nutritional and bioactive oils from salmon (*Salmo salar*) side streams obtained by Soxhlet and optimized microwave-assisted extraction. *Food Chemistry*, 386, 132778. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132778>
10. Çavdar, H.K., Bilgin, H., Fadilöglu, S. & Yilmaz, F.M. (2023). Ultrasound- and microwave-assisted extractions facilitate oil recovery from gilthead seabream (*Sparus aurata*) by-products and enhance fish oil quality parameters. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 125, 2200089. <https://doi.org/10.1002/ejlt.202200089>
11. Bligh, E.G. & Dyer, W.J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian journal of biochemistry and physiology*, 37(8), 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
12. Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L., Empis J.M.A., & Christie, W.W. (1997). Seasonal changes in lipid composition of sardine, *Sardina pilchardus*. *Journal of Food Science*, 62(1): 40–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1997.tb04364.x>
13. Bandarra, N.M., Batista, I., Nunes, M.L. & Empis, J.M. (2001). Seasonal variation in the chemical composition of horse-mackerel (*Trachurus trachurus*). *European Food Research and Technology*, 212, 535–539. <https://doi.org/10.1007/s002170100299>
14. AOCS (American Oil Chemists' Society). (2005). Method Ca5a-40, free fatty acid. Official methods and recommended practices by the American Oil Chemists' Society. Champaign, IL (USA)
15. Bandarra, N.M., Campos, R.M., Batista, I., Nunes, M.L., & Empis, J.M. (1999). Antioxidant synergy of α-tocopherol and phospholipids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(8), 905–913. <https://doi.org/10.1007/s11746-999-0105-4>
16. Goluch, Z., Rybaczky, A., Poławska, E. & Haraf, G. (2023). Fatty acid profile and lipid quality indexes of the meat and backfat from porkers supplemented with EM Bokashi Probiotic. *Animals*, 13, 3298. <https://doi.org/10.3390/ani1320329>
17. Ulbricht, T.L.V. & Southgate, D.A.T. (1991). Coronary heart disease: seven dietary factors. *Lancet*, 338, 985–992. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(91\)91846-M](https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91846-M)
18. Fernandes, C.E., Vasconcelos, M.A.D.S., De Almeida Ribeiro, M., Sarubbo, L.A., Andrade, S. A. C. & Filho, A. B. D. M. (2014). Nutritional and lipid profiles in marine fish species from Brazil. *Food Chemistry*, 160, 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.03.055>
19. Young, F.V.K. (1986). The refining and hydrogenation of fish oil. *Fish Oil Bulletin* No. 17, 27 p. International Association of Fish Meal Manufacturers, St. Alban's, Hertfordshire, United Kingdom
20. Takahashi, K., Ichioka, K., Htano, M. & Zama, K. (1985). Seasonal variation of sardine (*Sardinops melanosticta*) muscle lipids and other components. *Bulletin of Fisheries Sciences, Hokkaido University*, 36, 248–257. [https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/23895/1/36\(4\)_P248-257.pdf](https://eprints.lib.hokudai.ac.jp/dspace/bitstream/2115/23895/1/36(4)_P248-257.pdf)
21. Han, T.-J. & Liston, J. (1987). Lipid peroxidation and phospholipid hydrolysis in fish muscle microsomes and frozen fish. *Journal of Food Science*, 52(2), 294–296, 299. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1987.tb06596.x>
22. Wang, Y. & Gordon, M.H. (1991). Effect of phospholipids on enzyme-catalyzed transesterification of oils. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 68(8), 588–590. <https://doi.org/10.1007/BF02660158>
23. Chakraborty, K. & Joseph, D. (2015). Cooking and pressing is an effective and eco-friendly technique for obtaining high quality oil from *Sardinella longiceps*. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117, 837–850. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201400539>
24. Daidji, N.B.B. & Lamri-Senhadj, M. (2021). Hepatoprotective and anti-obesity properties of sardine by-product oil in rats fed a high-fat diet. *Preventive nutrition and food science*, 26(3), 285–295. <https://doi.org/10.3746/pnf.2021.26.3.285>
25. von Schacky, C. & Harris, W.S. (2007). Cardiovascular benefits of omega-3 fatty acids. *Cardiovascular Research*, 73(2): 310–315. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.08.019>
26. Liput, K.P., Lepczynski, A., Ogłuszka, M., Nawrocka, A., Poławska, E., Grzesiak, A., Slaska B., Pareek, C. S., Czarnik, U. & Pierzchała, M. (2021). Effects of dietary n–3 and n–6 polyunsaturated fatty acids in inflammation and cancerogenesis. *International journal of molecular sciences*, 22(13), 6965. <https://doi.org/10.3390/ijms22136965>
27. FAO & WHO (2017). Standard for fish oils. Codex Alimentarius Code of Practice, No. CXS 329-2017. Codex Alimentarius Commission. Rome
28. Batista, I., Ramos, C., Mendonça, R. & Nunes, M.L. (2009). Enzymatic hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) by-products and lipid recovery. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 18: 120–134. <https://doi.org/10.1080/10498850802581823>