



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS
INSATURADOS PROVENIENTES DE TAINHA (*Mugil liza*) COMO
TRANSPORTADORES DE CAROTENOIDES**

Juana Maria Huisa Martínez

Prof. Dr. Carlos Prentice-Hernández
Orientador

Profa. Dra. Cristiana Lima Dora
Co-orientadora

Rio Grande, RS

2016

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS**

**NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO ÁCIDOS GRAXOS
INSATURADOS PROVENIENTES DE TAINHA (*Mugil liza*) COMO
TRANSPORTADORES DE CAROTENOIDES**

JUANA MARIA HUISA MARTINEZ

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos

PROF. DR. CARLOS PRENTICE-HERNÁNDEZ
Orientador

PROFA. DRA. CRISTIANA LIMA DORA
Co-orientadora

Rio Grande, RS

2016

*A minha mãe Maríá,
A meus filhos Adriana e Vladi
Ao meu marido Vladimir
meus grandes amores
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador professor Dr. Carlos Prentice Hernández,
pelos conhecimentos e pelo grande apoio para o desenvolvimento desta pesquisa.

À minha co-orientadora professora Dra. Cristiana Lima Dora,
pelo grande apoio, pelos conhecimentos transmitidos e pelo acompanhamento constante na
pesquisa.

À professora Myriam de las Mercedes Salas-Mellado pelo grande apoio e pelos
conhecimentos transmitidos para o desenvolvimento de meu mestrado.

À professora Dra. Vilásia Guimarães Martins e à professora Dra. Valéria Terra Crexi pelas
contribuições a minha dissertação e pelos conhecimentos transmitidos.

A Gabriela Hädrich pelo grande apoio, pelo acompanhamento constante e conhecimentos
transmitidos para o desenvolvimento desta pesquisa

A Michele Morais e a Sabine Aquino pelo apoio constante ao longo deste trabalho

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Tecnologia de Alimentos, que me
acompanharam e auxiliaram na execução deste trabalho, em especial a Sibeles, Juliana, Tais,
Claudio, Douglas, Inajara, Janise, Michele e Daiane.

A Vanessa e a Jennifer de Laboratório de Operações Unitárias pela grande ajuda que deram e
auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

A Luana e ao Guilherme pela grande ajuda no trabalho da pesquisa.

A Maristela, Adriano, e Bruna que ajudaram na realização de algumas análises deste trabalho.

Ao meu grande amor Vladimir e aos meus filhos Adriana e Vladi,
manifesto a minha gratidão especial pelo imenso amor e apoio ao longo de esta grande
mudança em nossas vidas.

Ao Laboratório de Nanotecnologia Aplicada a Saúde/CEME-SUL, Centro de Microscopia
Eletrônica do Sul (CEME-SUL), Laboratório de Operações Unitárias, Laboratório de
Microbiologia e Bioquímica, e Laboratório Ciências de Alimentos, pela infraestrutura e
equipamentos que fizeram possível a realização da pesquisa.

A Brasil, a todos as pessoas que foram sempre tão amáveis, com toda solidariedade e vontade
de ajudar a gente.

À CAPES e à OEA pela grande oportunidade.

Muito Obrigada!

**Os verdadeiros milagres acontecem,
quando você decide mudar de atitude,
...quando você assume o compromisso.**

LISTA TABELAS

Tabela 1 - Composição química da carne de pescados diversos.	27
Tabela 2 - Composição do óleo de tainha segundo estudos realizados no Brasil	28
Tabela 3 - Nomenclatura dos principais ácidos graxos	32
Tabela 4 – Variáveis do planejamento fatorial 2 ² para estudo dos efeitos de tempo e temperatura na hidrólise proteolítica de tainha	46
Tabela 5 – Matriz do Planejamento fatorial	47
Tabela 6 - Composição das formulações dos nanocarreadores lipídicos desenvolvidos.	52
Tabela 7 - Composição química proximal de tainha	61
Tabela 8 – Grau de hidrólise e Rendimento em óleo do Planejamento experimental de hidrólise proteolítica de tainha.	62
Tabela 9 - Coeficiente de regressão para o grau de hidrólise proteolítica de tainha	62
Tabela 10 - ANOVA para o Grau de Hidrolise proteolítica de tainha	63
Tabela 11 - Valores experimentais e valores estimados de grau de hidrólise proteolítica de tainha.	64
Tabela 12 - Coeficiente de regressão para o Rendimento de hidrólise proteolítica de tainha..	64
Tabela 13. ANOVA para o Rendimento de hidrolise proteolítica de tainha.	65
Tabela 14 - Valores experimentais e valores estimados de % Rendimento de hidrolise proteolítica de tainha	65
Tabela 15 - Caracterização do óleo obtido com os diferentes tratamentos de hidrólise proteolítica de tainha.	67
Tabela 16 - Tratamento selecionado para hidrólise com Alcalase	67
Tabela 17 - Caracterização de óleo de tainha	68
Tabela 18 - % de hidrolise lipídica em relação ao tempo apresentado pelas duas enzimas em três diferentes concentrações (0,25; 0,50 e 0,75%).....	71
Tabela 19 - Perfil de ácidos graxos para o óleo refinado de tainha e para o óleo concentrado em ácidos graxos insaturados	73
Tabela 20 - Caraterísticas físico-químicas dos nanocarreadores lipídicos de concentrados de ácidos graxos insaturados de tainha e astaxantina	75
Tabela 21 - Caraterísticas físico-químicas dos nanocarreadores lipídicos de concentrados de ácidos graxos insaturados de tainha com inclusão de ácido oleico e astaxantina	76
Tabela 22- Índice de Peroxido (meq.Kg-1) das Nanocarreadores de Astaxantina	77

Tabela 23 - Resultados obtidos após análise de regressão linear dos dados da curva de calibração para análise de espectrofotometria UV/Vis de Astaxantina	79
Tabela 24 - Estabilidade da Nanoemulsões com astaxantina.....	83
Tabela 25 - Estabilidade dos Carreadores lipídicos nanoestruturados com astaxantina	84
Tabela A-1 - Perfil de ácidos graxos de óleo refinado de tainha e óleo hidrolisado com lipases a diferentes concentrações.	101
Tabela A-2 - Formulações de nanocarreadores lipídicos contendo concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha com o sem astaxantina testadas com diferentes tipos e concentrações de surfactantes lipídeos.....	102

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tainha (<i>Mugil liza</i>)	26
Figura 2 - Hidrólise dos triglicerídeos catalisados pela Lipase	34
Figura 3 - Formação de cristais de ureia com e sem a presença de ácidos graxos de cadeia longa.....	35
Figura 4. Componentes dos nanocarreadores lipídicos	38
Figura 5 - Estrutura comparativa entre nanoemulsão (NE) e carreador lipídico nanoestruturado (CLN).....	39
Figura 6 – Fluxograma geral do desenvolvimento do trabalho experimental	44
Figura 7- Fluxograma de separação de óleo por hidrólise proteolítica	45
Figura 8- Reator utilizado para a separação de óleo de tainha por hidrólise proteolítica.	46
Figura 9 - Fluxograma de refino de óleo de tainha	48
Figura 10 – Refino de óleo de tainha na etapa de degomagem.	49
Figura 11- Hidrólise enzimática do óleo refinado de tainha	50
Figura 12- – Fluxograma da Complexação com ureia.....	51
Figura 13 - Fluxograma de obtenção de nanocarreadores lipídicos contendo astaxantina	53
Figura 14 - Diagrama de Pareto para o grau de hidrólise proteolítica de tainha.....	63
Figura 15 - Diagrama de Pareto para o Rendimento na hidrólise proteolítica de tainha.	64
Figura 16 - Cinética de hidrólise proteolítica com Alcalase de tainha a pH 8,0 a diferentes temperaturas.....	66
Figura 17 - Cinética de reação para hidrólise lipídica de lipase de <i>Cândida antártica</i> (Lyp) .	69
Figura 18 - Cinética de reação para hidrólise lipídica de lipase de <i>Cândida rugosa</i> (AMA) ..	70
Figura 19 – Concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT)	71
Figura 20 - Incremento de conteúdo de Ácidos graxos insaturados presentes no óleo concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT)	72
Figura 21. A: Nanocarreadores instáveis. B: Nanocarreadores estáveis, depois de 1 semana de produção	74
Figura 22- Nanocarreadores lipídicos: Nanoemulsões com astaxantina (A) e carreadores lipídicos nanoestruturados com astaxantina (B).	76
Figura 23 - Curva de calibração da astaxantina obtida por espectrofotometria UV/Vis, utilizando-se o comprimento de onda de 476 nm	80
Figura 24 - Calorimetria diferencial de varredura dos carreadores lipídicos contendo óleo concentrado com ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT).	81

Figura 25 - Calorimetria diferencial de varredura dos carreadores lipídicos com e sem astaxantina.....	82
Figura 26 - Nanoemulsão com astaxantina em tempo zero (A). Nanoemulsão com astaxantina em tempo 60 dias (B)	83
Figura 27 – A: Carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina no tempo zero. B: Carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina no tempo 60 dias	84

SUMÁRIO

LISTA TABELAS.....	11
LISTA DE FIGURAS	13
RESUMO	17
ABSTRACT	18
1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL	23
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 IMPORTÂNCIA DO PESCADO	25
3.2 TAINHA (<i>Mugil liza</i>).....	25
3.3 ÓLEO DE PESCADO.....	27
3.4 PROTEASES	29
3.5 LIPASES.....	30
3.6 SEPARAÇÃO DO ÓLEO DE PESCADO POR HIDRÓLISE PROTEOLÍTICA ..	30
3.7 ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS	31
3.8 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS PELA HIDRÓLISE LIPÍDICA	33
3.9 COMPLEXAÇÃO COM UREIA	35
3.10 ASTAXANTINA.....	36
3.11 NANOTECNOLOGIA	37
3.11.1 Nanocarreadores lipídicos	38
3.11.2 Aplicação dos nanocarreadores na área de alimentos	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	43
4.1 MATERIAL	43
4.1.1 Matéria prima	43
4.1.2 Infraestrutura	43
4.1.3 Enzimas e Reagentes.....	43
4.2 MÉTODOS	43
4.3 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE ACIDOS GRAXOS INSATURADOS DE TAINHA (CAGIT)	44
4.3.1 Beneficiamento do pescado	45
4.3.2 Separação de óleo de pescado por hidrólise proteolítica.	45
4.3.3 Refino do óleo de tainha.....	47
4.3.4 Hidrólise enzimática do óleo de tainha.	49
4.3.5 Complexação com ureia	50
4.4 OBTENÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPIDICOS CONTENDO ASTAXANTINA.....	52
4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA.....	53
4.5.1 Caracterização da tainha.....	53
4.5.2 Grau de hidrolise.....	54
4.5.3 Porcentagem de óleo hidrolisado	54
4.5.4 Caracterização do óleo de pescado.....	55
4.5.5 Determinação do perfil de ácidos graxos das amostras.	55
4.5.6 Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão dos nanocarreadores lipídicos.....	56
4.5.7 Avaliação do potencial zeta	57

4.5.8	Determinação do teor de astaxantina nos nanocarreadores lipídicos.	57
4.5.9	Determinação de calorimetria exploratória diferencial	58
4.6	TRATAMENTO DOS DADOS.....	58
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	61
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA MATERIA PRIMA.....	61
5.2	SEPARAÇÃO DE ÓLEO DE PESCADO POR HIDRÓLISE PROTEOLÍTICA... 61	
5.3	REFINO DO ÓLEO BRUTO DE TAINHA.....	68
5.4	HIDROLISE LIPÍDICA DO ÓLEO DE TAINHA.	69
5.5	COMPLEXAÇÃO COM UREIA	71
5.6	OBTENÇÃO DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO ASTAXANTINA	73
5.6.1	Índice de peróxido.	76
5.6.2	Diâmetro médio e do índice de polidispersão (PDI) dos nanocarreadores lipídicos	77
5.6.3	Potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos contendo astaxantina	78
5.6.4	Eficiência de encapsulação de astaxantina em nanocarreadores lipídicos.....	79
5.6.5	Teor e da recuperação de astaxantina	79
5.6.6	Calorimetria Diferencial de Varredura	80
5.6.7	Estabilidade dos nanocarreadores lipídicos	83
6	CONCLUSÕES	89
7	SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS:.....	90
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
	APENDICE	101

RESUMO

Inúmeros benefícios à saúde foram demonstrados com a utilização de ácidos graxos poli-insaturados em diferentes fases da vida humana, tais como na etapa fetal, infância e na velhice. Os benefícios destes lipídios, representados principalmente pelo ácido docosaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA), na dieta têm sido extensivamente estudados em sistemas celulares, em ensaios clínicos e em estudos epidemiológicos. Assim, seria importante fortificar alimentos com lipídios bioativos para oferecer aos seres humanos com importantes benefícios à saúde, no entanto, ainda há muitos desafios associados com a incorporação destes em alimentos. Muitos lipídios bioativos são físico-quimicamente instáveis e suscetíveis a mudanças ambientais, especialmente quando introduzidos em sistemas alimentares complexos. Uma alternativa para evitar a degradação desses lipídios seria obter nanocarreadores com um núcleo lipídico rodeado por materiais absorvidos e formar sistemas transportadores que ajudem a melhorar os fatores de instabilidade física. Ainda, nestes sistemas é possível incorporar compostos antioxidantes para potencializar os efeitos protetores ao organismo, como a astaxantina. Diante disto, este trabalho teve como objetivo desenvolver carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) e nanoemulsões (NE) contendo astaxantina, utilizando um concentrado de ácidos graxos insaturados obtido de tainha (*Mugil liza*) como componente da fase oleosa dos carreadores. Inicialmente, foi processada a tainha liberando as proteínas por hidrólise enzimática, utilizando Alcalase, para recuperar os lipídios; em seguida os ácidos graxos insaturados de tainha foram concentrados com auxílio de hidrólise lipídica comparando duas lipases de *Candida rugosa* e *Candida antarctica*. A continuação foi feita a complexação com ureia obtendo-se um concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT) com 86,6% de ácidos graxos insaturados. Os nanocarreadores (CLN e NE) foram preparados através do método de homogeneização à alta pressão, utilizando-se formulações que poderiam conter CAGIT, ácido oleico e cera de carnaúba como componentes da fase oleosa, Span 80 e Tween 20, como surfactantes. Os CLNs e NEs contendo astaxantina foram obtidos e caracterizados através da determinação do diâmetro de partícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta, e teor de astaxantina. Os resultados indicaram que as nanoemulsões apresentaram tamanho de aproximadamente 155 nm, potencial zeta negativo (-40mV) e teor de astaxantina de aproximadamente 173 µg/mL. Para os carreadores lipídicos nanoestruturados foi verificado um tamanho em torno de 274 nm, potencial zeta também negativo (-32mV) e teor de astaxantina de 39,04 µg/mL. Estes dados indicam que foram desenvolvidos nanocarreadores utilizando o concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha como fase oleosa, mas que a nanoemulsão apresentou capacidade de incorporar maiores quantidades de astaxantina que os carreadores lipídicos nanoestruturados.

Palavras Chave: Pescado. Carreador lipídico nanoestruturado. Nanoemulsão. Ácidos graxos insaturados.

ABSTRACT

Lipids nanocarriers containing unsaturated fatty acids from mullet (*Mugil liza*) as carotenoid transporters

Numerous health benefits have been demonstrated with the use of polyunsaturated fatty acids at different stages of life, such as the fetal stage, childhood and old age. The benefits of these lipids, mainly represented by docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) in the diet have been studied extensively in cell systems, in clinical trials and epidemiological studies. Thus, it is important to fortify foods with bioactive lipids to supply humans with important health benefits, however, there are still many challenges associated with the incorporation of these in food. Many bioactive lipids are physico-chemically unstable and susceptible to environmental changes, especially when introduced in complex food systems. An alternative to avoid degradation of these lipids would get nanocarriers with a lipid nucleus surrounded by absorbed materials and form conveyor systems which help to improve physical instability. Still, these systems can incorporate antioxidants to enhance the protective effects to the body, such as astaxanthin (AST). In view of this, this study aimed to obtain concentrates of unsaturated fatty acids from mullet (*Mugil liza*) and develop nanostructured lipid carriers (NLC) and nanoemulsions (NE) containing astaxanthin using concentrates of unsaturated fatty acids from mullet as the oil phase of the carrier component. Initially, it was processed mullet releasing the proteins by enzymatic hydrolysis, to recover the lipids, then the mullet unsaturated fatty acids were concentrated with the aid of lipid hydrolysis using two lipases of *Candida rugosa* and *Candida antarctica*, and made the urea complexing obtaining a concentrate of unsaturated fatty acids mullet (CUFAM) with 86.63% unsaturated fatty acids. The nanocarriers (NLC and NE) were prepared by high pressure homogenization method, using carnauba wax, CUFAM and oleic acid as a component of the oil phase, SPAN 80 and TWEEN 20 as surfactants. The NLC and NE containing AST were characterized by determining the particle diameter, polydispersity index (PDI), zeta potential, and astaxanthin content. The results presented indicated that the NEs size of approximately 155nm, zeta potential was negative (-40mV) and astaxanthin content around of 173 µg / mL. For the NLC was found a size around 274 nm, zeta potential was also negative (-32mV) and 39,04 µg/mL astaxanthin content. These data indicate that it was possible to develop nanocarriers using mullet oil as the oil phase and that the nanoemulsion has the ability to incorporate larger quantities of astaxanthin compared with nanostructured lipid carrier.

Keywords: Fish. Nanostructured lipid carrier. Nanoemulsion. Unsaturated fatty acids.

1 INTRODUÇÃO

O pescado é uma das melhores fontes de ácidos graxos poli-insaturados e estudos têm demonstrado sua importância para a saúde humana. Os ácidos graxos essenciais apresentaram efeitos curativos e/ou preventivos sobre as doenças cardiovasculares (LAVIE et al., 2005), os tumores em diferentes órgãos (CALVIELLO; SERINI e PICCIONI, 2007; GU et al., 2013; ALGAMAS-DIMANTOV, 2014) e no desenvolvimento do sistema nervoso em crianças (HOMAYOONI, SAHARI e BARZEGAR, 2014).

Os pescados como cavala, salmão, tubarão, sardinha, atum, capelim, tainha e outros são as fontes mais ricas e de mais baixo custo de abastecimento alimentar de ácidos graxos poli-insaturados, incluindo ácido docosaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA) (HOMAYOONI, SAHARI e BARZEGAR, 2014). Um estudo feito por Visentainer et al. (2007) com óleo de tainha comparado com outras fontes importantes de óleo de pescado, demonstrou que o óleo de tainha tem uma alta porcentagem relativa em ácido graxo EPA 9,35% comparado com 8,54% da sardinha brasileira, 4,66% de atum e 4,01%, de enchova.

Os compostos bioativos, geralmente referidos como, “nutracêuticos”, são constituintes extras nutricionais que normalmente aparecem em pequenas quantidades em alimentos e apresentam a capacidade de modular um ou mais processos metabólicos (LACATUSU et al., 2012). No entanto, a degradação química é um desafio importante para certo número de lipídios bioativos, porque estes são susceptíveis a oxidação na presença de matrizes alimentares. A deterioração de lipídios bioativos é frequentemente acelerada por fatores tais como luz, calor, enzimas, metais, metaloproteínas e micro-organismos, conduzindo à oxidação, foto oxidação, oxidação térmica, ou a oxidação enzimática (CHO; DECKER; MC CLEMENTS, 2010).

Os produtos de oxidação de lipídios bioativos lábeis podem causar não apenas a perda da atividade, mas também podem causar o desenvolvimento de sabores estranhos, mudança de cor, perda de outros nutrientes, e a formação de compostos potencialmente tóxicos, tornando assim, impraticável o objetivo da melhoria da saúde por consumir alimentos enriquecidos com lipídios bioativos. Neste contexto, a nanoencapsulação de lipídios e outros compostos bioativos parece ser um requisito essencial para a produção de alimentos funcionais (CHEN; MC CLEMENTS; DECKER, 2013).

Os nanocarreadores lipídicos são constituídos por lipídios sólidos (nanopartículas sólidas lipídicas-SLN) ou líquidos (nanoemulsões – NE), ou mistura destes (carreadores lipídicos nanoestruturados – CLN), podendo ser classificados em sistemas matriciais ou

reservatórios e obtidos em diferentes faixas de tamanhos de partícula, dependendo da composição da formulação e da técnica de preparação. Tais sistemas se caracterizam pela capacidade em carrear compostos ativos, protegendo-os da degradação. Esses sistemas ainda melhoram a solubilidade de fármacos lipofílicos em água e os protegem contra hidrólise enzimática, além de aumentar a biodisponibilidade dos compostos encapsulados (PURI et al., 2009).

Devido à composição lipídica destes carreadores, estes são biocompatíveis e biodegradáveis. Além disso, no processo de preparo utilizando a técnica de homogeneização à alta pressão não são utilizados solventes orgânicos e a técnica permite o fácil escalonamento (MEHNERT et al., 2001).

Uma das mais importantes aplicações da nanotecnologia na indústria de alimentos e nutrição está na concepção e desenvolvimento de novos ingredientes funcionais de alimentos com maior solubilidade em água, estabilidade térmica, biodisponibilidade oral, atributos sensoriais e performances fisiológicas. Os nanocarreadores são alguns dos sistemas em nano escala sendo investigados para aplicações comerciais a este respeito (ANARJAN e TAN, 2013). A produção de nanoestruturas funcionais com características de um antioxidante é um dos grandes desafios da indústria de alimentos que pode ser significativamente melhorada através do desenvolvimento de uma abordagem combinada de nanotecnologia com as propriedades específicas de óleos naturais e compostos antioxidantes como a astaxantina (LACATUSU et al., 2012).

Astaxantina é um carotenoide disseminado no meio marinho e pode atuar como um antioxidante, doador de elétrons, que reage com os radicais livres para convertê-los em produtos mais estáveis. No seu estado natural, astaxantina é normalmente associada com outras moléculas e quando esta livre é particularmente susceptível à oxidação (DHANKHAR; SUMITA e SHARMA, 2012). AST tem baixa solubilidade em água e conseqüentemente apresenta biodisponibilidade reduzida.

Com base no descrito acima, o principal objetivo deste trabalho foi obter concentrados de ácidos graxos insaturados extraídos da tainha e utilizá-los como componentes da fase oleosa para o desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos contendo astaxantina. O desenvolvimento desses nanocarreadores teria o intuito de ser um produto nutracêutico com capacidade de manter a estabilidade do óleo de tainha e as propriedades antioxidantes da astaxantina, assim como melhorar sua biodisponibilidade, o que traria avanços para a indústria alimentícia.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanocarreadores lipídicos contendo concentrados de ácidos graxos insaturados provenientes de tainha (*Mugil liza*) e astaxantina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Separar o óleo de pescado proveniente de tainha (*Mugil liza*) utilizando hidrólise proteolítica.
- Concentrar os ácidos graxos insaturados presentes no óleo de tainha com o auxílio de hidrólise lipídica e complexação com ureia.
- Avaliar os ácidos graxos insaturados concentrados provenientes de óleo de tainha.
- Obter nanocarreadores lipídicos (carreadores lipídicos nanoestruturados e nanoemulsões) contendo astaxantina, utilizando o óleo concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha como componente da fase oleosa.
- Avaliar as características físico-químicas dos nanocarreadores desenvolvidos
- Avaliar o teor de AST incorporado nos nanocarreadores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 IMPORTÂNCIA DO PESCADO

O Ministério de Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2014) informa que os brasileiros consomem hoje 17,3 kg de pescado per capita/ano, quantidade que alcança a média mundial divulgada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Além disso, essa quantidade não é suficiente sabendo que o consumo de pescados na China e Espanha é de 31,9 e 27,6 Kg de pescado per capita/ano, respectivamente. Os pescados são os responsáveis por conter a mais rica composição em proteínas e ácidos graxos saudáveis (CEPAL, 2014; FAO, 2014; IICA, 2014).

A importância dos ácidos graxos ômega-3, o ácido eicosapentaenóico (EPA) e docosahexaenóico (DHA) é porque são capazes de inibir indiretamente um certo número de aspectos da inflamação incluindo, expressão de moléculas de adesão, a produção de eicosanóides como prostaglandinas e leucotrienos a partir do ácido araquidônico, a produção de citocinas inflamatórias e a reatividade de células T. Isto ocorre pois o ácido eicosapentaenóico é substrato da enzima lipoxigenase assim como ácido araquidônico, mas o EPA e DHA dão origem a resolvinas e protectinas anti-inflamatórias e não aos eicosanóides, ajudando no combate da inflamação (CALDER, 2012). Eles são normalmente encontrados em pescados marinhos e originam-se do fitoplâncton e de algas que fazem parte de sua cadeia alimentar. Pescados de água fria, como o arenque, salmão, cavala, e outros são as principais fontes de ácidos graxos altamente insaturados. As variações na composição dos ácidos graxos ocorrem devido a flutuações na qualidade e quantidade de alimento disponível, especialmente fitoplâncton. A composição da parte comestível do pescado é afetada por muitos fatores, como espécie, sexo, maturidade sexual, tamanho, local de captura, temperatura da água, alimentação e estação do ano (VISENTAINER et al., 2007).

3.2 TAINHA (*Mugil liza*)

A tainha tem importância comercial significativa no Sul e Sudeste do Brasil, devido à boa qualidade da sua carne e ovos. A maior parte destas espécies geralmente alcança cerca de 30 cm de comprimento, mas alguns podem chegar até 80 – 120 cm. A cabeça é ampla e achatada dorsalmente na maioria das espécies (Figura 1). Os arcos branquiais de muitas espécies só servem para respiração mas em outras também vão formar o órgão

faríngeo branquial que é dilatado, o qual é empregado para a filtração do material ingerido (NELSON, 1994; HARRISON, 1999).

Segundo o Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Tainha (*Mugil liza*) nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil (2015) existem duas populações de tainha, espécie *Mugil liza*, ao longo da costa atlântica da América do Sul. A população sul, cujos cardumes são mais abundantes e que possui maior relevância para a produção pesqueira brasileira, ocorre desde o litoral da Argentina até a costa de São Paulo. A população norte se distribui a partir da costa do Rio de Janeiro até os estados do Nordeste e Norte do Brasil, sendo menos conhecida pela ciência.

Figura 1. Tainha (*Mugil liza*)



Fonte: Empresa pesqueira Pioneira (2016).

A espécie constitui um dos mais importantes e tradicionais recursos pesqueiros do Sudeste e Sul do Brasil, dando suporte econômico a mais de 20 mil pescadores artesanais e mais de 1.000 pescadores que trabalham em embarcações industriais. A receita anual estimada dessa pescaria é cerca de 35 milhões de reais. Contudo, os trabalhos científicos mais atuais apontam que existem diversas vulnerabilidades biológicas e ecológicas relacionadas com a pesca da tainha, principalmente em decorrência da captura ocorrer sobre agregações reprodutivas, durante a migração, e sobre juvenis, dentro dos estuários, antes da primeira reprodução (BRASIL, 2015).

Os mugilídeos são peixes de importância comercial (FAO, 2014) onde os indivíduos são comercializados no mercado como pescados frescos, secos, salgados e congelados. Além disso, as ovas são vendidas frescas, defumadas e secas, representando um importante recurso econômico em alguns países do mediterrâneo. Também são usadas na medicina chinesa e são amplamente cultivadas em lagoas de água doce no sudeste da Ásia (FAO, 2014).

Na Tabela 1 se pode observar o conteúdo de umidade, lipídios e proteínas da carne de vários pescados do Brasil, entre os quais está a tainha (*Mugil sp.*), que como pode-se observar apresenta o mais alto conteúdo de lipídios.

Tabela 1 - Composição química da carne de pescados diversos.

Espécie	Nome científico	% umidade	% lipídios	% proteínas	Valor energético (Cal/lib)
Linguado	<i>Platichthys flesus</i>	81,0	0,3	16,8	330,0
Tainha	<i>Mugil sp.</i>	76,0	3,9	19,5	530,0
Bacamarte	<i>Trigla sp.</i>	76,0-77,0	1,1-2,3	19,7-20,2	410,0-470,0

Fonte. FAO, 2014

No Brasil foram realizados análises do óleo de tainha pelos autores citados na Tabela 2, onde Menezes et al.(2008), caracterizaram o óleo da tainha da Lagoa Mundaú e o Visentainer et al. (2007), caracterizaram o óleo de tainha proveniente de águas marinhas. O conteúdo de EPA dos ácidos graxos totais do óleo de tainha (*Mugil liza*) foi muito superior (9,35 %) quando comparado com o conteúdo no óleo da sardinha brasileira (*Sardinella brasiliensis*) de 8,54, no óleo do atum (*Thunnus thynnus*) de 4,66 % e no óleo da anchova (*Pomatomus saltatrix*) de 4,01 % (VISENTAINER et al., 2007).

3.3 ÓLEO DE PESCADO

Os óleos de pescado são uma fonte disponível de ácidos graxos polinsaturados de cadeia longa, especialmente aqueles das séries n-3, principalmente cis-5,8,11,14,17- ácido eicosapentaenóico (EPA) e cis-4,7,10,13, 16,19- ácido docosa-hexaenóico (DHA) (ZUTA et al., 2003).

Segundo o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal "óleo de pescado" é o subproduto líquido obtido pelo tratamento de matérias-primas pela cocção a vapor, separado por decantação ou centrifugação e filtração. Permite-se também, o tratamento por simples prensagem e decantação ou por qualquer outro processo adequado (RIISPOA, 1952)

Tabela 2 - Composição do óleo de tainha segundo estudos realizados no Brasil

Tipo de Acido graxo	Óleo de tainha (%) (Menezes et al., 2008)	Óleo de tainha (%) (Visentainer et al., 2007)
a. Saturados		
Laurico(C12:0)	6,61 ±1,38	-
Mirístico(C14:0)	7,66 ±1,50	2,00±0,00
Pentadecanoico (C15:0)	9,14 ±1,38	2,60±0,20
Palmítico (C16:0)	12,97 ±4,28	18,20±1,00
Margarico(C17:0)	9,13 ±3,12	-
Esteárico(C18:0)	4,26 ±1,72	10,00±0,80
Lignocérico (C24:0)	-	0,90±0,10
Total	49,77	33,70
b. Monoinsaturados		
Palmitoléico (C16:1)	7,60 ±1,69	2,30±0,10
Heptadecenóico(C17:1n-7)	6,14±1,84	-
Oleico (C18:1n-9)	6,27±1,31	8,00±0,60
Eicosenóico (C20:1n-9)	-	0,70±0,10
Erúcico (C22:1n-9)	-	7,30±0,30
Total	20,01	18,30
c. Poli-insaturados		
Linoleico(C18:2n-6)	6,28±1,37	2,00±0,20
α Linolênico(C18:3n-3)	5,61±2,96	1,20±0,00
Araquidônico (C20:4n-6)	2,97±0,88	0,70±0,00
Eicosapentaenoico (C20:5n-3)	5,42±2,10	9,40±0,70
Docosatetraenóico (C22:4n6)	-	1,80±0,20
Docosapentaenóico (C22:5n-3)	4,79±1,55	5,60±0,40
DocosaexaenoicoDHA (C22:6n-3)	5,05±1,57	24,60±1,50
Total	30,12	45,30

Fonte: Adaptado do Menezes et al., 2008 e Visentainer et al., 2007.

Segundo o RIISPOA (1952) os óleos de pescado devem satisfazer às seguintes características:

- deve ter cor amarelo-claro ou amarelo-âmbar, tolerando-se os que apresentarem uma ligeira turvação;
- no máximo 1 % (um por cento) de impurezas;
- no máximo 10 % (dez por cento) de umidade;
- no máximo 3% (tres por cento) de acidez em ácido oleico;
- não conter substâncias estranhas, outros óleos animais ou óleos vegetais.

O óleo de pescado é uma mistura de ácidos graxos, na forma de triglicerídeos com EPA (ácido eicosapentaenoico) e DHA (docosaexaenoico) como os principais componentes de cadeia longa. A maioria dos óleos contêm apenas um ácido graxo EPA ou ácido graxo

DHA por molécula de triglicerídeos (KRALOVEC et al., 2012). Os óleos marinhos são considerados a principal fonte comercial de EPA e DHA.

Os óleos de pescado são atraentes devido ao seu conteúdo de ácidos graxos interessantes. Por esta razão, o óleo de pescado é, preferencialmente, utilizado como matéria prima para preparar os concentrados de ácidos graxos poli-insaturados (GAMEZ MEZA et al., 2003).

Dados experimentais indicam que o consumo de óleo de pescado contendo ácidos graxos poli-insaturados (AGPIs) previne a hipertensão arterial (BORGHI, e ARRIGO, 2006), é utilizado no tratamento e prevenção de doenças mentais (STILLWELL e WASSALL, 2003; MC NAMARA, 2006; CLAYTON et al., 2007; MAZZA et al., 2007), é benéfico no tratamento de doenças autoimunes e com condições inflamatórias alérgicas (CALDER, 2006; STAMP, JAMES e CLELAND, 2005). Além disso, os EPA e DHA, encontrados apenas em pescados e alimentos do mar, desempenham um papel vital no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso (cérebro) na fotorecepção (visão) e no sistema reprodutor (HOMAYOONI, SAHARI e BARZEGAR, 2014)

3.4 PROTEASES

As enzimas proteolíticas ou proteases catalisam a quebra das ligações peptídicas nas proteínas. São enzimas de classe 3, as hidrolases, e sub-classe 3,4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases. Aproximadamente 60% do total das industriais são proteases, amplamente empregadas na produção de couro e na indústria de alimentos. Nesta última, as proteases são utilizadas como adjuvantes no processamento de cerveja, vinho, cereais, leite, produtos lácteos, chocolate, ovos, produtos a base de ovos, produtos a base de carne e de peixe, legumes e na produção de proteínas hidrolisada e flavorizantes (CENTENARIO, 2011).

A Alcalase é uma enzima produzida por fermentação submersa do microrganismo *Bacillus licheniformis* e foi desenvolvida pela Novo Nordisk (Bagsvaerd, Denmark) para a indústria de detergentes. Tem-se provado repetidamente, por muitos pesquisadores, que é uma excelente enzima para preparação de diversos hidrolisados proteicos (SCHMIDT e SALAS-MELLADO, 2009)

3.5 LIPASES

Lipases são enzimas pertencentes ao grupo das serina hidrolases (E.C. 3.1.1.3) triacilglicerol acilhidrolasas e catalisam a hidrólise de triacilglicerol cujos produtos são os diacilglicerídeos, monoacilglicerídeos, ácidos graxos e glicerol. (PASTORE; DA COSTA; KOBLITZ; 2003).

As lipases são enzimas responsáveis pela hidrólise de glicérides de acila. No entanto, um número de outros ésteres de baixa e elevada massa molecular, ésteres de tiol, amidas, ésteres de poliol/poliácidos, etc., são aceitos como substratos por este grupo único de enzimas. O amplo espaço para o emprego em uma variedade de reações, dotado por essa ampla especificidade de substrato, é ainda mais ampliado pelo fato de que as lipases são capazes de catalisar a reação inversa da síntese com a mesma eficiência. Em geral, algumas lipases são mais adequadas para a síntese do que para aplicações de hidrólise (GANDHI, 1997).

A lipase proveniente de *Cândida rugosa* (AMA) é uma lipase que hidrolisa ácidos graxos de cadeia curta, meia o longa nas posições 1,2 ou 3 de triacilglicerol. Sua temperatura ótima de trabalho é 40 a 50°C e o pH ótimo é 7,0. Esta lipase é conhecida por possuir uma selectividade de comprimento de cadeia de ácido graxos, mostrando a atividade mais elevada com relativamente ácidos graxos de cadeia curta, tais como C:18 ou inferior (KAHVECI e XU, 2010; OKADA e MORRISEY, 2007; MCNEILL, MOORE, e ACKMAN, 1996).

A lipase proveniente de *Cândida antártica* (LYP) é uma lipase que não tem especificidade posicional, hidrolisando triacilgliceróis; a temperatura ótima de trabalho é 45 a 50°C e o pH ótimo é 7,0 a 8,0. O potencial como biocatalisador desta enzima esta extensamente documentado tanto em hidrólise em médio aquoso como de reações de síntese em meio orgânico (ADACHI et al.,2013).

3.6 SEPARAÇÃO DO ÓLEO DE PESCADO POR HIDRÓLISE PROTEOLÍTICA

A separação do óleo de pescado por meio de uma hidrólise pelas proteases de grau alimentício poderia fornecer uma alternativa interessante. O uso dessas ferramentas biotecnológicas para tal propósito tem lugar a temperatura moderada por um período curto (50-60 °C, 30-120 min). Além disso, as proteases de grau alimentar, que permite a liberação do óleo a partir da matriz de proteína não tem custo elevado e são amplamente utilizadas na

indústria alimentar. A mistura resultante pode ser facilmente separada por ultrafiltração, um processo largamente utilizado na indústria de laticínios (LINDER et al., 2003).

Linder, Fanni e Parmentier (2005) desenvolveram um método enzimático para extrair óleo a partir de cabeças de salmão, à temperatura média de 55 °C, utilizando diferentes enzimas comerciais: Alcalase, Neutrase e Flavourzyme. Estes concluíram que a maior recuperação de óleo (17,4 % após 2 h) foi obtida através da utilização de Alcalase.

Liu et al. (2006) propuseram um processo enzimático para extração proteolítica de óleo bruto a partir de cabeças de atum, seguido por um passo de complexação de ureia, obtendo a mistura de DHA e EPA, com pureza de 85,02 % e rendimento de 25,10 %. Al-Sayed et al. (2008) fizeram um estudo semelhante sobre a extração enzimática de óleo de ovas de truta arco-íris usando Alcalase, Neutrase e Protamex respectivamente, e também concluíram que a Alcalase foi a enzima que conduziu a maior recuperação de óleo.

A conclusão geral a que chegaram os autores citados que estudaram a extração de óleo de pescado, pelo emprego de tecnologia enzimática é que esta tecnologia produz um óleo de melhor qualidade que o obtido por métodos que utilizam tratamentos térmicos e químicos (AL-SAYED et al., 2008; LINDER et al., 2007; LIU et al., 2006).

3.7 ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS

Os ácidos graxos são componentes importantes dos lipídios em plantas, animais e micro-organismos. Geralmente, um ácido graxo é composto por uma cadeia linear de um número par de átomos de carbono, com átomos de hidrogênio ao longo do comprimento da cadeia e numa extremidade da cadeia e um grupo carboxila (COOH) na outra extremidade. É esse grupo carboxila que faz com que seja um ácido (ácido carboxílico). Se as ligações carbono-carbono são todas simples, o ácido é saturado; se qualquer das ligações é dupla ou tripla, o ácido é insaturado e é mais reativa. Os ácidos graxos não são encontrados em um estado livre na natureza; geralmente eles existem em combinação com glicerol (um álcool) na forma de triglicérideo (BRITANNICA ACADEMICS, 2016). Na Tabela 3 pode-se observar a nomenclatura dos principais ácidos graxos insaturados (AGI), ácidos graxos saturados (AGS) e ácidos graxos poli-insaturados (AGPI).

Tabela 3 - Nomenclatura dos principais ácidos graxos

Nome comum	Código	Nomenclatura
Ácidos Graxos saturados de cadeia curta		
	C4:0	Butanoico
Butírico		
Acido graxos saturados de cadeia media		
Caproico	C6:0	Hexanoico
Caprílico	C8:0	Octanoico
Cáprico	C10:0	Decanoico
Láurico	C12:0	Dodecanoico
Acido graxos de cadeia longa		
Mirístico	C14:0	Tetradecanoico
Palmítico	C16:0	Hexadecanoico
Esteárico	C18:0	Octadecanoico
Palmitoléico	C16:1,n-7 cis	9-hexadecaenóico
Oléico	C18:1,n-9 cis	9-octadecaenóico
Elaídico	C18:1,n-9 trans	9-octadecaenóico
Linoléico	C18:2,n-6,9 cis	9,12-octadecadienóico
α -linolênico	C18:3,n-3,6,9 cis	9,12,15-octadecatrienóico
γ -linolênico	C18:3,n-6,9,12 cis	6,9,12-octadecatrienóico
Ácidos graxos de cadeia muito longa		
Araquídico	C20:0	Eicosanoico
Behênico	C22:0	Docosanoico
Eicosenóico	C20:1,n-9 cis	11-eicosenóico
Erúico	C22:1,n-9 cis	13-docosaenóico
Cetoléico	C22:1, n-11 cis	11-docosaenóico
Nervónico	C24:1, n-9 cis	15-tetracosanoico
Dihomo- γ -linolênico	C20:3, n-6,9,12 cis	8,11,14-eicosatrienóico
Araquidônico	C20:4, n-6,9,12,15 cis	5,8,11,14-eicosatetraenóico
Timnodônico	C20:5, n-3,6,9,12,15 cis	5,8,11,14,17-eicosapentaenóico
Clupanodônico	C22:5,n-7,10,13,16,19 cis	7,10,13,16,19-docosapentaenóico
Docosaenoico	C22:5, n-4,7,10,13,16,19 cis	4,7,10,13,16,19-docosaenoico

Fonte: Rêgo, 2012

Os ácidos graxos poli-insaturados são ácidos graxos insaturados com mais de duas ligações duplas. Estes são ingredientes usados em suplementos dietéticos, alimentos saudáveis e produtos farmacêuticos. Esses ácidos graxos bioativos já têm bem estabelecidos seus benefícios para a saúde e são derivados principalmente de óleo de peixe. EPA e DHA são componentes essenciais da alimentação saudável e tem sido demonstrado clinicamente a sua capacidade de diminuir o risco de doença cardíaca coronária, em parte, através de sua capacidade para reduzir os níveis de triglicerídeos séricos e ajudar a prevenir ataque cardíaco secundário. EPA e DHA são precursores de mediadores anti-inflamatórios e demonstraram benefícios para a prevenção de doenças inflamatórias incluindo alergia, diabetes, doença de Alzheimer e doenças neurodegenerativas relacionadas (LAVIE et al., 2009).

As fontes naturais mais importantes de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 (AGPI) são organismos marinhos (pescados, mariscos, algas), que são alimentados, direta ou indiretamente, de fitoplâncton marinho, o principal produtor de ômega-3 na cadeia trófica. Os AGPI em óleos marinhos são normalmente encontrados como triglicerídeos, embora possam formar outros tipos de lipídios como os ésteres de cera ou fosfolipídios. Além disso, os estudos sobre a distribuição posicional dos ácidos graxos dos triglicerídeos de vários óleos de pescado têm mostrado que a maioria dos AGPI são ligados na posição sn-2 do esqueleto de glicerol, o qual está relacionado a uma maior estabilidade contra a oxidação (RUBIO-RODRÍGUEZ et al., 2010). O óleo de pescado é a fonte mais abundante e de baixo custo de EPA e DHA. As melhores fontes de ômega-3 vegetais (sementes de linho, perilla, kiwi e chia) são muito ricas em ácido α -linolênico (ALA), mas têm níveis muito baixos de EPA e DHA. O principal benefício para a saúde do consumo de ALA é que ele se converte em EPA e DHA. No entanto, no corpo humano ALA é convertido em EPA e DHA, com uma eficiência de apenas 5-10 % de EPA e 1-5 % de DHA. A maioria dos óleos de pescado não contém mais do que um nível combinado de 30 % de EPA e DHA. Por exemplo, as fontes primárias de óleo de pescado ômega 3 são os óleos de anchoveta (*Engraulis ringens*) e de sardinha (*Sardinops sagax sagax*) que contêm 15-22 % de EPA e 9-15 % de DHA respectivamente (KRALOVEC et al., 2012).

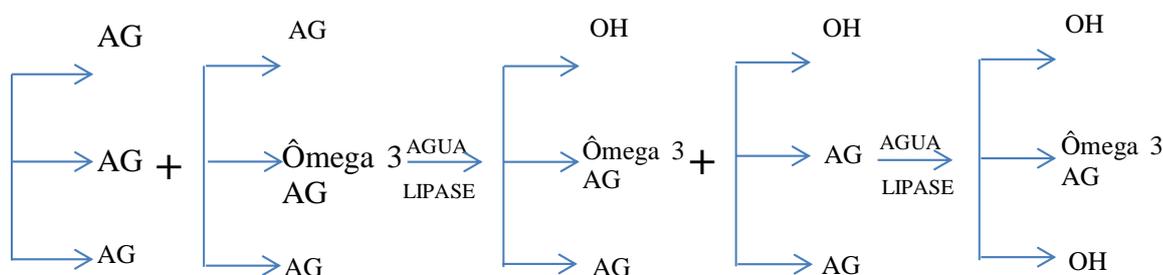
3.8 CONCENTRAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS PELA HIDRÓLISE LIPÍDICA

Os principais métodos para a concentração de AGPI ômega 3 são a separação cromatográfica, destilação fracionada ou molecular, cristalização a baixa temperatura, extração de fluido supercrítico e de complexação de ureia. A hidrólise catalisada por lipase tem um número de vantagens sobre os métodos acima mencionados. Este processo não envolve extremos de pH e temperaturas elevadas, o que pode parcialmente destruir a estrutura natural cis de AGPI ômega 3 por oxidação, cis-trans de isomerização ou migração de ligação dupla. As condições de baixas temperatura e o pH utilizado também podem reduzir o custo do processo. Uma característica específica da reação de hidrólise catalisada por lipase é que, o processo resulta na produção seletiva devido ao substrato e especificidades posicionais das lipases. Além disso, a recuperação de AGPI Omega 3 em forma de glicéridos é nutricionalmente mais favorável do que ésteres de metila ou etila destes ácidos graxos. (KAHVECI e XU, 2010).

Existem 2 tipos de hidrólise enzimática por lipases, uma catalisada por uma lipase 1,3 específica, e a hidrólise catalisada por uma lipase não específica. Na Figura 2, observa-se uma hidrólise de triglicerídeos catalisados pela lipase 1,3 específica, onde a lipase não hidrolisa a posição 2 do triglicerídeo mas a posição 1 e 3 são hidrolisadas. Normalmente os AGPI encontram-se na posição 2.

Linder et al. (2005) propuseram um método para aumentar a quantidade de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) em óleo de salmão de 41,6 % para 46,5 % ao longo de uma hidrólise enzimática catalisada por Novozym SP398, seguido por uma etapa de filtração em um dispositivo de membrana hidrofóbica. Além disso, propuseram um passo de esterificação final com glicerol usando uma lipase 1,3 específica imobilizada.

Figura 2 - Hidrólise dos triglicerídeos catalisados pela Lipase



FONTE: Adaptado de Padilha e Augusto-Ruiz (2007)

Gámez Meza et al. (2003) estudaram a concentração de ácidos graxos poli-insaturados de óleo de sardinha a partir de reação de hidrólise de acoplamento e complexação da ureia. Comparando a hidrólise enzimática por diferentes lipases de *Pseudomonas* com a hidrólise química utilizando hidróxido de potássio, etanol e hexano, e concluíram que a lipase de *Pseudomonas cepacia* imobilizada em cerâmica quimicamente modificada com uma proteína foi o melhor sistema enzimático para obter a mais alta pureza de ácidos graxos ômega-3 (86,58 %), com um rendimento aceitável (78,0 %), enquanto a hidrólise química permitiu a obtenção de uma maior recuperação de ômega-3 (90,5 %), mas com um grau de pureza inferior (83,13 %). Além disso, eles apontam que o método enzimático é mais vantajoso, uma vez que a separação dos produtos é mais fácil e o processo pode ser desenvolvido em reatores contínuos de leito empacotado.

Kavecic e Xu (2010) testaram lipases de *Penicillium camemberti* (PC), *Rhizomucor javanicus* (RJ), *Rhizopus niveus* (RN), *Rhizopus delemar* (RD), *Burkholderia cepacia* (BC), *Rhizopus oryzae* (RO), *Cândida rugosa* (CR) e *Rhizomucor miehei* (RM). As lipases de PC, RJ e RN apresentaram menores graus de hidrólise (HDS) em comparação com o resto das

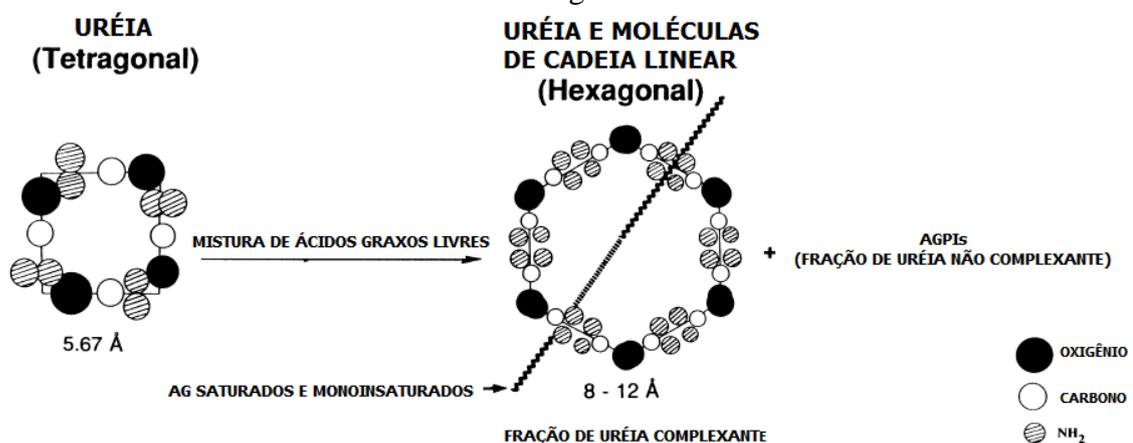
lipases. A lipase de CR teve o maior grau de hidrólise após 24 h (91,89 %). Além disso, CR lipase foi a mais eficaz na concentração de AGPI ômega 3. O valor final foi aumentado de 13,77 % para 27,81 % (% em massa). As alterações no teor de AGPI ômega 3 foram significativamente diferentes entre as lipases, embora os valores de grau de hidrólise foram semelhantes ao final das reações, talvez causado pelas especificidades de substrato das lipases. Finalmente, a lipase CR teve a maior preferência para hidrolisar ácido oleico seletivamente sobre EPA e DHA.

3.9 COMPLEXAÇÃO COM UREIA

A complexação da ureia é um método clássico para concentrar ácidos graxos poli-insaturados. A ureia forma cristais de forma tetragonal de ureia por si só e cristais em forma de espiral hexagonal com um ácido graxo (NO et al., 2015).

A ureia é um composto que cristaliza numa estrutura tetragonal bem empacotada. Mas, na presença de moléculas de cadeia linear longa cristaliza-se em uma estrutura hexagonal com canais de 0,8- 1,2 nm de diâmetro, dentro dos cristais hexagonais (Figura 3). Os canais formados são suficientemente grandes para acomodar cadeias alifáticas como cadeias lineares de ácidos graxos saturados com seis átomos de carbono ou mais e é mais difícil acomodar ácidos graxos com presença de ligações duplas na cadeia de carbono porque aumenta o volume da molécula e reduz a capacidade de complexação, finalmente os ácidos graxos monoinsaturados são mais facilmente complexados do que os ácidos graxos poli-insaturados. (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1999).

Figura 3 - Formação de cristais de ureia com e sem a presença de ácidos graxos de cadeia longa.



3.10 ASTAXANTINA

A astaxantina (ketocarotenoide, 3 di, 3 hidróxi- β , β -caroteno-4, 4'-diona), pertence à família das xantofilas, e são derivados oxigenados de carotenóides. A síntese de xantofilas de plantas deriva do licopeno. A astaxantina é onipresente na natureza, especialmente no ambiente marinho e é um pigmento vermelho comum para muitos animais marinhos, como os salmonídeos, camarões, lagostas e lagostins, contribuindo para a cor rosa-vermelho de sua carne. O seu principal papel é fornecer a cor laranja avermelhado desejada nestes organismos porque eles não têm acesso a fontes naturais de carotenóides (DHANKHAR; SÚMITA; SHARMA, 2012). Na natureza é conjugada com proteínas ou esterificada com um ou dois ácidos graxos para formar monoésteres e diésteres, produzindo uma variedade de cores em organismos diferentes. Apresenta o cromóforo dos pigmentos azuis, verdes e amarelos de lagostas. Em outros casos, a astaxantina pode ser simplesmente dissolvida na fração lipídica de moléculas complexas, tais como lipoproteínas, ou pode ser efetivamente ligada quimicamente a moléculas tais como ácidos graxos para formar ésteres (DHANKHAR; SUMITA; SHARMA, 2012).

A astaxantina apresenta propriedades químicas únicas com base na sua estrutura molecular, possui dois grupos carbonila, dois grupos hidroxila, e onze ligações duplas conjugadas. A presença dos radicais hidroxila e ceto em cada anel explica algumas das suas características únicas tais como a capacidade de ser esterificada, uma atividade antioxidante superior e um caráter mais polar do que outros carotenóides (DHANKHAR; SUMITA; SHARMA, 2012).

Este composto possui atividade antioxidante 10 vezes maior do que o de β -caroteno, luteína, zeaxantina e cantaxantina e está associada clinicamente com uma série de benefícios à saúde humana, incluindo a inibição da oxidação do lipoproteínas de baixa densidade (LDL), propriedades anti-inflamatórias, diminuição do estresse oxidativo e aumento da resposta imune. Os resíduos de crustáceos são aproveitados para recuperar os carotenóides principalmente astaxantina, mas é menos disponível comercialmente que a astaxantina obtida do cultivo das microalgas *Haematococcus pluvialis* que tem importantes aplicações em indústrias de alimentos para humanos e animais (TAKSIMA; LIMPAWATTANA; KLAYPRADIT, 2015).

Devido à sua estrutura altamente insaturada, carotenóides, como a astaxantina, são muito sensíveis ao calor, oxigênio e luz. Qualquer um deles pode produzir agentes oxidantes prejudiciais, como radicais livres. Para uma eficácia máxima, os carotenóides devem manter-

se estáveis quando são adicionados a formulações alimentares diferentes. Uma das formas de manter a estabilidade dos carotenóides é a sua incorporação em sistemas nanocarreadores. Estes sistemas tem muitas aplicações alimentares e farmacêuticas devido à sua capacidade de evitar a degradação dos compostos encapsulados, aumentar sua solubilidade em água e sua biodisponibilidade (ANARJAN; TAN, 2013).

3.11 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é a criação de estruturas funcionais onde pelo menos uma de suas dimensões é menor de 100 nm (REESE, 2013). Mas alguns autores (SANGUANSRI; AUGUSTIN, 2006) afirmam que a nanotecnologia trata da aplicação, produção e transformação de materiais com tamanhos inferiores a 1000 nm. Os materiais em escala nanométrica podem apresentar novos comportamentos e/ou propriedades diferentes daquelas que geralmente apresentam em escala macroscópica. Ao ramo da ciência que estuda esses novos materiais foram atribuídos o nome de nanociência ou nanotecnologia (DURAN; CAPPARELLI; MORAIS, 2012).

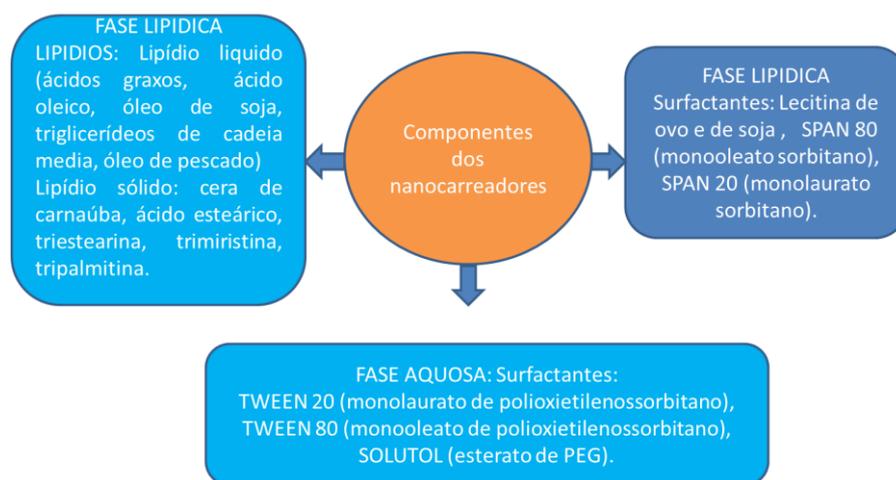
Os benefícios notáveis da nanotecnologia para o setor de alimentos, com um forte potencial para influenciar muitos aspectos dos sistemas alimentares têm sido bem documentados nos últimos anos. Mesmo que a aplicabilidade da nanotecnologia para o setor de alimentos tenha iniciado principalmente a partir de 2005, esta oferece oportunidades de processamento e transformação interessantes para a indústria alimentar e promete um grande potencial de mercado. Estão sendo desenvolvidos nanosensores, dispositivos de rastreamento, nanocarreadores de compostos bioativos, dispositivos para segurança alimentar, desenvolvimento de novos produtos, embalagens inteligentes entre outros (HUANG; YU e RU, 2010; MC CLEMENTS et al., 2009).

As proteínas, os carboidratos e os lipídios no seu estado natural também foram modificados pela nanotecnologia e os produtos resultantes estão sendo aplicados em embalagens, como aditivos (CHEN et al., 2006) e nutracêuticos. No entanto, muitos compostos possuem problemas relacionados a degradação e neste contexto, a nanoencapsulação de compostos bioativos pode também ser interessante para a produção de alimentos (DUNCAN, 2011), para a liberação controlada de nutracêuticos ou aditivos alimentares. A nanotecnologia também pode melhorar a capacidade de dispersão da água, estabilidade térmica, e biodisponibilidade oral dos componentes bioativos dos alimentos (RANJAN et al., 2014).

3.11.1 Nanocarreadores lipídicos

Os nanocarreadores lipídicos são definidos por diferentes autores (GOMES, 2012; DORA, 2010; LACATUSU et al., 2012) como transportadores coloidais estudados por mais de 20 anos na área farmacêutica, e recentemente tem sido utilizados para aplicações em alimentos devido a sua capacidade para melhorar a estabilidade, a incorporação e a biodisponibilidade de compostos bioativos lipofílicos em formulações aquosas. Os nanocarreadores lipídicos estão compostos por uma fase lipídica, composta por lipídios líquidos e/ou sólidos, surfactantes tanto para a fase lipídica como para a fase aquosa e água (Figura 4). O surfactante é um tipo de substância anfifílica, que possui hidrofobicidade e hidrofobicidade, simultaneamente. A parte lipofílica do surfactante é propenso a estar num ambiente não-polar e a parte hidrófila tende a estar num ambiente polar. O equilíbrio entre estas duas partes pode regular a funcionalidade do surfactante nas interfaces que tem impacto sobre as propriedades das emulsões (ZHONG e LE, 2011). Existem diversos tipos de nanocarreadores lipídicos podendo incluir-se lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas lipídicas solidas (NLS) e carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) (FANGUÉIRO, 2012). Abordaremos as NE e os CLN pois são nanocarreadores de escolha para esse trabalho.

Figura 4. Componentes dos nanocarreadores lipídicos



Fonte: Adaptado de Shah et al., 2014.

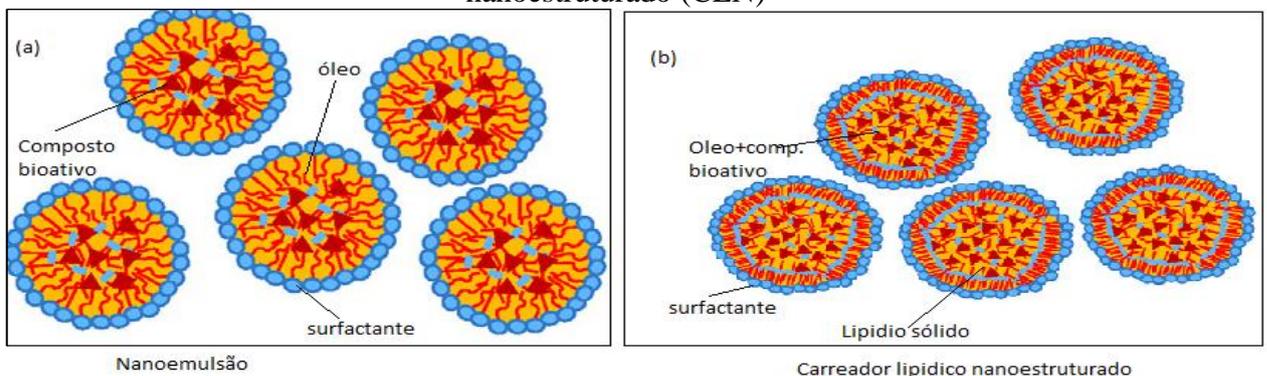
As nanoemulsões (NE) podem ser definidas como sistemas heterogêneos composto de dois líquidos imiscíveis, sendo que um líquido se encontra disperso sob a forma de gotículas no outro, e o sistema é estabilizado por tensoativos adequados (Figura 5). A sua

formação geralmente requer uma fonte de energia e a dispersão é termodinamicamente instável. Elas podem ser do tipo óleo em água (o/a) ou água em óleo (a/o), sendo que as gotículas em geral apresentam diâmetro inferior a um micrômetro (geralmente entre 100 e 500 nm) (BHATT e MADHAV, 2011).

As nanoemulsões são interessantes para a indústria alimentar devido às potenciais aplicações em sistemas de liberação de compostos bioativos hidrofóbicos, evitando sua degradação e melhorando a solubilidade dos compostos encapsulados. Por outro lado, não possuem a capacidade de prolongar a liberação dos mesmos (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2015). Para a indústria alimentar seria interessante usar estes sistemas para a incorporação de, por exemplo, compostos funcionais lipofílicos em matrizes alimentares (MCCLEMENTS et al., 2009).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são um tipo de emulsão O/A, que utiliza uma mistura de um lipídio sólido e de um lipídio no estado líquido como fase oleosa da emulsão (Figura 5). Elas também são partículas coloidais dispersas em uma solução aquosa de surfactante, com diâmetro médio que varia entre 50 e 1000 nm, (LACATUSU, et al., 2013). A aplicação de nanopartículas lipídicas para entrega ativa de ingredientes alimentares têm sido bastante estudada (MCCLEMENTS et al., 2009; FATHI et al., 2012). Entre as principais vantagens deste sistema carreador podemos destacar (i) aumento da estabilidade de lipídios bioativos evitando sua oxidação, (ii) aumento da absorção e biodisponibilidade dos lipídios e compostos bioativos e (iii) possibilidade da liberação prolongada dos compostos encapsulados. No entanto, devido as características estruturais este sistema possui uma menor capacidade de incorporar compostos quando comparado a uma NE (DORA, 2010; CHEN; MCCLEMENTS; DECKER, 2013).

Figura 5 - Estrutura comparativa entre nanoemulsão (NE) e carreador lipídico nanoestruturado (CLN)



Fonte: Adaptado de Livney, 2015.

Os nanocarreadores lipídicos podem ser produzidos utilizando o método de homogeneização à alta pressão. Por esta técnica utiliza uma dispersão de partículas é impulsionada com alta pressão (100-2000 bar) através de uma cavidade estreita (poucos micrômetros), e acelerada em uma curta distância, com alta velocidade (cerca de 100 km/h) ao encontro de uma barreira. A colisão com a barreira possibilita a formação de nanopartículas com reduzido diâmetro (SHAH et al., 2014). A maior vantagem da técnica é a possibilidade de produção de nanocarreadores em larga escala, além de produzir estreita faixa de diâmetro de partículas e de não utilizar solvente orgânico (MARCATTO, 2009).

3.11.2 Aplicação dos nanocarreadores na área de alimentos

As nanoemulsões têm sido usadas para encapsular lipídios bioativos, como a vitamina E e antioxidantes fenólicos, em bebidas leves e alimentos funcionais. Isto é possível porque as dimensões destas nanoestruturas são muito menores do que o comprimento de onda de luz, fazendo com que a dispersão de luz seja relativamente fraca de modo que a bebida permaneça com uma cor clara e aspecto transparente (CHEN; WÁGNER, 2004; MC CLEMENTS, 2010). No entanto, a aplicação de nanoemulsões para sistemas alimentares ainda apresenta desafios que precisam ser abordadas tanto em termos do processo de produção, especialmente o seu custo, e da caracterização das nanoemulsões resultantes e dos sistemas alimentares a que será aplicada em termos segurança de produto e aceitação (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2012).

Numa recente pesquisa estudaram-se as nanoemulsões com licopeno preparados com a finalidade de proteger a atividade antioxidante do extrato de tomate enriquecido com licopeno aumentar a sua biodisponibilidade. A superfície das gotículas nas nanoemulsões de licopeno foi adaptada para proporcionar ótimas propriedades interfaciais contra reações oxidativas, alta solubilidade aquosa e difusividade, para maximizar a absorção (TAKSIMA et al., 2015).

Anarjan e Tan (2013) estudaram a aplicação de nanoemulsões com astaxantina em suco de laranja e leite descremada utilizando diferentes surfactantes, eles obtiveram resultados promissores para a aplicação de astaxantina em alimentos com alto conteúdo de água.

Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo hesperetina foram aplicados em leite fortificado por Fathi et al. (2013). As amostras foram submetidos à análise sensorial e resultados indicavam que o leite contendo carreadores lipídicos nanoestruturados desenvolvidos não mostraram qualquer diferença significativa com amostra de leite sem os

carreadores, indicando que poderiam muito bem mascarar o sabor amargo da hesperetina e melhorar sua baixa solubilidade.

Liu, Wang e Xia (2012) aplicaram carreadores lipídicos nanoestruturados carregados de coenzima Q10 (Co Q10) em líquidos simulando bebidas alimentícias e os estudos demonstraram um grande potencial de aplicação porque as amostras apresentaram estabilidade, mantendo o tamanho de partículas durante 3 meses.

Lacatusu et al. (2014) estudaram o comportamento do óleo de peixe enriquecido com ácidos graxos omega-3, a fim de obter carreadores lipídicos nanoestruturados estáveis como sistemas de liberação eficazes para luteína. Eles utilizaram cera carnaúba e óleo de peixe e desenvolveram com sucesso os carreadores lipídicos nanoestruturados com diferentes teores de luteína. Os resultados indicaram que uma maior proporção de óleo de peixe relacionado com a cera carnaúba na fase oleosa melhorava o teor de encapsulamento de luteína, eles observaram uma estrutura menos ordenada na cristalização da cera carnaúba, que foi ocasionada por o óleo de peixe, que permitia uma maior eficiência de encapsulamento da luteína.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matéria prima

A tainha foi capturada na região Sul do Rio Grande do Sul, proveniente da pesca da cidade de Rio Grande, RS, Brasil. O pescado fresco foi adquirido e transportado do Entrepósito de Rio Grande para o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA/FURG) em condições adequadas de higiene e refrigeração, em caixas fechadas com gelo em escamas.

4.1.2 Infraestrutura

Este trabalho foi realizado no LTA da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal do Rio Grande e no Laboratório de Nanotecnologia Aplicada à Saúde localizado no Centro de Microscopia Eletrônica do Sul - CEME SUL. Algumas análises foram realizadas nos Laboratórios de Operações Unitárias, de Microbiologia e Bioquímica, e de Micotoxinas e Ciências de Alimentos, da Universidade Federal de Rio Grande.

4.1.3 Enzimas e Reagentes

Enzimas: Alcalase 2.4. LF protease de *Bacillus licheniformis*, lipase B de *Candida antarctica*, com o nome comercial de Lipozyme-435 (LYP) foi doada por empresa LNF Latino Americana, Brasil; lipase AY Amano de *Candida rugosa* (AMANO) foi doada pela empresa Amano, Japão. Os reagentes utilizados foram todos de grau analítico (P.A.) e água grau HPLC foi preparada utilizando sistema Milli-Q da Millipore®, USA. A astaxantina (>90% de pureza), o Tween 20, o Spam 80, a Dynasan, e o tocoferol foram adquiridas do Sigma Aldrich, Brasil, o ácido oleico foi adquirido da Synth, Brasil. A cera carnaúba e a lecitina de soja (Phospholipon 80®) foram adquiridas da Lipoid, Switzerland e o Solutol, foi adquirido da Sigma–Aldrich , USA.

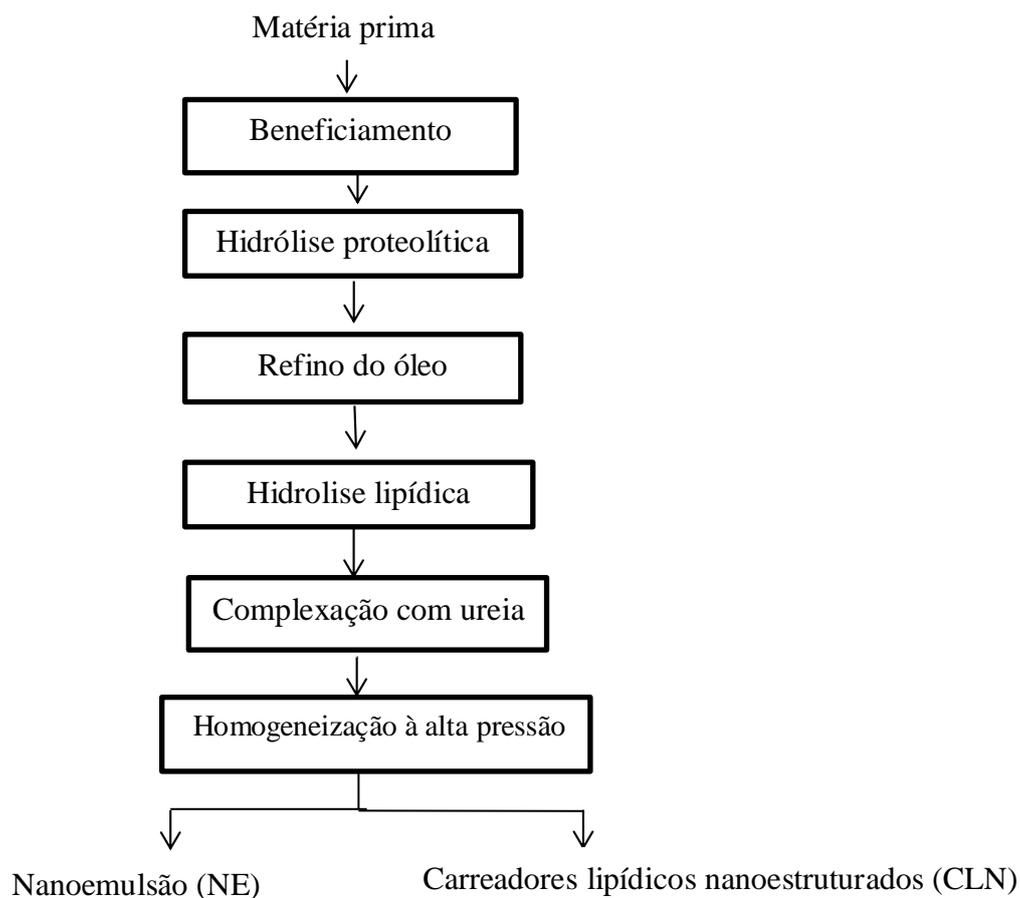
4.2 MÉTODOS

O processo utilizado para obtenção dos transportadores lipídicos nanoestruturados contendo astaxantina, foi didaticamente dividido em duas partes. A primeira etapa foi a

obtenção de concentrados de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT) e a segunda etapa foi o desenvolvimento dos nanocarreadores lipídicos contendo astaxantina.

Na figura 6 apresentam-se as principais etapas do trabalho experimental as que serão explicados com maiores detalhes a continuação.

Figura 6 – Fluxograma geral do desenvolvimento do trabalho experimental



Fonte: Adaptado de AL SAYED et al., 2008; GAMEZ MEZA et al., 2003; LACATUSU et al., 2012; SHAH et al., 2014.

4.3 PROCESSO DE OBTENÇÃO DE CONCENTRADOS DE ACIDOS GRAXOS INSATURADOS DE TAINHA (CAGIT)

Os processos de obtenção do CAGIT incluíram as etapas de beneficiamento de pescado, separação do óleo pela hidrolise proteolítica, refino de óleo bruto, hidrolise lipídica pelas lipases e complexação com ureia.

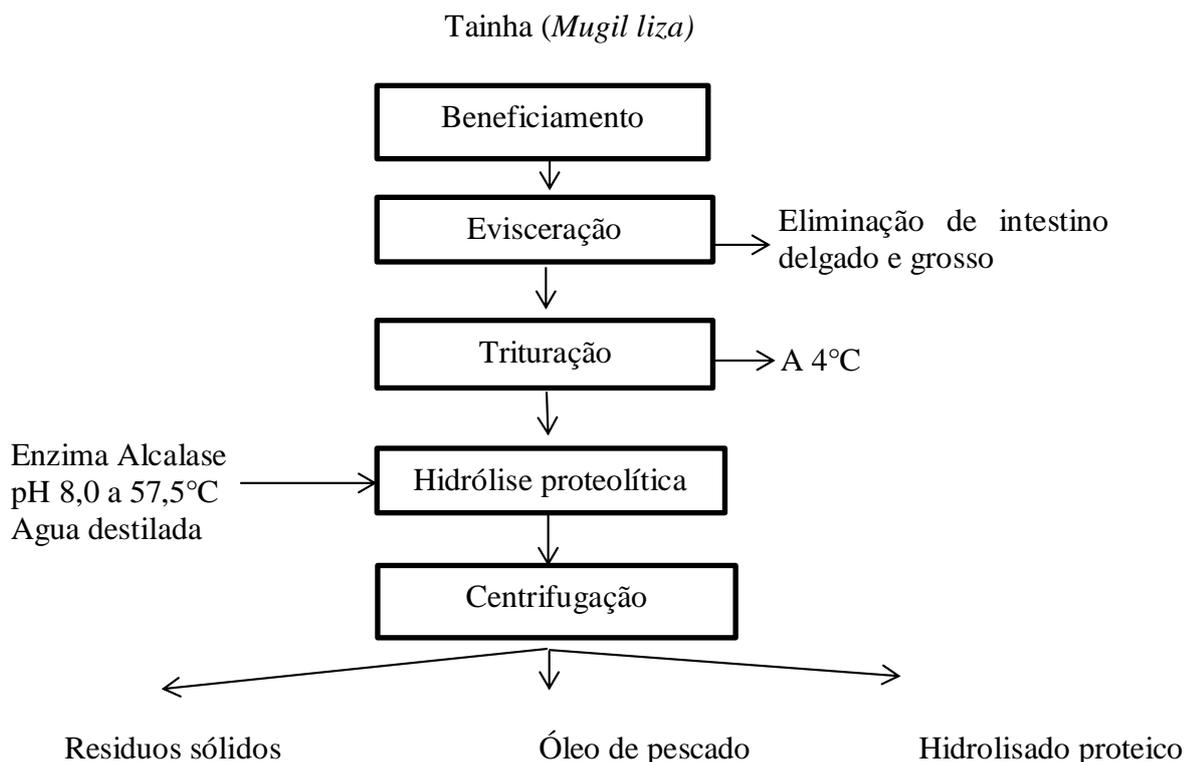
4.3.1 Beneficiamento do pescado

A tainha inteira foi descamada e submetida à eliminação dos intestinos antes do processamento. Depois foi triturada e homogeneizada a 4°C em cutter METVISA 1322 (Santa Catarina, Brasil).

4.3.2 Separação de óleo de pescado por hidrólise proteolítica.

O óleo de pescado foi separado das proteínas por hidrólise enzimática com a protease Alcalase (Figura 7) utilizando a metodologia descrita por Linder et al. (2003). Os ensaios foram todos desenvolvidos utilizando lotes de 0,30 kg de tainha triturada inteira, misturada com água destilada em proporção de 1:2,5 (m/m) tainha/água e foram homogeneizadas em blender. Logo foram transferidos para um reator encamisado (Figura 8), agitadas com um agitador eixo hélice, o pH ajustado a 8,0 com solução de NaOH 2 mol/L. Foi adicionada a enzima Alcalase numa proporção de 1,5% do peso da tainha e as condições foram monitoradas utilizando o método pH-stat (ADLER-NISSEN, 1986), adicionando-se continuamente com NaOH 2 mol/L, de modo a manter o pH constante considerando tempos e temperaturas, conforme o planejamento experimental mostrado na Tabela 4.

Figura 7- Fluxograma de separação de óleo por hidrólise proteolítica



Os ensaios experimentais foram realizados de acordo com um planejamento completo 2^2 com três repetições no ponto central, totalizando 7 ensaios. Este modelo foi empregado para avaliar a influência das variáveis independentes temperatura e tempo de reação (Tabela 4) sobre as variáveis respostas definidas como o grau de hidrólise e rendimento em óleo produzido. Os valores de temperatura e tempo estudados nesta pesquisa foram escolhidos de acordo a estudos feitos pelo LINDER, FANNI E PARMENTIER (2005); LIU et al. (2006); AL-SAYED et al. (2008) KUROZAWA; PARK; HUBINGER, 2009; QIAN; ZHANG e LIAO, 2011.

Figura 8- Reator utilizado para a separação de óleo de tainha por hidrólise proteolítica.

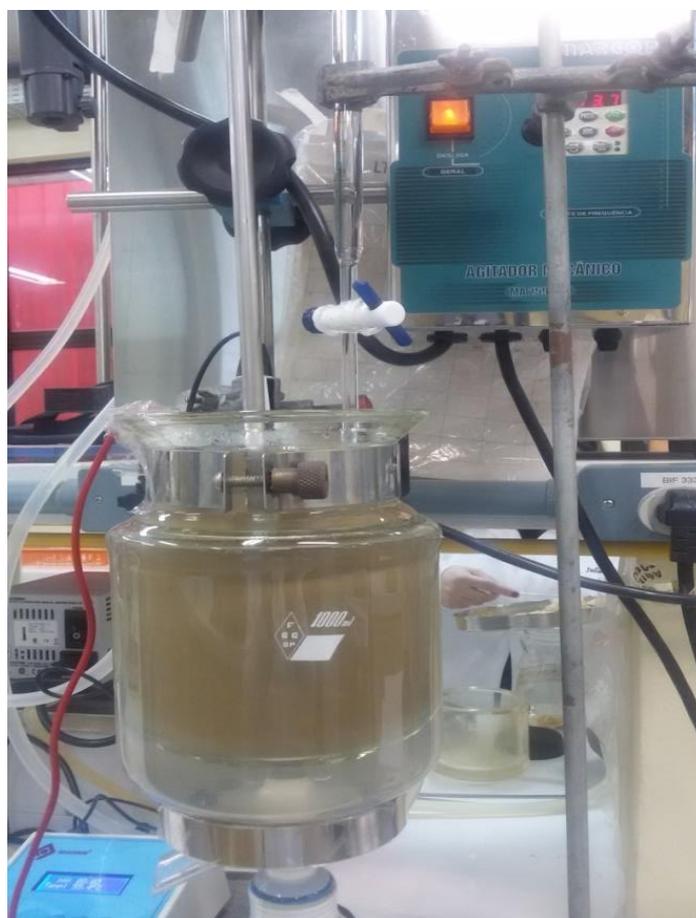


Tabela 4 – Variáveis do planejamento fatorial 2^2 para estudo dos efeitos de tempo e temperatura na hidrólise proteolítica de tainha

Valores codificados	-1	0	1
Temperatura de hidrólise (°C)	55	57,5	60
Tempo de hidrólise (min)	120	210	300

Os ensaios foram realizados, segundo a matriz mostrada na Tabela 5. Os resultados do planejamento fatorial com pontos centrais foram usados para ajustar uma equação polinomial de primeira ordem e avaliados de acordo com os efeitos de cada variável de entrada e suas interações, verificando a validade da equação obtida tanto em termos de coeficiente de determinação.

Tabela 5 – **Matriz do Planejamento fatorial**

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Variáveis codificadas	
			x ₁	x ₂
1	55	120	-1	-1
2	60	120	1	-1
3	55	300	-1	1
4	60	300	1	1
5	57,5	210	0	0
6	57,5	210	0	0
7	57,5	210	0	0

4.3.3 Refino do óleo de tainha.

Depois da centrifugação da etapa anterior, o óleo de tainha ficou em seu estado bruto, no entanto, este apresentava impurezas e compostos como ácidos graxos livres, mono e diacilgliceróis, fosfatídeos e produtos de oxidação lipídica, que o tornavam inadequado para o consumo humano. Para realizar a purificação foi utilizada metodologia adaptada de Crexi (2010). As operações de refino (Figura 9) têm por objetivo remover compostos indesejáveis, proporcionando assim produtos satisfatoriamente puros e com características de estabilidade (acidez, cor, oxidação e sensorial). O refino químico alcalino inclui as seguintes etapas: degomagem, neutralização, lavagem, secagem e branqueamento (CREXI, 2010).

A primeira etapa utilizada para o refino foi a degomagem, que foi realizada durante 30 min, a temperatura de 80 °C e agitação de 600 rpm, adicionou-se 1,0% de ácido fosfórico (85% v/v), em relação à volume de óleo (Figura 10). A etapa de neutralização ocorreu durante 20 min, a 40 °C e com agitação magnética de 600 rpm, com adição de solução de hidróxido de sódio (20% m/m, usando 4,0% de excesso em relação ao índice acidez determinado após a etapa de degomagem). Após cada etapa, o material foi centrifugado (Sigma 6-15, D-37250, Alemanha) por 20 min a 7500 xg para separação do óleo.

A etapa de lavagem consistiu em adicionar 10% de água destilada em relação à massa de óleo a 95 °C durante um tempo de contato de 10 min, com agitação de 600 rpm e temperatura de óleo a 50 °C. Esta etapa foi realizada três vezes. A etapa de secagem ocorreu durante 20 min à temperatura a 90–95 °C e agitação de 600 rpm. A etapa de branqueamento foi realizada a 70 °C e agitação de 40 rpm, com a adição de 5% de adsorvente (mistura de terra ativada e carvão ativado na relação de 9:1), sendo o tempo de contato de 20 min. Após foi realizada a filtração em funil de Büchner com uma pré-camada de terra de diatomácea. Todas as etapas do processo de refino (degomagem, neutralização, lavagem, secagem e branqueamento) foram realizadas sob vácuo de aproximadamente 720 mm Hg (CREXI, 2010).

Figura 9 - Fluxograma de refino de óleo de tainha

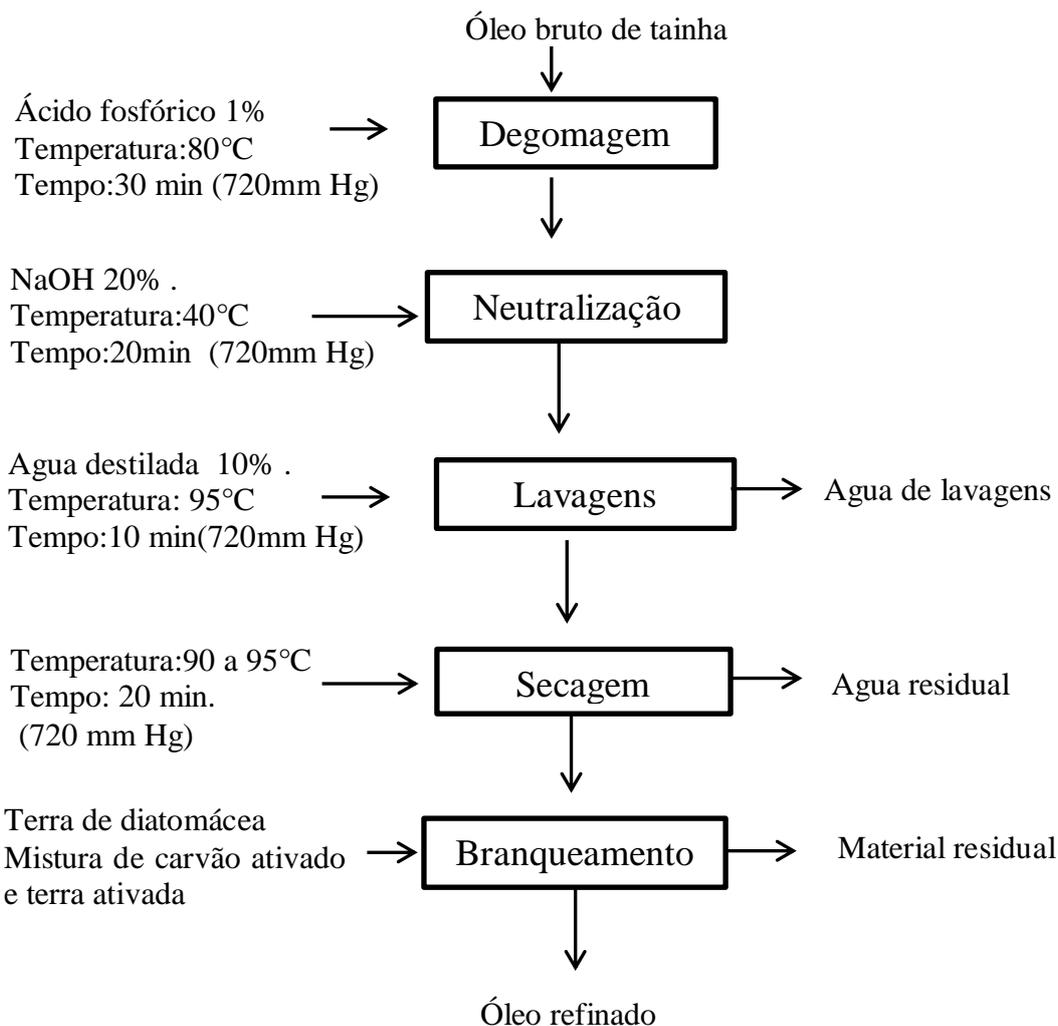
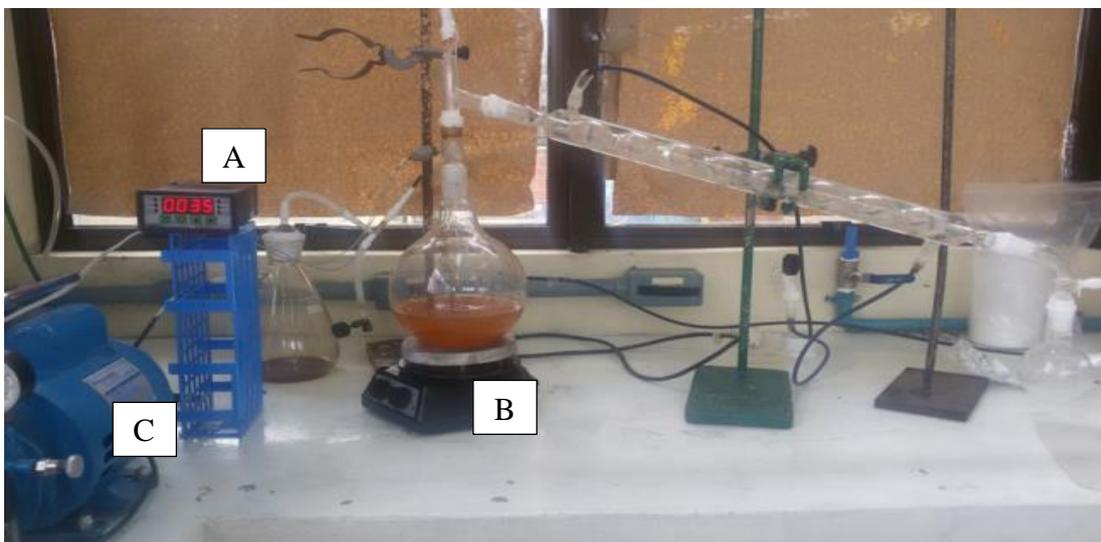


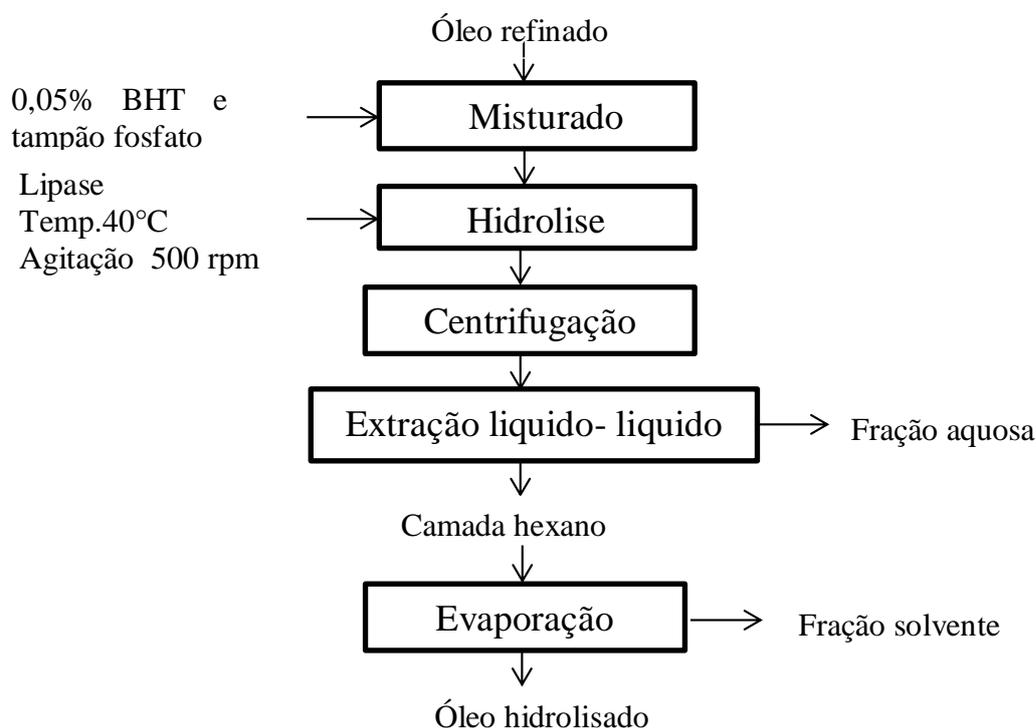
Figura 10 – Refino de óleo de tainha na etapa de degomagem.



A: termopar, B: balão de reação sob vácuo, C: bomba de vácuo.

4.3.4 Hidrólise enzimática do óleo de tainha.

Para a hidrólise enzimática (ver Figura 11) do óleo foi utilizada a metodologia adaptada de Gamez Meza et al. (2003), onde o óleo de tainha (12mL) foi adicionado de 0,05% m/m butil-hidroxitolueno (BHT), e tampão fosfato (18 mL de uma solução 0,1 N, pH 7,0) estes foram colocados em frascos de vidro de 50 mL. Para iniciar a reação, foram adicionadas ao óleo refinado as lipases [lipase de *Candida antártica* (LYP) e de lipase de *Candida rugosa* (AMA)] em concentrações de 0,25; 0,50 ou 0,75% (m/m base de óleo). Logo os frascos foram lavados com nitrogênio, selados com tampas de borracha e parafilme e colocados em uma incubadora a 40 °C com agitação de 500 rpm, foram retiradas amostras nos tempos de 1 h, 2,5 h, 3,5 h e 4,5 h. Depois de 4,5 h de hidrólise a mistura de reação (1 g) foram retiradas para medir o índice de acidez, logo foi centrifugada a 7500xg por 15 min, para separar a água e a enzima. Os glicerídeos foram extraídos com 10 mL de hexano por duas vezes, após a adição de 3,5 mL de KOH 0.5 M (solução de metanol) para neutralizar os ácidos graxos liberados durante a hidrólise, o hexano foi separado por evaporação. Os ácidos graxos livres foram metiladas de acordo com o método descrito na metodologia analítica. Finalmente a fração de lipídios hidrolisada foi mantida a -30 °C até que a complexação com ureia fosse realizada (GAMEZ MEZA et al., 2003).

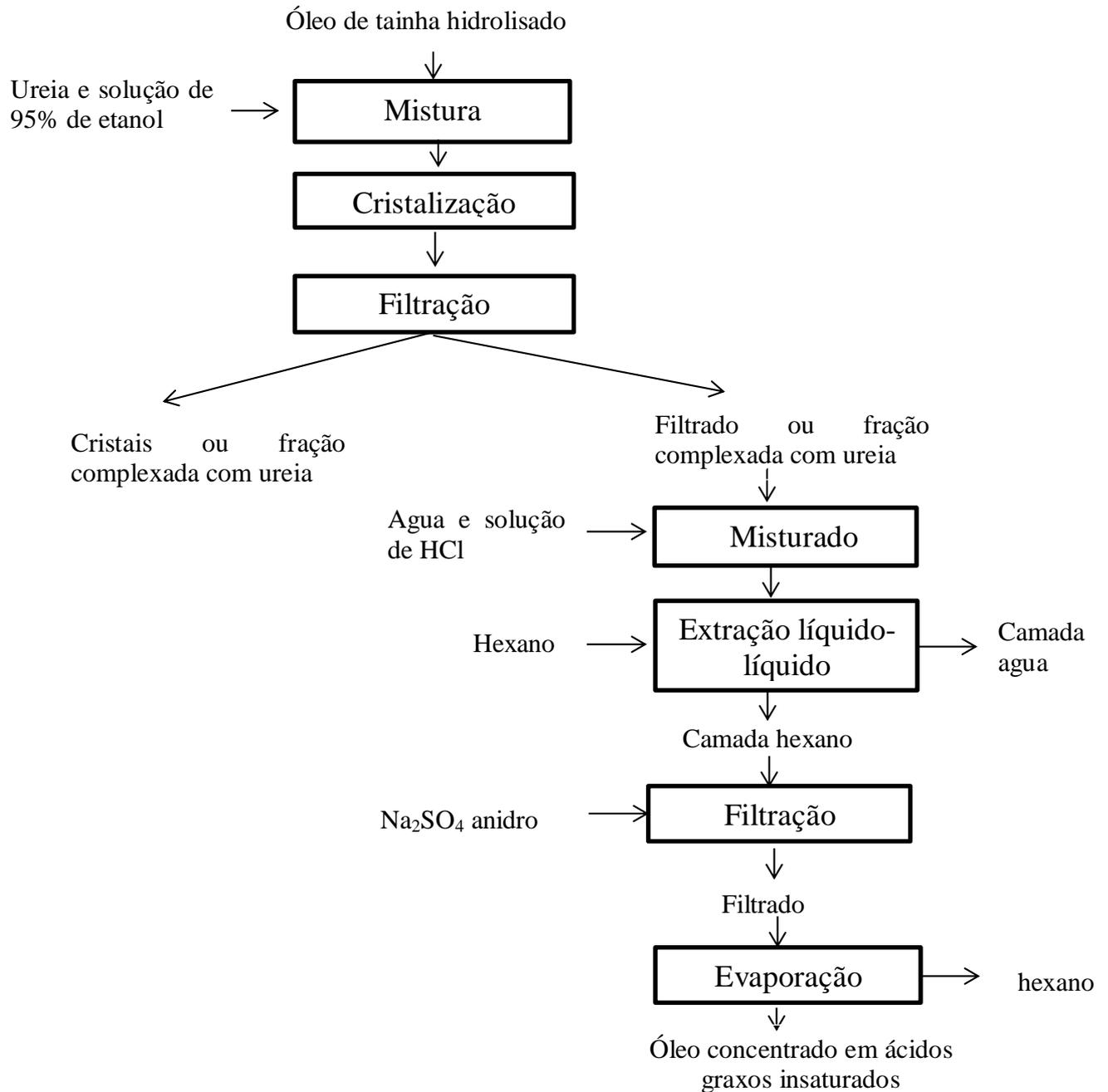
Figura 11- Hidrolise enzimática do óleo refinado de tainha

Fonte: Adaptado de Gamez Meza et al., 2003.

4.3.5 Complexação com ureia

A complexação com ureia foi realizada para concentrar ácidos graxos insaturados. Para tal foi utilizada a metodologia adaptada de Gamez Meza et al. (2003) ver Figura 12.

O óleo hidrolisado (15 g) foram misturados com ureia (15 g) em solução com 95% de etanol aquoso (100 mL) e aquecida com agitação até que toda a mistura transformasse em uma solução límpida homogênea (WANASUNDA E SHAHIDI, 1999). Esta solução foi transferida para tubos de centrífuga e resfriada rapidamente por imersão em água fria, e mantida a -10 °C durante 24 h num Banho ultra termostático (Quimis, mod. 021412, Brasil) Os cristais foram removidos por filtração em lá de vidro a vácuo. O filtrado foi acidificado a pH 4,0 e foram adicionados volumes iguais de água a 65 °C e hexano. Depois foi agitada vigorosamente por 60 min, para a separação de fases foi colocada em funil de separação e a camada de hexano foi lavada com água destilada (igual volume) e separada a água. Após foi adicionado sulfato de sódio anidro e o solvente restante foi removido por evaporação a 40°C (CREXI et al., 2012), a massa de ácidos graxos livres foi determinado por gravimetria e o rendimento foi calculado pelo conteúdo inicial de ácidos graxos poli-insaturados (Adaptado de Crexi, 2010).

Figura 12- – Fluxograma da Complexação com ureia

Fonte: Adaptado de Wanasundara e Shahidi , 1999; Gamez Meza, et al., 2003

Finalizada esta etapa foi feita a determinação do perfil de ácidos graxos do óleo concentrado de tainha (CAGIT) utilizando o método descrito na parte de metodologia. O óleo concentrado em ácidos graxos foi mantida a -30 °C até que foi utilizado nas etapas seguintes.

4.4 OBTENÇÃO DOS NANOCARREADORES LIPIDICOS CONTENDO ASTAXANTINA

As nanoemulsões (NE) e os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) contendo astaxantina foram desenvolvidos, através da técnica de homogeneização à alta pressão (MULLER et al., 1993). O equipamento utilizado foi um homogeneizador EmulsiFlex-C3 (Avestin, Canada). Em um teste preliminar foram testadas diferentes formulações apresentadas no Apêndice 01, Tabela A-2 sendo avaliados diferentes surfactantes (lecitina de ovo [Lipoid, Switzerland], TWEEN 80 [Sigma Aldrich Brasil], Estearato de Polietilenoglicol – Solutol[Sigma–Aldrich, USA]) e lipídios (concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha, cera de carnaúba [Lipoid, Switzerland], trimiristina, Dynasan 116 [Sigma Aldrich Brasil] e ácido oleico [Synth ,São Paulo, Brasil]). Para o desenvolvimento dos CLN fizeram-se ainda testes com misturas de cera carnaúba e concentrado de ácidos graxos insaturados (CAGIT) em proporções de 70:30, 80:20 e 90:10 (m:m).

Após escolhidos os melhores excipientes para o preparo dos nanocarreadores foram desenvolvidas as formulações apresentadas na Tabela 6. Para o preparo das nanoemulsões (NE) foram utilizados os lipídios do concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT) e o ácido oleico e para o preparo dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) foram utilizados a cera de carnaúba, os lipídios do concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT) e o ácido oleico. A astaxantina foi acrescentada na fase oleosa da formulação, assim como o Span 80. A fase aquosa da formulação estava composta por Tween 20 e água.

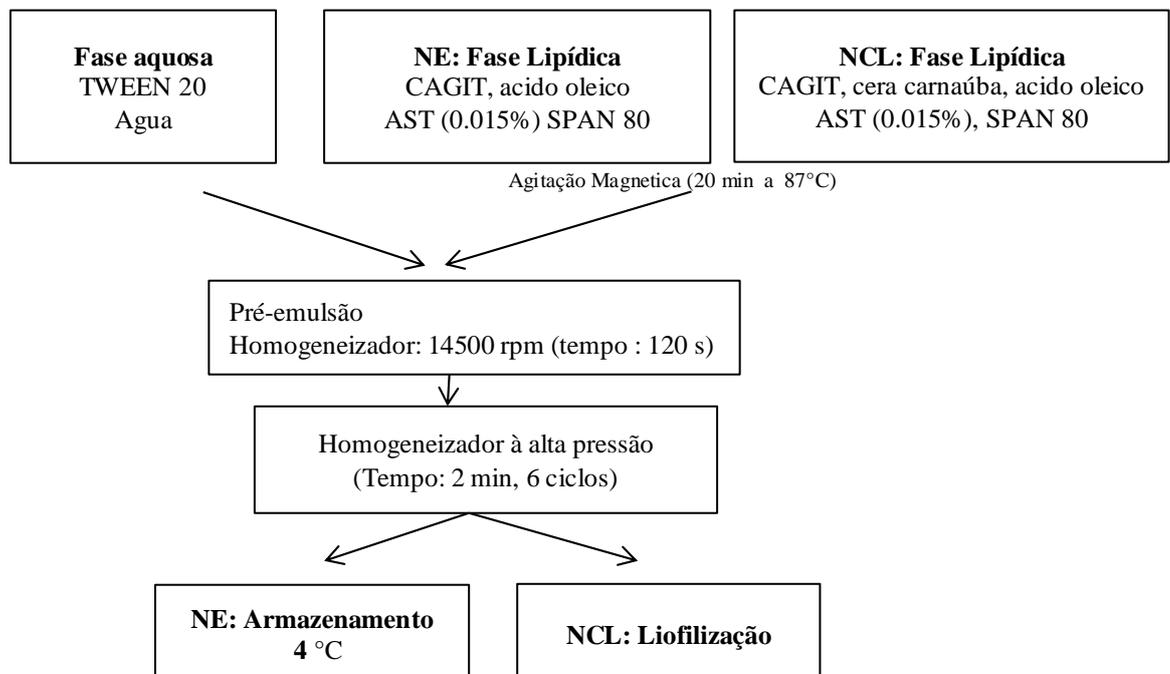
Tabela 6 - Composição das formulações dos nanocarreadores lipídicos desenvolvidos.

Formulação	CAGIT (mg)	Ácido oleico (mg)	Cera carnauba (mg)	Span80 (mg)	AST (mg)	Tocoferol (mg)	Tween 20 (mg)
NE1B	800	-	-	200	-	50	200
NE2B	350	350	-	300	-	50	300
NE1AST	800	-	-	200	5,0	50	200
NE2AST	350	350	-	300	1,5	50	300
CLN1B	240	-	560	200	-	50	200
CLN2B	105	105	490	300	-	50	300
CLN1AST	240	-	560	200	5,0	50	200
CLN2AST	105	105	490	300	1,5	50	300

AST (astaxantina), CAGIT(Concentrados de ácidos graxos insaturados), NE1B e NE2B (nanoemulsões brancas), NE1AST e NE2AST(nanoemulsões com AST), CLN1B e CLN2B (Carreadores lipídicos nanoestruturados brancos), CLN1AST e CLN2AST (carreadores nanoestruturados com astaxantina).

Para a produção dos nanocarreadores pela técnica de homogeneização a alta pressão, primeiramente a fase oleosa, composta por lipídeos, tocoferol, astaxantina e span 80 foi fundida. A fase aquosa, composta por água e o surfactante, foi aquecida 10°C acima da temperatura de fusão dos lipídeos e vertida na fase oleosa, formando uma pré-emulsão que foi submetida a agitação de 13.500 rpm por 2 minutos em Ultra-Turrax. A pré-emulsão formada (10 mL) foi vertida no homogeneizador de alta pressão sendo feitos 6 ciclos de 20 segundos cada, totalizando 2 minutos com a pressão de 10.000 psi. As NEs foram mantidas a 4 °C e os CLNs foram congelados a -80°C por 72h e liofilizados (LIOBRAS, modelo L108) para remover o excesso de água e obter os carreadores lipídicos nanoestruturados em pó. As formulações foram produzidas em triplicata (Figura 13).

Figura 13 - Fluxograma de obtenção de nanocarreadores lipídicos contendo astaxantina



4.5 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.5.1 Caracterização da tainha

Nesta etapa foi feita a caracterização da tainha através de determinação do teor de proteínas (método de Kjeldhal – N x 6,25), lipídios (método de Soxhlet), cinzas (incineração e mufla a 550-600°C) e umidade (estufa 105°C), métodos 31.1.08, 31.4.02, 31.1.04 e 31.1.02,

respectivamente, conforme a AOAC (2000). O teor de carboidratos totais foi estimado por diferença.

4.5.2 Grau de hidrólise

A cinética da reação foi monitorada medindo o grau de hidrólise usando o método de pH-stat de acordo com o procedimento de Adler-Nissen, (1986), representado na equação 1. Após isso, a mistura foi resfriada a 4°C antes da centrifugação. As amostras da mistura de reação foram retiradas para análise e centrifugadas (BIOSYSTEMS MPW-350/350-R – Brasil) para recuperar o óleo (9000 x g durante 20 min).

$$GH(\%) = \frac{1}{\alpha \cdot h_{tot}} + \frac{B \cdot N_B}{MP} \cdot 100 \quad (1)$$

Onde: B é o volume da base consumida durante a hidrólise para manter o pH constante (mL); N_B é a normalidade da base; MP é a massa de proteína inicial (g, determinado em $N \times$ fator de Kjeldahl); α é o grau de dissociação; e h_{tot} é o número total de ligações peptídicas antes da reação. O grau de dissociação é dado pela Equação 2.

$$\alpha = \frac{10^{pH-pk}}{1+10^{pH-pk}} \quad (2)$$

Onde: α é o grau de dissociação, pH é constante, pK varia com a temperatura.

Os valores de pK a diferentes temperaturas T (Kelvin) foram calculados a partir de Steinhart e Beychok (1964) a través da Equação 3.

$$pK = 7,8 + \frac{2,98-T}{298 \cdot T} \cdot 2400 \quad (3)$$

Onde: T é dada em graus Kelvin.

4.5.3 Porcentagem de óleo hidrolisado

A porcentagem de hidrólise (%hidrólise do óleo) depois do tratamento enzimático foi calculada de acordo com a Equação 4.

$$\%hidrólise = \frac{\text{Índice acidez}_{\text{óleo hidr.}} - \text{Índice acidez}_{\text{óleo nao hidr.}}}{\text{Índice sapon.}_{\text{óleo nao hidr.}} - \text{Índice acidez}_{\text{óleo nao hidr.}}} \quad (4)$$

A porcentagem de hidrólise foi definida sabendo-se que o índice de saponificação menos o índice de acidez nos mostra a quantidade de ligações ésteres que poderiam ser hidrolisadas e o índice de acidez do óleo hidrolisado menos o não hidrolisado nos mostra a quantidade que foi hidrolisada pela enzima.

4.5.4 Caracterização do óleo de pescado

A partir da obtenção do óleo de pescado, foi feita a caracterização do mesmo utilizando os métodos recomendados pela American Oil Chemist's Society, (AOCS, 1995). Os parâmetros para caracterização foram os seguintes.

- Índice de Acidez (IA) (AOCS Ca 5-40) Para esta determinação dissolveu-se o óleo em um dissolvente neutro e titulou-se a acidez com hidróxido de sódio, utilizando fenolftaleína como indicador.

- Índice de Iodo (II) (AOCS Cd 1-25). Na presença da solução de iodo-cloro, titulou-se com tiosulfato de sódio, tendo uma solução de amido como indicador, indicando a saturação de óleos e gorduras, expressa em número de gramas de iodo absorvido por 100g de amostra.

- Índice de peróxido (IP) (AOAC 1997) Titulou-se com tiosulfato de sódio, tendo amido como indicador, indicando a oxidação dos lipídios, caracterizados principalmente pela presença de compostos de baixo peso molecular provenientes de sua degradação.

- Índice de Saponificação (IS) (AOCS Cd 36-76). Após esquentar a amostra de óleo sob-refluxo, juntamente com solução de KOH e com auxílio de fenolftaleína, titulou-se com ácido clorídrico e define-se qual a quantidade de álcali necessária para saponificar uma quantidade definida de óleo ou gordura, sendo expresso em número de miligramas de KOH necessárias para saponificar 1,0 g de óleo.

4.5.5 Determinação do perfil de ácidos graxos das amostras.

Para determinar o perfil de ácidos graxos foi necessário esterificar os ácidos graxos componentes do óleo, do óleo hidrolisado e do óleo não complexado para isso foi utilizado o método adaptado de Metcalfe, Schmitz e Pelke (1966). A esterificação dos lipídios consistiu na saponificação de 0,1 g de amostra com 5 ml de KOH/Metanol 0,5 N sob ebulição por 15 min. Após o resfriamento a reação de esterificação com metanol foi catalisada pelo trifluoreto de boro (15 mL BF₃ 20 % diluído 1:1 com metanol) sob ebulição em refluxo

por 7 min. Após o segundo resfriamento, foram adicionados 15 mL de éter de petróleo e 15 mL de NaCl saturado. A fração éter for recolhida e o processo repetido por duas vezes com 25 mL de éter de petróleo. A fração orgânica foi lavada duas vezes com 25 mL de água destilada, filtrada em sulfato de sódio anidro e o solvente evaporado sob corrente de nitrogênio. O resíduo foi solubilizado com 10 mL de hexano para injeção no cromatógrafo. Para separar e quantificar a mistura de ácidos graxos esterificados, foi empregado Cromatógrafo a gás (Shimadzu, 2010 Plus), equipado com injetor split/splitless, coluna capilar RTX®-1 (30 m x 0,25 mmID x 0,25 µm) e detector por ionização de chama (DIC). O gás de arraste foi hélio em uma vazão de 1,25 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 260 °C, sendo o volume injetado de 1 µL. As condições cromatográficas de separação foram temperatura inicial da coluna 50 °C, elevando-se para 200 °C, em uma taxa de 6 °C/min, permanecendo nesta temperatura por 4 min. Na segunda rampa de temperatura a taxa de aumento foi de 2 °C/min até 240 °C, permanecendo por 10 min. A comparação dos tempos de retenção com padrões de ésteres metílicos foi usada para identificação do perfil de ácidos graxos das amostras e quantificados pela normatização das áreas.

4.5.6 Determinação do diâmetro médio e do índice de polidispersão dos nanocarreadores lipídicos

O tamanho de partícula e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento de luz dinâmico utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, RU). As medições de tamanho de partícula foram realizadas a 25 °C após diluição adequada das amostras em solução de 0,1mM de cloreto de sódio utilizando água Milli - Q®. Cada análise de tamanho teve a duração de 300 s e foi realizada com ângulo de detecção de 90°. O raio hidrodinâmico foi determinado usando a equação de Stokes – Einstein apresentada como equação 5.

$$R = (\kappa_B \cdot T / 6 \pi \eta D) \quad (5)$$

Onde κ_B é a constante de Boltzmann (J / K), T é a temperatura (em K), D é o coeficiente de difusão e η é a viscosidade do meio - neste caso, da água ($\eta = 0,89$ cP a 25°C).

4.5.7 Avaliação do potencial zeta

Esta medição é realizada para medir a carga da superfície das partículas é quantificada como potencial zeta (ζ) refere-se à mobilidade electroforética das partículas num campo eléctrico (DAS e CHAUDHURY, 2011). Os valores de potencial zeta podem indicar estabilidade das amostras quando eles apresentam valores superiores a +30.0 mV ou inferiores a -30.0mV (LACATUSU et al., 2014).

O potencial zeta foi avaliado por anemometria laser doppler, utilizando-se o equipamento Zetasizer Nano Series (Malvern Instruments, Worcestershire, RU) apresentado na Figura 14. Para as medições do potencial zeta, as amostras foram colocadas na célula electroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido. Os valores de potencial zeta são calculados como valores médios da mobilidade electroforética (LACATUSU et al., 2013).

4.5.8 Determinação do teor de astaxantina nos nanocarreadores lipídicos.

Para determinar o teor de astaxantina, uma alíquota de 1mL NE e CLN foram dissolvidas em metanol. O teor de astaxantina (concentração total) das suspensões coloidais foi calculado após a determinação da concentração da astaxantina nas soluções de metanol e foi expresso em μg de AST/mL de solução. A recuperação de astaxantina foi calculada como sendo a porcentagem da concentração total da astaxantina encontrada nas soluções em relação à quantidade inicialmente adicionada. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

4.5.8.1 Validação do método analítico por espectroscopia UV/Vis

As medidas foram realizadas em um espectrofotômetro (Perkin Elmer Lambda 35, USA) utilizando-se uma cubeta de quartzo de 1 cm e detecção a 476 nm. O método de espectroscopia UV/Vis foi validado quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão, conforme descrito no International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005).

Especificidade

Para determinar a especificidade do método foram preparadas NE e CLN isentas de astaxantina (NEB e CLNB) e analisadas conforme descritas no item 4.5.8.1. As leituras das CLN e NE brancas foi comparada com a obtida a partir de uma solução padrão de astaxantina analisada nas mesmas condições.

Linearidade

A linearidade do método foi avaliada por meio de construção de três curvas de calibração, feitas em três dias diferentes, por meio de diluições adequadas de uma solução de astaxantina em álcool metílico, de modo a obter concentrações finais de 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 12,5; 15,0 µg/mL para as análises por espectroscopia. A partir dos resultados, gráficos de absorbância (UV/Vis) *versus* concentração de AST foram construídos. A equação da reta e o coeficiente de correlação (R) foram determinados pela análise da regressão linear utilizando-se o método dos mínimos quadrados.

Limite de quantificação e detecção

O limite de detecção (LD) é a menor quantidade do composto possível de ser detectada, sem necessariamente possível de ser quantificada de forma exata. O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade possível de ser quantificada de forma exata e precisa.

4.5.9 Determinação de calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria foi determinada em um calorímetro diferencial de varredura DSC (Shimadzu, DSC 60) utilizando uma taxa de aquecimento de 5°C/min, de 30 a 150°C com uma amostra variável de 2,5 a 4 mg sem adição de água.

A calorimetria exploratória diferencial (DSC) mede a diferença de energia necessária entre a substância analisada e um material de referência, enquanto ambos são submetidos a uma variação controlada de temperatura de maneira que a amostra e referência sejam mantidas em condições isotérmicas. Maiores informações sobre a cristalinidade, polimórfica, temperatura de fusão entalpia e o grau de cristalização do lipídio fundido neste tipo de amostras podem ser obtidas por DSC.

4.6 TRATAMENTO DOS DADOS

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados das análises obtidas na etapa de hidrólise, seleção da lipase na concentração de ácidos graxos poli-insaturados foram tratados estatisticamente utilizando análise de variância (ANOVA) e comparados através do teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Na etapa de separação do óleo pela hidrólise

proteolítica foi empregado um planejamento fatorial 2^2 com três pontos centrais, utilizando o modelo matemático apresentado na Equação 6, empregando o programa *Statistica 5.0*

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_{12}x_1x_2 + e \quad (6)$$

Adaptado de Rodrigues e Lemma (2012).

Onde b_0 , b_1 e b_2 , são os coeficientes de regressão chamados coeficientes de efeito linear do modelo, b_{12} é o coeficiente de regressão, chamado coeficiente de efeito de interação e x_1 e x_2 referem-se as variáveis.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATERIA PRIMA

Na Tabela 7 apresentam-se a composição proximal do músculo, vísceras e da tainha inteira em base úmida.

Tabela 7 - Composição química proximal de tainha

Componente	Músculo (%)*	Víscera (%)*	Inteira (%)*	Músculo (%) (FAO,2014)
Lipídios	4,23±0,83	12,54±0,09	9,33±0,86	3,90
Proteínas	20,35±0,23	11,36±0,97	16,12±0,25	19,50
Cinzas	1,14±0,03	3,34±0,38	2,86±0,12	-
Água	74,15±0,25	72,24±1,06	71,35±4,97	76,00

* média ± desvio padrão.

Visentainer et al. (2007) e FAO (2014) reportaram valores de lipídios para o músculo de tainha de 2,58 e 3,90%, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho reportaram 4,23% valores bem próximos para músculo. Assim, a porcentagem de proteína obtida foi de 20,35%; Menezes et al. (2008) reportaram 20,85% e a FAO (2014) reportou 19,5%. A porcentagem de cinzas e água reportados por Menezes et al. (2008) de 1,06% de cinzas e 78,40% de água também foram muito similares aos obtidos nesta pesquisa de 1,14% e 74,15% respectivamente.

Comparando os valores de lipídios analisados entre músculo, vísceras e tainha inteira, o maior conteúdo foi encontrado nas vísceras, mas seria importante trabalhar com o pescado inteiro porque mediante testes preliminares observou-se que fazendo a hidrólise proteolítica só com as vísceras o grau de hidrólise obtido foi muito baixo por apresentar menor quantidade de proteínas. A diferença observada no conteúdo de lipídios entre víscera e a tainha inteira não é muito grande. Por isso nesta pesquisa foi usado o pescado inteiro como matéria prima.

5.2 SEPARAÇÃO DE ÓLEO DE PESCADO POR HIDRÓLISE PROTEOLÍTICA

Os produtos resultantes da hidrólise proteolítica foram o hidrolisado proteico e o óleo. Os resultados experimentais de grau de hidrólise proteolítica e rendimento do óleo de tainha sob diferentes condições de temperatura e tempo de hidrólise estão apresentados na Tabela 8. Onde pode ser observado que o grau de hidrólise e o rendimento foram

incrementados em função aos parâmetros temperatura e tempos. Também as respostas são maiores quando o tempo é incrementado.

Tabela 8 – Grau de hidrólise e Rendimento em óleo do Planejamento experimental de hidrólise proteolítica de tainha.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo (min)	Grau de hidrólise(%)	Rendimento (%)
1	55,0	120	26,45	68,14
2	60,0	120	26,96	83,32
3	55,0	300	26,54	73,21
4	60,0	300	29,45	88,14
5	57,5	210	26,97	79,76
6	57,5	210	27,03	80,09
7	57,5	210	27,39	80,13

Temperatura (°C), Tempo(min), Grau de hidrolise(%), Rendimento(%)

Com os resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão para a resposta o grau de hidrólise (%), e estão apresentados na Tabela 9 onde pode se observar a variação da resposta (R^2) indicou o coeficiente de determinação da regressão efetuada. O valor obtido mostra que cerca de 97% dos pontos se ajustam ao modelo, demonstrando ser bom o ajuste do modelo aos dados experimentais. Todos os parâmetros do modelo foram significativos ao nível de 5%.

Tabela 9 - Coeficiente de regressão para o grau de hidrólise proteolítica de tainha

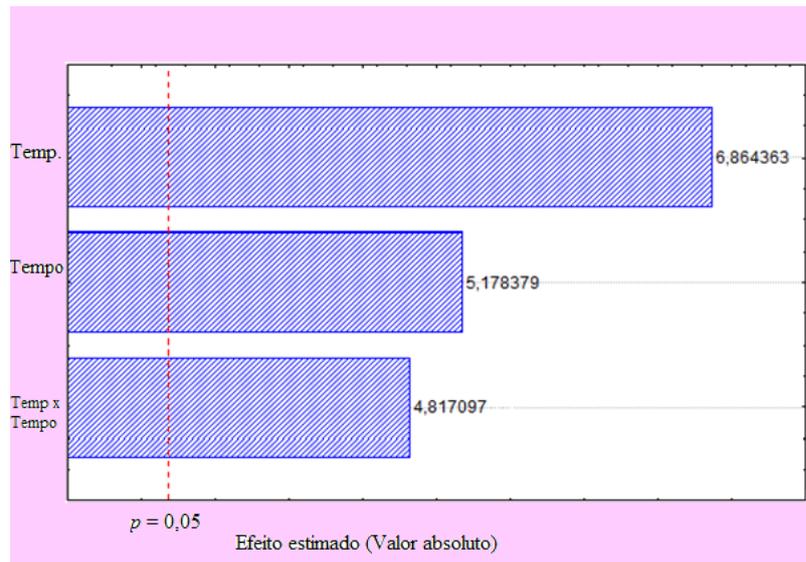
Interações	Coef. de regressão	Erro padrão	p – valor
Constante	27,26	0,09	0,0000
Temperatura	0,86	0,13	0,0063
Tempo	0,65	0,13	0,0139
Temperatura x Tempo	0,60	0,13	0,0170

$R^2 = 97\%$

Com os coeficientes de regressão obtidos na Tabela 9, e tendo que todos os parâmetros do modelo foram altamente significativos ($p < 0,05$) e se construí o modelo matemático empírico encontrado apresentado na Equação 7.

$$\text{Grau de Hidrolise} = 0,86 \times \text{Temperatura} + 0,65 \times \text{Tempo} + 0,60 \times \text{Temperatura} \times \text{Tempo} + 27,26 \quad (7)$$

Na Figura 14, apresenta o diagrama de Pareto, onde a temperatura é o fator que mais influenciou na resposta Grau de hidrolise, mas o fator tempo e a interação tempo temperatura também influenciam na resposta grau de hidrolise ($p < 0,05$).

Figura 14 - Diagrama de Pareto para o grau de hidrólise proteolítica de tainha

Na Tabela 10, estão apresentados os resultados da análise de variância (ANOVA). Como o F calculado para a regressão foi 4 vezes mais o que F tabelado então, o modelo se ajusta bem aos dados experimentais. Segundo Rodrigues e Lemma (2012), para que a regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor de F calculado dever no mínimo 4 vezes maior que o F tabelado. Desta forma, o modelo estatístico determinado para a porcentagem de grau de hidrólise foi preditivo.

Tabela 10 - ANOVA para o Grau de Hidrólise proteolítica de tainha

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Quadrados médios	F Calculado	p -valor
Regressão	6,03	3	2,01	36,62	0,001
Resíduos	0,18	3	0,06		
Total	6,21	6			

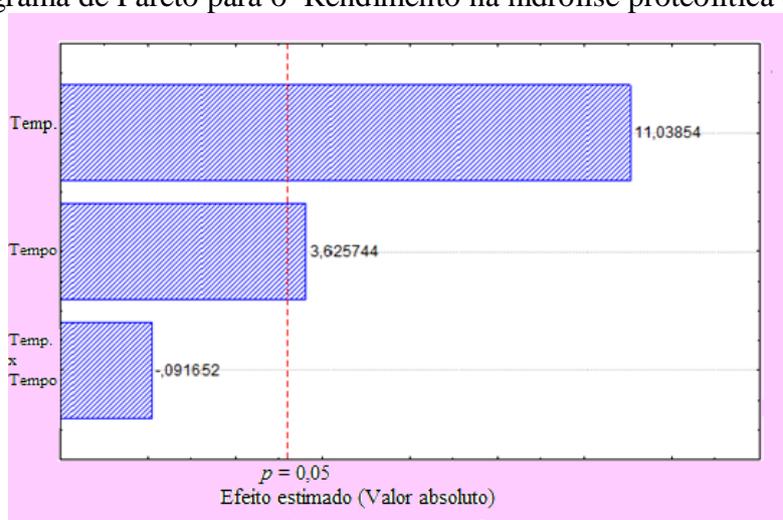
F tabelado = 9,28

A Tabela 11 apresenta os valores de % de grau de hidrólises obtidos de forma experimental, comparando com os valores previstos (estimados) pelo modelo para o grau de hidrólise, os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do planejamento experimental. Pode-se observar que os desvios foram baixos na região estudada.

Tabela 11 - Valores experimentais e valores estimados de grau de hidrólise proteolítica de tainha.

Ensaio	Resposta experimental	Resposta prevista	Desvio	Desvio relativo (%)
1	26,45	26,35	0,10	0,38
2	26,96	26,87	0,09	0,33
3	26,54	26,45	0,09	0,34
4	29,45	29,37	0,08	0,27
5	26,97	27,26	-0,29	-1,07
6	27,03	27,26	-0,23	-0,85
7	27,39	27,26	0,13	0,47

Na Figura 15 apresenta o diagrama de Pareto onde pode ser observado com exceção da interação tempo e temperatura (X_1X_2), todos os parâmetros do modelo foram significativos a 5% de probabilidade, que indica que a interação entre a temperatura e o tempo não influenciam no % de rendimento e que a temperatura influencia mais que o tempo na resposta % rendimento.

Figura 15 - Diagrama de Pareto para o Rendimento na hidrólise proteolítica de tainha.

Com os resultados obtidos também foi possível determinar os coeficientes de regressão para o Rendimento (%), e estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Coeficiente de regressão para o Rendimento de hidrólise proteolítica de tainha.

Interações	Coef. de regressão	Erro padrão	p - valor
Constante	78,97	0,45	0,0000
Temperatura	7,53	0,59	0,0002
Tempo	2,47	0,59	0,0139

$R^2 = 98\%$

O modelo matemático empírico codificado encontrado para o Rendimento (Z) está apresentado na Equação 8.

$$\text{Rendimento} = 7,53 \times \text{Temperatura} + 2,47 \times \text{Tempo} + 78,97 \quad (8)$$

Na Tabela 13, estão apresentados os resultados da Análise de Variância (ANOVA) para a resposta Rendimento. Como F_c para a regressão foi 4,83 vezes maior que o F tabelado, demonstrando que a regressão é altamente significativa a 95% de nível de confiança e apresenta um bom coeficiente de determinação ($R^2=0,98$), deste modo, justificando 98% a variação total da resposta. Segundo Rodrigues e Lemma (2012), para que a regressão não seja apenas estatisticamente significativa, mas também útil para fins preditivos, o valor de F calculado deve ser no mínimo 4 vezes maior que o F tabelado. Desta forma, o modelo estatístico determinado para a porcentagem de rendimento foi também preditivo.

Tabela 13. ANOVA para o Rendimento de hidrólise proteolítica de tainha.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Quadrados médios	$F_{\text{calculado}}$	p -valor
Regressão	251,11	3	83,70	44,87	0,001
Resíduos	5,59	3	1,87		
Total	256,70	6			

$F_{\text{tabelado}}=9,28$

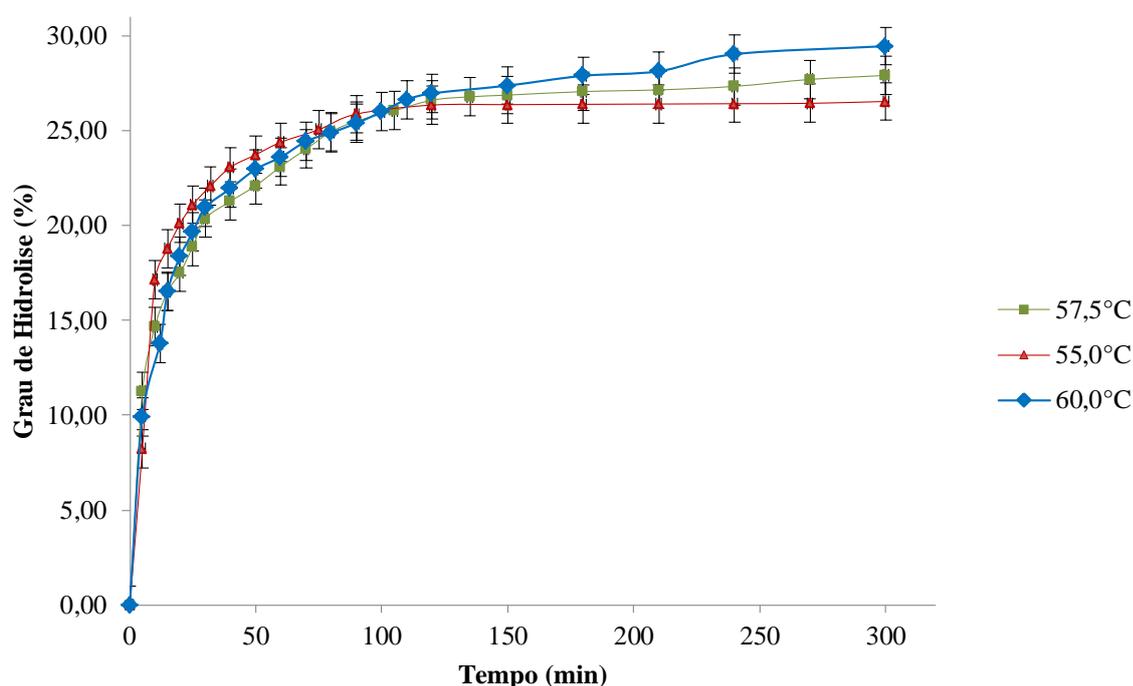
A Tabela 14 apresenta a comparação entre os valores experimentais de % de Rendimento e os valores estimados pelo modelo para o % rendimento, pode ser verificado que os desvios e os desvios relativos para cada ensaio do planejamento experimental apresentaram valores baixos na região estudada.

Tabela 14 - Valores experimentais e valores estimados de % Rendimento de hidrólise proteolítica de tainha

Ensaio	Resposta experimental	Resposta prevista	Desvio	Desvio relativo (%)
1	68,14	68,97	-0,83	-1,22
2	83,32	84,03	-0,71	-0,85
3	73,21	73,92	-0,71	-0,96
4	88,14	88,97	-0,83	-0,94
5	79,76	78,97	0,79	0,99
6	80,09	78,97	1,12	1,39
7	80,13	78,97	1,16	1,45

Na Figura 16, esta apresentada a cinética da hidrólise enzimática com Alcalase em três temperaturas diferentes, onde se observou, a alta taxa inicial de reação, quando um grande número de ligações é quebrado, seguida pela diminuição da taxa até alcançar uma fase estacionária, em que aparentemente não ocorreu mais a reação. Curvas de Grau de hidrólise similares foram obtidas por LINDER; FANNI e PARMENTIER (2003); QIAN; ZHANG e LIAO (2011).

Figura 16 - Cinética de hidrólise proteolítica com Alcalase de tainha a pH 8,0 a diferentes temperaturas



Após 300 min de proteólise com Alcalase o grau de hidrólise alcançou os valores entre 26,45 % e 29,45% e os ensaios 1,2,3,5, e 6 não apresentaram diferença significativa como é mostrado na Tabela 15.

Segundo os resultados apresentados na Tabela 15, pode se observar que o melhor rendimento e o maior grau de hidrólise foi obtido no ensaio 4, mas a qualidade do óleo foi afetada negativamente pelo alto índice de peróxidos ($20,76 \pm 0,09 \text{ meq.kg}^{-1}$) e alto % de ácido oleico ($3,29 \pm 0,08\%$), mas os óleos nos ensaios 5,6 e 7 de $57,5^\circ\text{C}$ e 210 min apresentaram rendimento ao redor de 80% e índice de peróxidos por debaixo do recomendado pela ANVISA(1999) que recomenda que os óleos brutos devem ter um índice de peróxidos no máximo de 20 meq.Kg^{-1} .

No ensaio 2, à temperatura de 60°C e tempo de 120 minutos, obteve-se um rendimento de 83,32% e um índice de peróxido mais baixo ($14,23 \pm 0,25 \text{ meq.kg}^{-1}$), dentro dos

níveis recomendados pela ANVISA(1999). Os resultados obtidos neste ensaio foram também interessantes, mas ainda o valor do índice de peróxidos esta um pouco elevado.

Tabela 15 - Caracterização do óleo obtido com os diferentes tratamentos de hidrólise proteolítica de tainha.

Ensaio	Temp. (°C)	Tempo (min)	Grau hidrolise (%)*	Rendimento (%)*	Índices	
					AGL (% ácido oleico) *	IP (meq peróxido Kg ⁻¹) *
1	55	120	26,45±0,47 ^c	68,14±0,13 ^d	0,84±0,03	3,37±0,13
2	60	120	26,96±0,12 ^{b,c}	83,32±0,25 ^b	2,45±0,31	14,23±0,25
3	55	300	26,54±0,07 ^c	73,21±0,19 ^c	2,68±0,13	8,95±0,09
4	60	300	29,45±0,31 ^a	88,14±0,11 ^a	3,29±0,08	20,76±0,09
5	57,5	210	26,97±0,04 ^{b,c}	79,76±0,60 ^e	1,35±0,86	4,99±0,21
6	57,5	210	27,03±0,07 ^{b,c}	80,09±0,13 ^e	1,32±0,70	5,02±0,32
7	57,5	210	27,39±0,12 ^b	80,13±0,30 ^e	1,29±0,16	4,92±0,77

Letras com sobrescritos diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa (P< 0,05). AGL, ácidos graxos livres; IP, índice de peróxido; * valor médio ± erro padrão (em triplicata).

Observando os resultados obtidos na caracterização dos óleos produzidos e os modelos matemáticos desenvolvidos neste planejamento experimental (Equações 10 e 11) que permitem obter os valores preditos, foram testados outros tratamentos e observou-se que com a temperatura de 58°C e utilizando 120 min de tempo seriam obtidos um rendimento de 78,38% e um grau de hidrolise de 26,68%, com esses dados previstos foram realizadas as extrações do óleo coincidindo os resultados experimentais com os preditos, como pode ser observado na Tabela 16.

Tabela 16 - Tratamento selecionado para hidrólise com Alcalase

Temp. selecionado	Tempo selecionado	Grau hidrólise predito	Grau hidrólise experim	Desvio relativo	Rendimento predito	Rendimento experim.	Desvio relativo
58°C	120 min	26,68%	26,03%	0,57	78,38%	78,87%	0,62

Resultados muito parecidos foram obtidos por Gbogouri et al. (2006) que trabalharam com salmão e a enzima Alcalase a uma temperatura de 60°C e 120 min. Finalmente o tratamento selecionado foi obtido a temperatura de 58°C e 120 min. utilizando a enzima alcalase numa proporção de 1,5% (m/m) e uma proporção de dissolução de tainha: água, de 1:2,5.

5.3 REFINO DO ÓLEO BRUTO DE TAINHA

A Tabela 17 apresenta os resultados de caracterização do óleo bruto obtido com a hidrólise proteolítica e do óleo refinado, os resultados obtidos nos índices avaliados concordam com os limites permitidos dados por ANVISA (1999) e RIISPOA (1952). Também, pode-se observar que os valores da % de ácido oleico (AGL) do óleo refinado (0,68%) foram menores do que o óleo bruto (1,25%), portanto, esses resultados mostram que foram removidas impurezas durante o processo de neutralização, além disso, na etapa de branqueamento ocorre a remoção dos resíduos da borra de neutralização. Resultados similares foram obtidos no trabalho de Gbogouri et al. (2006) para óleo de filés de salmão extraído com enzimas proteolíticas; Crexi (2010) para óleo de carpa extraído com o método termomecânico.

Os valores de índice de peróxidos (IP) no óleo bruto apresentam também valores maiores comparados com o obtido no óleo refinado que concorda com o objetivo do refino de óleos, que consiste na eliminação de compostos que afetam a qualidade do óleo, como ácidos graxos livres e produtos de oxidação lipídica, a fim de se obter um produto com características desejáveis para o consumo humano (CREXI, 2007).

Tabela 17 - Caracterização de óleo de tainha

Índices	Óleo bruto	Óleo refinado
AGL (% ácido oleico)	1,25±0,03 ^b	0,68±0,02 ^a
IP (meq peróxido kg ⁻¹)	3,46±0,13 ^b	1,87±0,23 ^a
IS (mg KOH g ⁻¹)	185,67±7,87 ^a	186,55±10,05 ^a
II (cg I g ⁻¹)	145,34±3,56 ^a	146,54±5,23 ^a

AGL (Ácidos graxos livre), IP (índice de peróxidos), IS(índice de saponificação), II(índice de iodo)

O índice de saponificação (IS) e o índice de iodo (II) estão dentro dos valores citados por Crexi et al. (2009) que afirmava que os óleos provenientes de diferentes espécies de pescado bruto e de óleos branqueados tem valores de II entre 120-190 de cg I g⁻¹ e de IS entre 160-190 mg de KOH g⁻¹. Mas o índice de iodo reportado por Crexi (2010) para o óleo de carpa foi muito menor (115 cg I g⁻¹) que o resultado obtido no óleo de tainha inteira extraído por hidrólise proteolítica 146 cg I g⁻¹, resultados que indicam que o óleo de tainha tem um maior conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados. Gbogouri et al. (2006) reportou para óleo de cabeças de salmão 187 cg I g⁻¹ e para filé de salmão 131 cg I g⁻¹.

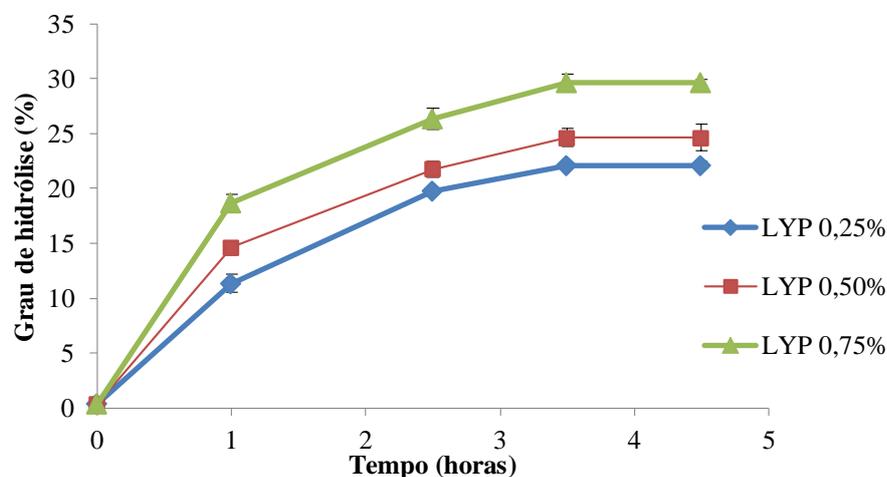
Resultados similares foram obtidos com o valor do índice de peróxido, encontrado no óleo refinado (1,87 meq/kg) foi inferior ao óleo bruto estudado (3,46 meq/kg). O valor de índice de peróxido obtido no óleo refinado concorda como os limites máximos permitidos de 5 meq/kg (CODEX, 2015).

As características químicas exibidas na Tabela 17 mostrou que o óleo extraído do pescado inteiro de tainha era de boa qualidade, como mostrado pelos % ácidos graxos livres (AGL) e índice de peróxido (IP) baixo. O óleo extraído tinha um índice de iodo (II) alto, mostrando assim uma maior quantidade de ácidos graxos poli-insaturados no óleo.

5.4 HIDROLISE LIPÍDICA DO ÓLEO DE TAINHA.

Depois de realizar a hidrólise lipídica, os resultados de grau de hidrólise obtido com a lipase de *Cândida antártica* (LYP) podem ser observados na Figura 17, que apresentou uma porcentagem de hidrólise de 29,66% com a LYP 0,75.

Figura 17 - Cinética de reação para hidrólise lipídica de lipase de *Cândida antártica* (Lyp)

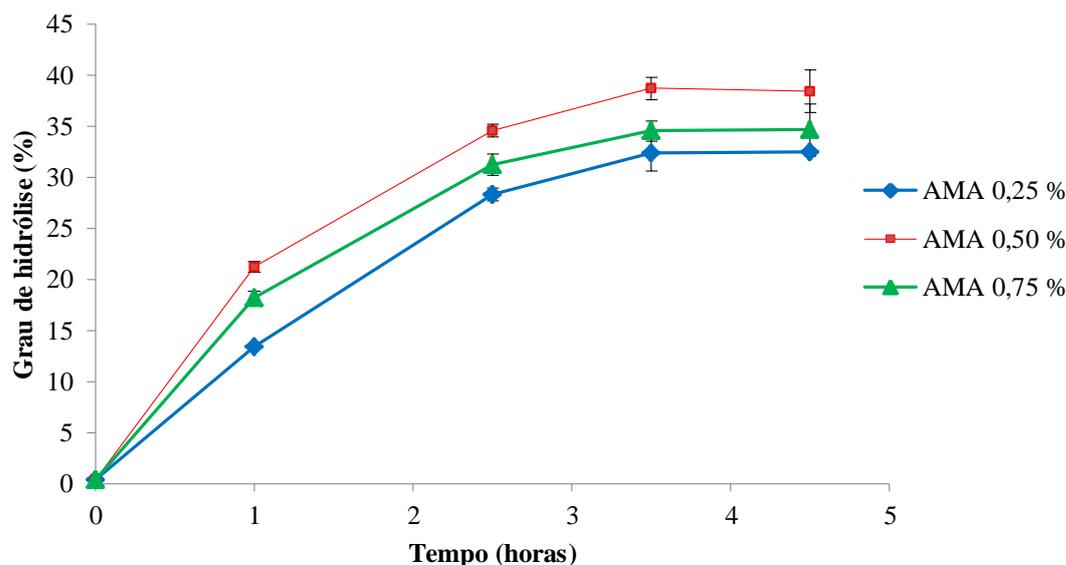


LYP 0,25(lipase de *Cândida antártica* em 0,25% m/m), LYP 0,5(lipase de *Cândida antártica* em 0,50% m/m), LYP 0,75(lipase de *Cândida antártica* em 0,75% m/m)

No caso da lipase de *Cândida rugosa*, a cinética da reação e apresentada da Figura 17, onde pode-se observar que o maior grau de hidrólise foi apresentado pela concentração de 0,50% (AMA 0,50) o valor de 38,69% a 3,5 h, e diminuindo para 4,5 h a 38,43%. Na hidrólise foram liberados ácidos graxos livres, e por isso que o % de hidrólise é incrementado. Valores semelhantes foram reportados por Okada e Morrisey (2007) os que trabalharam com

hidrolise de óleo de sardinha com lipase de *Cândida rugosa*; Padilha e Augusto-Ruiz (2009) os que trabalharam com hidrolise de óleo de pescados marinhos com lipase pancreática porcina.

Figura 18 - Cinética de reação para hidrólise lipídica de lipase de *Cândida rugosa* (AMA)



AMA 0,25(lipase de *Cândida rugosa* em 0,25% m/m), AMA 0,5(lipase de *Cândida rugosa* em 0,50% m/m), AMA 0,75(lipase de *Cândida rugosa* em 0,75% m/m).

A Tabela 18 apresenta os resultados da hidrolise por lipases, observando que os resultados de % de hidrólise apresentaram diferenças significativas, e o maior % hidrolise é obtido com a lipase AMA proveniente de *Cândida rugosa*, um tratamento leve com 3,5 horas e utilizando 0.50% de lipase conseguiu-se um % de hidrolise de quase 40%, selecionando-se este tratamento para continuar com a complexação com ureia.

Na tabela 18 pode ser observado que os valores de % de grau de hidrolise foram mais altos quando é utilizada a lipase proveniente de *Cândida rugosa*, e com a concentração de 0,5% foi obtido o melhor grau de hidrolise. Verifica-se que no tempo 2 horas a liberação de ácidos graxos é incrementado significativamente e no tempo de 3,5 horas se alcança o máximo nível no % do óleo hidrolisado, depois de este tempo pode ser observado uma diminuição de % de grau de hidrolise. Resultados similares foram encontrados por Kavehçi e Xu (2011), Padilha e Augusto- Ruiz (2010), Okada e Morrissey (2008).

Tabela 18 - % de hidrólise lipídica em relação ao tempo apresentado pelas duas enzimas em três diferentes concentrações (0,25; 0,50 e 0,75%)

Tempo	AMA 0,25	AMA 0,50	AMA 0,75	LYP 0,25	LYP 0,50	LYP 0,75
0h	0,42±0,01 ^a	0,42±0,01 ^a	0,42±0,01 ^a	0,42±0,01 ^a	0,42±0,01 ^a	0,42±0,01 ^a
1 h	13,45±0,18 ^d	21,23±0,64 ^a	18,23±0,55 ^c	11,34±0,82 ^b	14,65±0,83 ^d	18,65±0,25 ^c
2,5 h	28,35±0,64 ^c	34,55±1,06 ^a	31,23±0,66 ^b	19,78±0,09 ^d	21,76±0,97 ^d	26,34±0,72 ^c
3,5 h	32,35±1,72 ^{b,c}	38,69±1,01 ^a	34,54±1,07 ^b	22,12±0,11 ^d	24,65±0,72 ^d	29,66±0,82 ^c
4,5 h	32,45±0,35 ^b	38,43±2,52 ^a	34,65±2,06 ^{a,b}	22,13±0,33 ^d	24,63±0,27 ^d	29,65±1,21 ^c

Letras com sobrescritos diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ($P < 0,05$). LYP 0,25 (lipase de *Cândida antártica* em 0,25% m/m), LYP 0,5 (lipase de *Cândida antártica* em 0,50% m/m), LYP 0,75 (lipase de *Cândida antártica* em 0,75% m/m). AMA 0,25 (lipase de *Cândida rugosa* em 0,25% m/m), AMA 0,5 (lipase de *Cândida rugosa* em 0,50% m/m), AMA 0,75 (lipase de *Cândida rugosa* em 0,75% m/m), valor médio \pm erro padrão (em triplicata).

5.5 COMPLEXAÇÃO COM UREIA

Para obter o óleo concentrado em ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT), o óleo hidrolisado obtido nas condições definidas como as ótimas na etapa anterior foram submetido à complexação com ureia. O óleo concentrado em ácidos graxos insaturados esta constituído por a fração não complexada com ureia. A figura 19 apresenta os CAGIT obtidos.

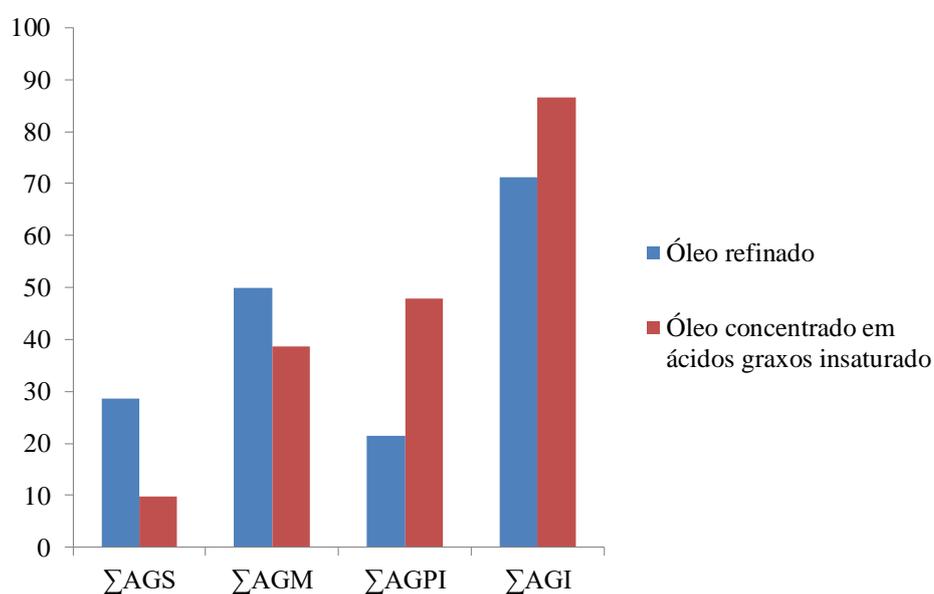
Figura 19 – Concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT)



A Figura 20 mostra a comparação do conteúdo inicial de ácidos graxos entre o óleo refinado e o concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT), após a complexação com ureia. Verifica-se que uma comparação do óleo refinado de tainha com o óleo concentrado de ácidos graxos insaturados (Σ AGI), onde se pode observar o conteúdo de ácidos graxos insaturados no óleo concentrado em ácidos graxos insaturados foi incrementado

num 21,5% de seu conteúdo original no óleo refinado de tainha. Também foi verificado que a somatória dos ácidos graxos saturados no óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (Σ AGS) diminuiu-o em 66,14% de seu conteúdo original. Finalmente neste gráfico pode-se verificar o importante incremento do conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (Σ AGPI) em 123,99%. Resultados similares foram reportados por Gamez Meza et al. (2003); Crexi et al. (2011) e Esquerdo et al. (2014).

Figura 20 - Incremento de conteúdo de Ácidos graxos insaturados presentes no óleo concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT)



AGS: somatório dos ácidos graxos saturados, Σ AGM: somatório dos ácidos graxos monoinsaturados, Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados, Σ AGI: somatório de ácidos graxos insaturados.

O perfil de ácidos graxos do óleo refinado e o perfil de ácidos graxos do óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (CAGIT) foram apresentados na Tabela 19, onde pode-se verificar que o conteúdo de ácido graxo eicosapentaenoico foi incrementado de 10,37% no óleo refinado a 20,73% no CAGIT e o ácido graxo docosaenoico de 6,14% a 13,22% foram os ácidos graxos mais concentrados em relação ao conteúdo inicial no óleo refinado sem tratamento com um incremento de 99,9% e 115,2% respectivamente, valores similares foram reportados por Sun et al. (2002); Okada e Morrissey (2008) e Kahveci e Xu (2011).

Tabela 19 - Perfil de ácidos graxos para o óleo refinado de tainha e para o óleo concentrado em ácidos graxos insaturados

Ácidos graxos	Óleo refinado (%)	Óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (%)
C12 (Láurico)	0,13±0,00	-
C16 (Palmítico)	24,52±0,17 ^a	6,51±0,52 ^b
C17 (Margárico)	0,85±0,06	-
C18 (Esteárico)	3,18±0,20 ^a	2,78±0,40 ^a
∑AGS	28,68	9,71
C:16:1 (Palmitoleico)	8,44±0,24 ^a	8,66±0,34 ^a
C:17:1 (Heptadecenoico)	2,37±0,09	-
C18:1 n9 (Oleico)	34,44±0,32 ^a	28,89±1,45 ^b
C20:1 n9	1,659±0,00 ^a	1,36±0,29 ^a
C22:1n9	3,04±0,00 ^b	4,29±0,25 ^a
∑AGMI	49,94	38,74
C18:3 n3 (α linolênico)	0,58±0,100 ^b	3,61±0,04 ^a
C20:4 n6	2,079±0,03 ^b	4,61±0,04 ^a
C20:5 n3 (Eicosapentaenoico)	10,37±0,29 ^b	20,73±0,51 ^a
C22:4n6	0,39±0,09 ^b	2,49±0,00 ^a
C22:5n3 (Docosapentaenoico)	1,82±0,04 ^b	3,23±0,21 ^a
C22:6n3 (Docosaexaenoico)	6,14±0,17 ^b	13,22±0,77 ^a
∑AGPI	21,38	47,89
∑AGI	71,32	86,63
∑AGNI	0,00	3,661

∑AGS: somatório dos ácidos graxos saturados, ∑AGMI: somatório dos ácidos graxos monoinsaturados, ∑AGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados, ∑AGI: somatório de ácidos graxos insaturados, ∑AGNI: somatório de ácidos graxos não identificados. Letras com sobrescritos diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa (P < 0,05).

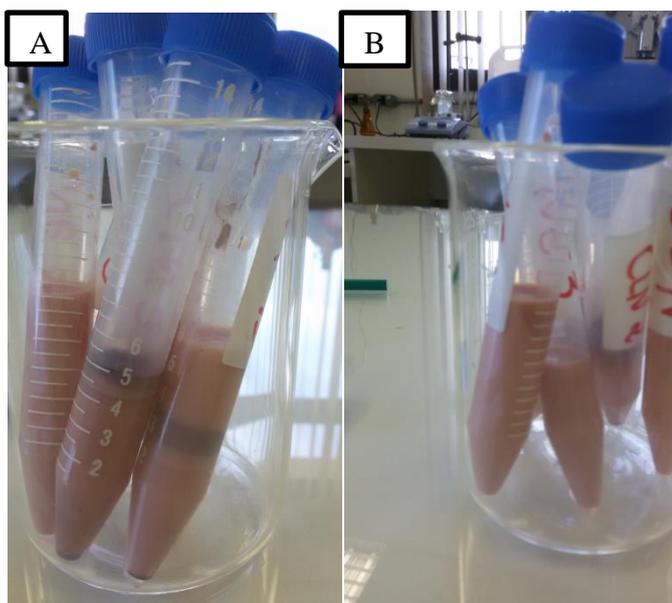
Estes resultados confirmaram a melhora da qualidade do óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (CAGIT), obtendo um produto com melhores características nutraceúicas, com baixo conteúdo de ácidos graxos saturados e conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados de 47,89% que pelo CODEX (2015) pode ser classificado como um óleo concentrado em ácidos graxos poli-insaturados (PUFA).

5.6 OBTENÇÃO DE NANOCARREADORES LIPÍDICOS CONTENDO ASTAXANTINA

Em geral, um aspecto crítico para se obter os nanocarreadores lipídicos de ingredientes de alimentos bioativos é representado pela seleção adequada dos lipídios utilizados (LACATUSU et al.,2013).

Para definir os componentes das nanoemulsões e dos nanocarreadores lipídicos nanoestruturados, primeiramente se avaliou visualmente estabilidade das formulações. A Figura 21 demonstra uma formulação estável e outra com precipitados de astaxantina.

Figura 21. A: Nanocarreadores instáveis. B: Nanocarreadores estáveis, depois de 1 semana de produção



Após vários testes, foi escolhida a formulação mais adequada, utilizando como surfactantes o Tween 20 (Polyoxietileno de monolaurato de sorbitano) e o Spam 80 (Monooleato sorbitano). Esses compostos possuem algumas vantagens como o baixo custo, o fácil acesso e são aditivos de uso permitido como surfactantes em alimentos segundo o Regulamento de Vigilância Sanitária de Brasil (BRASIL, 2005) e a Norma geral para aditivos alimentares CODEX (1995). O balance hidrofílico lipofílico (HLB) do Tween 20 é de 16,7; apresentando uma característica hidrofílica e de Spam 80 é de 4,3; apresentando uma característica lipofílica. Ambos os surfactantes utilizados apresentam as três características para ser considerados como eficazes, em primeiro lugar, a adsorção para a superfície das novas gotículas deve ser rápida; segundo, deve reduzir drasticamente a tensão interfacial e terceira deve formar uma membrana que impede que as gotículas se agregarem (SILVA; CERQUEIRA; VICENTE, 2015).

Na escolha do lipídio sólido os melhores resultados foram obtidos com a cera carnaúba e a trimiristina (Dynasan 114). A cera carnaúba é empregada na fabricação de cosméticos e no recobrimento de produtos alimentícios, devido ao baixo índice de acidez, o reduzido percentual de impurezas e por tornar-se incolor durante o processo de fusão. Além

disso, a cera carnaúba também é um aditivo de uso permitido em alimentos segundo o Regulamento de Vigilância Sanitária de Brasil (BRASIL, 2005) e a Norma geral para aditivos alimentares (CODEX, 2015), além de ser conhecida por apresentar atividade antioxidante (LACATUSU et al., 2013).

Conhecendo a baixa solubilidade e estabilidade do caretonóide astaxantina, inicialmente foram desenvolvidas os nanocarreadores chamados de NE1ASTx e CLN1ASTx, utilizando apenas o óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (CAGIT) como lipídio líquido. Os resultados indicaram que a porcentagem de recuperação da astaxantina foi muito baixa nestes sistemas (ver Tabela 20).

Tabela 20 - Características físico-químicas dos nanocarreadores lipídicos de concentrados de ácidos graxos insaturados de tainha e astaxantina

Amostra	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta ζ	AST Conteúdo $\mu\text{g/mL}$	% Recuperação
NE1B	234,30 \pm 13,95	0,21 \pm 0,01	-49,60 \pm 2,00	-	-
NE1AST	139,57 \pm 6,83	0,18 \pm 0,00	-45,50 \pm 0,60	64,69 \pm 1,60	12,73 \pm 0,40
CLN1B	510,40 \pm 10,19	0,59 \pm 0,02	-32,50 \pm 3,80	-	-
CLN1ASTX	329,30 \pm 31,90	0,33 \pm 0,02	-38,70 \pm 1,50	56,31 \pm 1,30	12,46 \pm 0,36

NE1B: nanoemulsão branca, NE1AST: nanoemulsão com AST, CLN1B: Carreador lipídico nanoestruturado branco, CLN1AST: carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina

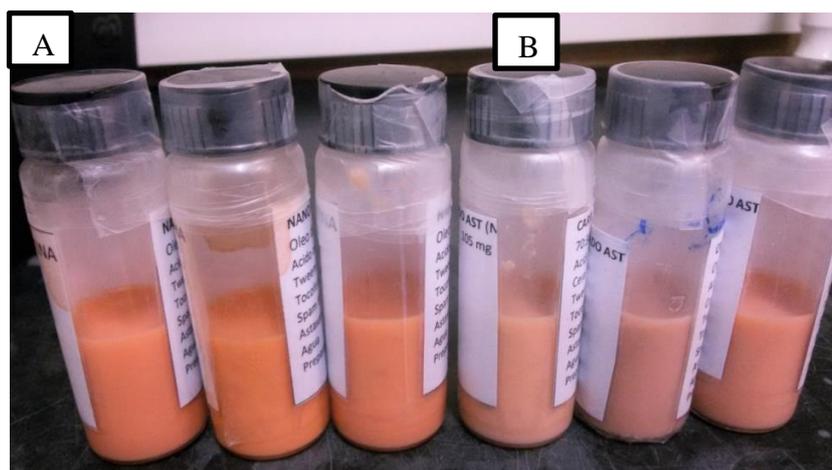
Nesse contexto, buscaram-se outros lipídios que tivessem um maior potencial de solubilizar a astaxantina. Tamjidi et al.(2014) demonstraram que o ácido oleico foi o melhor óleo para solubilizar com astaxantina. Desta forma, novas formulações foram propostas (Tabela 21) utilizando uma mistura de óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (CAGIT) com ácido oleico (NE2AST e CLN2AST), mas sempre mantendo o óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (CAGIT) em maior quantidade possível pelos benefícios adicionais à saúde. Na Figura 22 podem observar-se os nanocarreadores desenvolvidos contendo astaxantina.

Tabela 21 - Características físico-químicas dos nanocarreadores lipídicos de concentrados de ácidos graxos insaturados de tainha com inclusão de ácido oleico e astaxantina

Amostra	Tamanho (nm)	Índice de polidispersão	Potencial Zeta ζ	AST Conteúdo $\mu\text{g/mL}$	% Recuperação
NE2B	172,10 \pm 6,12	0,30 \pm 0,06	-36,00 \pm 0,36	-	-
NE2AST	155,83 \pm 7,50	0,22 \pm 0,02	-40,30 \pm 1,00	172,96 \pm 1,20	96,09 \pm 0,64
CLN2B	322,10 \pm 13,89	0,52 \pm 0,05	-35,10 \pm 2,60	-	-
CLN2AST	273,70 \pm 11,23	0,42 \pm 0,02	-32,20 \pm 2,10	39,04 \pm 1,06	18,87 \pm 2,06

NE2B :nanoemulsão branca, NE2AST: nanoemulsão com astaxantina, CLN2B: Carreador lipídico nanoestruturado branco, CLN2AST: carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina

Figura 22- Nanocarreadores lipídicos: Nanoemulsões com astaxantina (A) e carreadores lipídicos nanoestruturados com astaxantina (B).



5.6.1 Índice de peróxido.

Na Tabela 22 podem-se observar que os valores das NEAST e CLNAST no tempo zero e após de 30 dias não apresentaram diferença significativa no índice de peróxidos, estando os valores dentro dos limites de acordo com os parâmetros estipulados pela legislação (ANVISA, 1999), sendo o máximo valor permitido de 5 meq.Kg-1.

Com os resultados obtidos pode se afirmar que o desenvolvimento tanto das nanoemulsões como dos carreadores lipídicos nanoestruturados protegem os concentrados de ácidos graxos poli- insaturados de tainha e a astaxantina. A estrutura dos nanocarreadores protege os compostos do oxigênio e evita que fatores que aceleram a oxidação como luz, umidade os deterioreem e provoquem a formação dos peróxidos e hidro peróxidos.

Em pesquisas similares Lacatusu et al. (2013), trabalharam com o desenvolvimento dos carreadores lipídicos nanoestruturados de óleo de pescado com luteína e Esquerdo et al.(2015) trabalharam no encapsulamento de concentrados de ácidos graxos insaturados de carpa utilizando quitosana. Nestes trabalhos foram obtidos resultados similares aos verificados nesse trabalho, demonstrando a capacidade protetora dos nanocarreadores contra a oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados de pescado.

Tabela 22- Índice de Peroxido (meq.Kg-1) das Nanocarreadores de Astaxantina

Tipo nanocarreador	Tempo zero*	30 dias*
NE1B	2,37±0,047 ^a	2,45±0,13 ^a
NE2B	2,19±0,015 ^a	2,26±0,19 ^a
NE1AST	2,48±0,07 ^a	2,53±0,08 ^a
NE2AST	2,13±0,03 ^a	2,18±0,28 ^a
CLN1B	2,89±0,12 ^a	2,96±0,08 ^a
CLN2B	2,31±0,18 ^a	2,39±0,34 ^a
CLN1AST	3,01±0,06 ^a	3,14±0,02 ^a
CLN2AST	2,78±0,13 ^a	2,89±0,12 ^a

NE1B e NE2B :nanoemulsões brancas, NE1AST e NE2AST: nanoemulsões com AST, CLN1B e CLN2B: Carreadores lipídicos nanoestruturados brancos, CLN1AST e CLN2AST: carreadores lipídicos nanoestruturados com astaxantina. *média ± erro padrão (n=3). Letras com sobrescritos diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa (P< 0,05).

5.6.2 Diâmetro médio e do índice de polidispersão (PDI) dos nanocarreadores lipídicos

As medidas do diâmetro médio e o índice de polidispersão das diferentes formulações testadas estão apresentados na Tabela 20 e Tabela 21. A Tabela 20 demonstra que os resultados das nanoemulsões (NE1B e NE1AST) apresentaram menores diâmetros médios e valores de índice de polidispersão do que os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN1B e CLN1AST). As formulações contendo astaxantina apresentaram tamanhos e índices de polidispersão mais baixos que os brancos, indicando que a inclusão da astaxantina mantém o sistema mais estruturado. O tamanho dos nanocarreadores está dentro dos valores esperados, sendo estes menores que 500 nm e os índices de polidispersão menores que 0,3; o que indica os sistemas desenvolvidos podem ser considerados monodispersos, favorecendo sua estabilidade.

A Tabela 21 apresenta os resultados dos nanocarreadores após a inclusão do ácido oleico nas formulações. As nanoemulsões NE2AST e NE2B apresentaram tamanhos menores de 200 nm, e os carreadores lipídicos nanoestruturados CLN2B e CLN2AST valores

inferiores a 350 nm. A inclusão de ácido oleico não influenciou no índice de polidispersão como tampouco no tamanho dos nanocarreadores com astaxantina mas sim nos carreadores brancos, obtendo-se valores inferiores aos carreadores só com CAGIT. Já nos carreadores lipídicos nanoestruturados a inclusão do ácido oleico influenciou positivamente obtendo-se nesta formulação tamanhos inferiores que nas formulas sem ácido oleico e valores de PDI também inferiores.

O tamanho e PDI mais elevados para carreadores lipídicos nanoestruturados quando comparados a nanoemulsões é bem descrito na literatura (FANGUEIRO, 2012; LACATUSU et al., 2014). De fato, a técnica de espalhamento de luz dinâmico correlaciona os dados detectados pelo equipamento com o raio de uma esfera e nem sempre os lipídeos sólidos recristalizam formando partículas em formato esférico. Podem ser observados outros formatos em que o raio é maior em largura do que altura, como no caso de um retângulo. Este fato pode indicar um diâmetro mais elevado para os CLN quando analisado pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, utilizando apenas um ângulo de análise. Segundo Dora (2010) técnicas de análise morfológica, por microscopia eletrônica de transmissão, são necessárias para correlacionar esses dados.

5.6.3 Potencial zeta dos nanocarreadores lipídicos contendo astaxantina

A carga da superfície das partículas é quantificada como potencial zeta (ζ) que remete para a mobilidade eletroforética das partículas em um campo elétrico (CHAUDHARI et al., 2012; LI et al., 2012; LACATUSU et al., 2014). Os nanocarreadores são sistemas termodinamicamente instáveis (LACATUSU et al., 2014). A estabilidade dos nanocarreadores depende da força de interação entre as gotas, que é determinada pela carga sobre as suas superfícies. Quando esta taxa é suficientemente grande, geralmente considerado como sendo superior a ± 30 mV, de gotículas são impedidas de se agregarem devido à repulsão eletrostática entre estas (SHEN e QUEK, 2014).

Na Tabela 20 e na Tabela 21 podem-se observar os valores de potencial zeta das formulações estudadas, onde todos os valores obtidos estão entre -32,20 mV a -49,60 mV. Estes valores negativos podem ser relacionados às grupos carboxílicos (COO⁻) dos ácidos graxos livres do CAGIT. Desta forma, as formulações desenvolvidas com ou sem astaxantina foram considerados eletrostaticamente estáveis quanto aos valores de potencial zeta.

5.6.4 Eficiência de encapsulação de astaxantina em nanocarreadores lipídicos

Os métodos de espectroscopia UV/Vis foram validados quanto aos parâmetros de especificidade, linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão e exatidão. A especificidade do método foi analisada utilizando-se NEs brancas contendo as maiores quantidades de excipientes. As leituras realizadas no espectrofotômetro UV/Vis ((Perkin Lambda 35, USA) demonstraram que o método é específico e que não houve interferência dos excipientes na quantificação da AST.

A Tabela 23 demonstra os resultados obtidos após análise de regressão linear dos dados das curvas de calibração. A Figura 23 apresenta a curva de calibração da AST que foi linear nas faixas de concentração testadas. Foi usada uma curva com medidas de absorbância ate a 3,00 uma vez que o equipamento tem uma amplificação de sinal que permite ler até 5,00 de absorbância com segurança (PERKIN ELMER INSTRUMENTS, 2000). Além disso, a curva apresentou um R^2 de 0,994 demonstrando a sua linearidade.

Os limites de detecção e quantificação calculados para análise de espectrofotometria UV/Vis) foram $0,928 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,306 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esses dados foram confirmados experimentalmente indicando que o método foi suficientemente sensível para ser usado para determinação do teor e eficiência de encapsulação de astaxantina.

Tabela 23 - Resultados obtidos após análise de regressão linear dos dados da curva de calibração para análise de espectrofotometria UV/Vis de Astaxantina

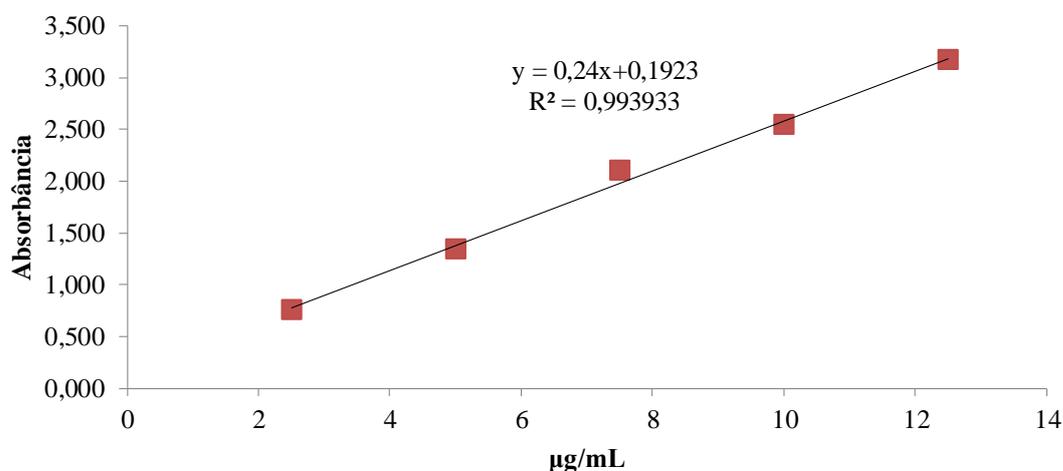
Fatores	Espectrofotometria UV/Vis
Concentração analisada	2,5 a 15
Equação da reta	$y = 0,24x+0,1923$
R^2	0,993933

5.6.5 Teor e da recuperação de astaxantina

Na Tabela 20 pode-se observar os resultados de conteúdo de astaxantina nas diferentes formulações. Pode ser observado uma taxa de recuperação de astaxantina muito baixa para a NE1AST (em torno de 12%). Além disso, visualmente foi observado desestabilização do carreador lipídico nanoestruturado. Assim, novas formulações foram testadas, utilizando além do CAGIT, o ácido oleico, uma vez que este óleo tem alta

capacidade de solubilizar a astaxantina. Os resultados do teor de astaxantina destas formulações estão apresentados na Tabela 21 e indicaram que a recuperação de AST nas NEs passou para 96%, tendo um teor de aproximadamente 172 μ g/mL. No caso dos CLN o teor de astaxantina foi de 39,04 μ g/mL, e a recuperação de 18%.

Figura 23 - Curva de calibração da astaxantina obtida por espectrofotometria UV/Vis, utilizando-se o comprimento de onda de 476 nm



5.6.6 Calorimetria Diferencial de Varredura

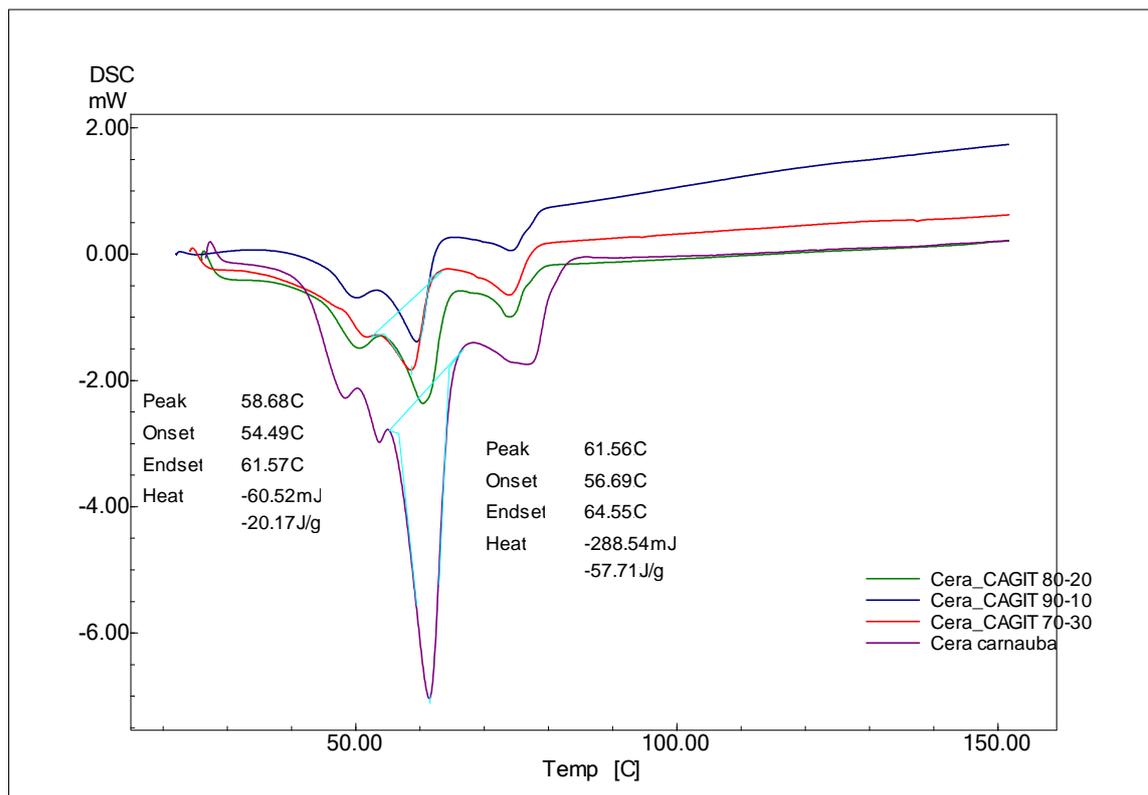
A calorimetria exploratória foi empregada neste estudo para fornecer informação sobre o comportamento da estrutura cristalina do CLN brancos e contendo astaxantina.

A figura 24 apresenta os DSC das amostras cera carnaúba e de proporções de mistura física de cera carnaúba: CAGIT (70:30, 80:20 e 90:10 respectivamente). A forma das curvas de DSC revela a existência de três efeitos endotérmicos: Um pico localizado a cerca de 58°C a 59°C (específicos para ácidos graxos insaturados e também para spam 80), um ombro a 50°C a 51°C devido aos ácidos graxos saturados presente na composição do óleo de tainha e um pico de 74° C característico para o componente lipídico da cera de carnaúba. Também pode se observar um resultado importante pela comparação do efeito da composição de CAGIT sobre o padrão de cristalização de CLN. Esta figura exemplifica a diminuição dos principais pontos de fusão e picos endotérmicos detectados após o aumento da quantidade de CAGIT. Os picos endotérmicos de 10%, 20% e 30% de CAGIT foram de 61,09°C, 59,66°C, 58,48°C, respectivamente. Como o pico endotérmico da cera carnaúba é 63°C, pode-se constatar que a cera carnaúba é influenciada pela inclusão de CAGIT. Na proporção de 30%

foi observado a maior diminuição do ponto de fusão e por isso esta proporção de mistura da cera carnaúba:CAGIT foi escolhida.

Outra observação sobre os picos individuais endotérmicos das três misturas físicas Cera carnaúba: CAGIT são que apresentam um menor ponto de fusão, menor largura e a altura mais baixa em comparação com a cera carnaúba, indicando menor cristalinidade e indicando a presença de defeitos de rede, e sugerindo que o CAGIT pode estar molecularmente disperso na matriz da cera. Também observa-se que o pico que apresenta maior diferença com a cera carnaúba é o pico de proporção de cera carnaúba: CAGIT (70:30). A presença de defeitos na rede cristalina da cera carnaúba pode permitir uma maior capacidade de encapsulamento de astaxantina.

Figura 24 - Calorimetria diferencial de varredura dos carreadores lipídicos contendo óleo concentrado com ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT).

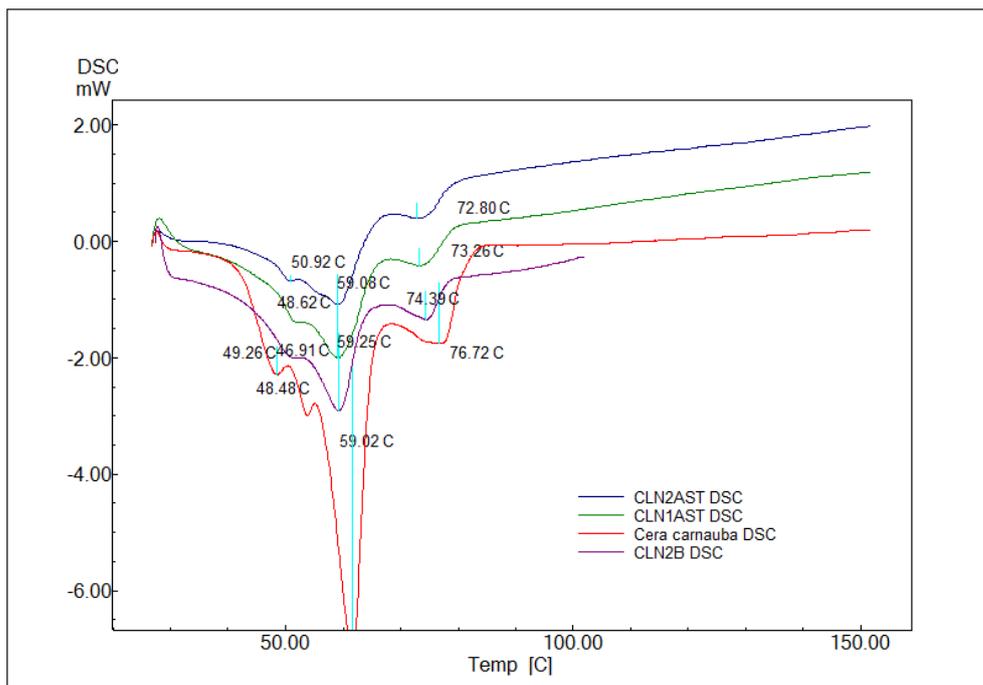


A Figura 25 apresenta a comparação dos DSC dos CLN com ou sem astaxantina e da cera carnaúba. As formulações dos CLN mostraram picos individuais endotérmicos com menor ponto de fusão, menor largura e a altura mais baixa em comparação com a cera carnaúba, indicando menor cristalinidade e indicando a presença de defeitos de rede, e sugerindo que o óleo é molecularmente disperso na matriz da cera. Este fenômeno pode ser

atribuído à interferência do CAGIT, o ácido oleico, os surfactantes e a astaxantina na cristalização da cera carnaúba. Além disso, o deslocamento dos picos de fusão foi de 76,72°C ponto de fusão de cera carnaúba a 72,80°C ponto de fusão de carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina e com inclusão de ácido oleico (CLN2AST). A amostra CLN2AST apresentou uma maior capacidade de encapsulamento de astaxantina, que a amostra CLN1AST, atribuído a um maior deslocamento e a uma maior diferença na forma dos picos comparados com a cera carnaúba, que sugere defeitos na rede cristalina lipídica e, como resultado, tamanhos de partícula serão menores. A perturbação da rede de lipídios após encapsulamento de astaxantina é evidente (Figura 25). Este aspecto indica que uma rede cristalina menos ordenada de todas CLN1AST e CLN2AST em comparação com a cera carnaúba.

Resultados similares foram também relatadas por Tamjidi et al.(2014), que trabalharam com um carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina, utilizando ácido oleico e behenato de glicerol como lipídios líquido e sólido, respectivamente, e Tween 80 e lecitina como surfactantes, mas os resultados com a melhor formulação obtidas por esses autores obtiveram um deslocamento no ponto de fusão do lipídio sólido behenato de glicerol e as amostras de CLN (de 74,5 a 71,8°C) muito menor ao observado em esta pesquisa (de 76,72 a 72,80).

Figura 25 - Calorimetria diferencial de varredura dos carreadores lipídicos com e sem astaxantina.



CLN2B: carreadores brancos. CLN1AST e CLN2AST: carreadores com astaxantina

Lacatusu et al.(2013), trabalharam no desenvolvimento de carreadores lipídicos nanoestruturados com luteína utilizando a cera carnaúba como lipídios sólidos e óleo de pescado com alto conteúdo de ômega 3 como lipídio líquido, e Tween 80, lecitina de soja e glicerol monoestereato como surfactantes. Estes autores obtiveram com a melhor formulação um deslocamento no ponto de fusão do lipídio sólido cera carnaúba e as amostras de CLN (de 78 a 77°C) muito menor ao observado em esta pesquisa (de 76,72 a 72,80).

5.6.7 Estabilidade dos nanocarreadores lipídicos

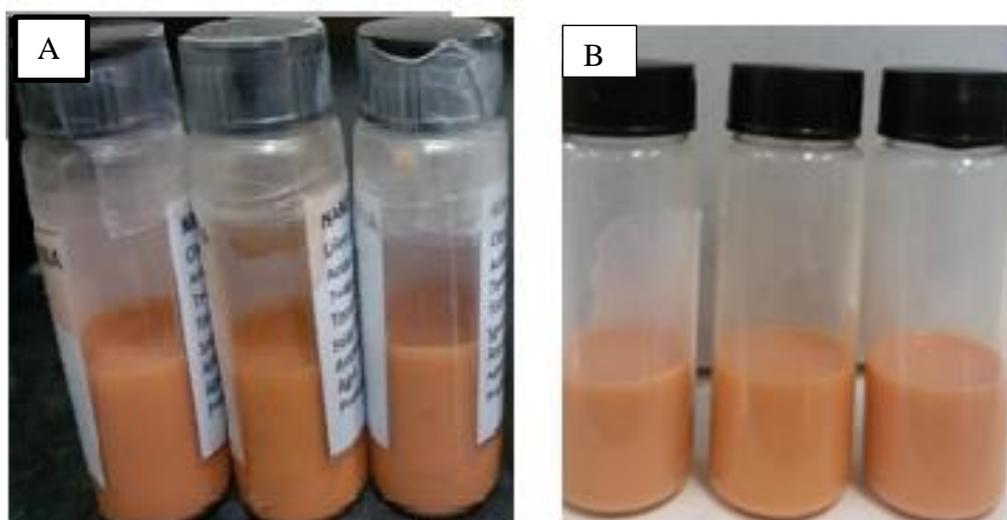
Os nanocarreadores lipídicos foram armazenados a temperatura de 4°C durante 60 dias, para avaliar sua estabilidade. A tabela 24 apresenta os resultados das nanoemulsões com astaxantina no tempo 0 e após 60 dias. Foi observado que as nanoemulsões foram estáveis quanto ao tamanho e ao PDI. O potencial zeta com valores inferiores a -30mV indicam também estabilidade das nanoemulsões o que pode ser confirmado nas fotografias das mesmas na Figura 26.

Tabela 24- Estabilidade da Nanoemulsões com astaxantina

Amostra	Tempo (dias)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta ζ
NE2AST	0	155,83±7,50	0,22±0,02	-40,30 ± 1,00
NE2AST	60	162,90±0,70	0,25±0,02	-44,30 ± 0,90

NE2AST: nanoemulsões com AST e ácido oleico

Figura 26 - Nanoemulsão com astaxantina em tempo zero (A). Nanoemulsão com astaxantina em tempo 60 dias (B)



A tabela 25 apresenta os resultados dos carreadores lipídicos nanoestruturados com astaxantina no tempo zero e depois de 60 dias. Foi observado que a CLN2AST foi estável tanto em tamanho como no índice de polidispersão (PDI) e no potencial zeta, mantendo valores inferiores a -30mV após 60 dias, o que indica a estabilidade dos nanocarreadores lipídicos nanoestruturados.

Tabela 25 - Estabilidade dos Carreadores lipídicos nanoestruturados com astaxantina

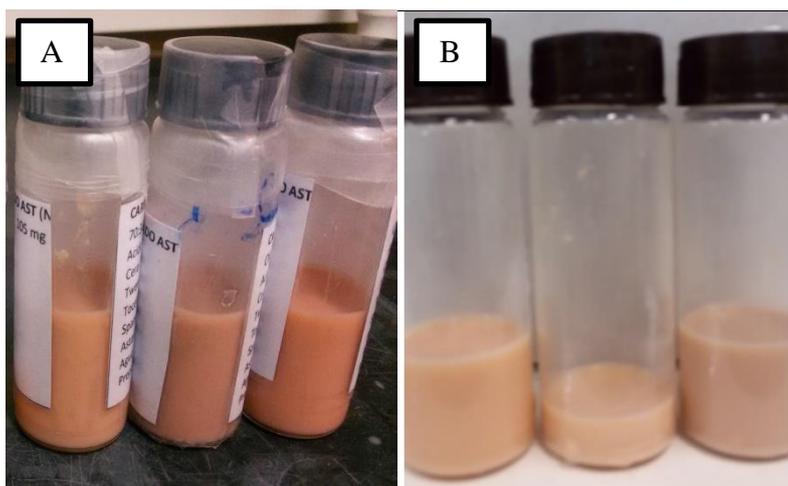
Amostra	Tempo (dias)	Tamanho (nm)	PDI	Potencial Zeta ζ
CLN2AST	0	273,70±11,23	0,42±0,02	-32,20 ± 2,10
CLN2AST	60	314,06±23,91	0,43±0,06	-31,30 ± 3,50

CLN2AST: carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina e ácido oleico

Na Figura 27 podem ser observados os carreadores lipídicos nanoestruturados nos tempos zero e após de 60 dias. Pode-se observar que as formulações permaneceram estáveis ao longo do tempo e não apresentaram separação de fases ou precipitação da astaxantina.

Figura 27 – A: Carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina no tempo zero.

B: Carreador lipídico nanoestruturado com astaxantina no tempo 60 dias



Pelo exposto anteriormente desenvolveram-se os seguintes tipos de nanocarreadores lipídicos:

- Nanoemulsões sem astaxantina que foram as nanoemulsões brancas (NEB). Nanoemulsões contendo astaxantina (NEAST). Nas primeiras formulações (NE1B e NE1AST) foi utilizado apenas o óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (CAGIT) e nas segundas amostras (NE2B e NE2AST) foram utilizados ácido oleico e CAGIT.

Carreadores lipídicos nanoestruturados sem astaxantina (CLNB) foram os brancos e os carreadores lipídicos nanoestruturados contendo astaxantina (CLNAST). Nas formulações CLN1B e CLN1AST foram feitos com o óleo concentrado em ácidos graxos insaturados (CAGIT) e a cera carnaúba. As amostras CLN2B e CLN2AST foram feitos com a inclusão de ácido oleico na fórmula.

Os nanocarreadores lipídicos desenvolvidos neste trabalho, pela técnica de homogeneização a alta pressão, apresentam um potencial para melhorar a solubilidade da astaxantina, mantendo a estabilidade e protegendo contra a oxidação do composto bioativo e dos excipientes utilizados (CAGIT). Carreadores lipídicos nanoestruturados produzidos com óleo de peixe foram desenvolvidos para liberação da luteína por Lacatusu et al. (2013). Como componentes da formulação foram utilizados óleo de peixe enriquecido com ômega 3, cera carnaúba e estearato de glicerol. Diferentes proporções de luteína e óleo de peixe foram variados neste trabalho, sendo que os melhores nanocarreadores produzidos utilizaram 0,08% de luteína e 30% de óleo de peixe. Estes nanocarreadores apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 150 nm e índice de polidispersão de 0,2. A porcentagem de luteína encapsulada depende da quantidade adicionada e neste caso, após adicionar 0,08% de luteína foi possível encapsular 88% de luteína.

Tamjidi et al. (2014) também desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados contendo com astaxantina. Como componentes da formulação eles utilizaram ácido oleico (lipídio líquido), behenato de glicerol (lipídio sólido), lecitina e Tween 80 (surfactantes) e produziram os nanocarreadores pela técnica de fusão-emulsificação seguida de ponta de ultrassom. Neste estudo foi realizado um delineamento fatorial, utilizando como variáveis independentes a concentração de fase lipídica e a concentração de ácido oleico e como variáveis dependentes o tamanho, PDI, potencial zeta e degradação de astaxantina após 25 dias de armazenamento. A maior estabilidade da astaxantina (degradação de aproximadamente 20%) foi verificada nas formulações que continham 1,8% de fase lipídica e de 22,4% de ácido oleico. No entanto, os autores não realizaram experimentos para avaliar a quantidade de astaxantina encapsulada e a técnica utilizada por eles utiliza solvente orgânico (diclorometano) e não é escalonável.

Kim et al. (2011) desenvolveram nanoemulsões contendo astaxantina. Como componentes da formulação eles utilizaram petrolatum, ceramida e colesterol (lipídio líquido), glicerol ester e Tween 60 (surfactantes) e produziram as nanoemulsões pela técnica de homogeneização de alta pressão. Neste estudo foi realizado um delineamento fatorial, utilizando como variáveis independentes a concentração de surfactante, tipo de surfactantes, número de ciclos no homogeneizador, concentração de astaxantina e como variáveis dependentes o tamanho, potencial zeta e degradação de astaxantina após 1 mês de armazenamento. A maior estabilidade da astaxantina (degradação de aproximadamente 14%) foi verificada nas formulações que continham 193,4 µg/mL de astaxantina (m/v). No entanto, os autores utilizaram a técnica que utiliza solvente orgânico (etanol) e não é escalonável.

Os nanocarreadores lipídicos, pelos seus componentes, podem apresentar baixo risco de toxicidade e se produzidos por homogeneização a alta pressão, podem ser produzidos em escala industrial com um preço baixo e sem utilização de solventes orgânicos (DIMA, S; DIMA, C. e IORDA, G.; 2015). Nesta pesquisa encapsulamos 0,02% de astaxantina, nos carreadores lipídicos nanoestruturados, com uma recuperação de $\approx 18,87\%$ e no caso das nanoemulsões obtidas foi encapsulado 0,02% de astaxantina mas com uma recuperação de $\approx 96,09\%$, sem utilização de solventes para melhorar a solubilidade da astaxantina.

Segundo os resultados obtidos neste trabalho as nanoemulsões desenvolvidas (NE1AST e NE2AST) contem mais CAGIT e mais astaxantina. No entanto, elas são líquidas e liberam mais rapidamente a astaxantina, mas podem ser aplicadas em produtos cárneos, produtos de panificação, bebidas, margarinas manteiga e molhos para saladas (DIMA, S; DIMA, C. e IORDA, G., 2015). Aproveitando suas características também podem ser aplicados em bebidas para pessoas com necessidades especiais e são de absorção rápida (BLANCO-PADILLA et al., 2014).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN2AST) tem menos astaxantina, mas como são utilizados lipídios sólidos, eles podem ser liofilizados e liberam mais lentamente a astaxantina. Assim apresentam uma maior facilidade de manuseio, uma maior retenção dos ingredientes voláteis (PRADHAN et al, 2015) e também oferecem uma liberação controlada dos nutrientes retidos (ZHU et al, 2015). Os CLN por sua possibilidade de liofilização podem ser aplicados em uma maior variedade de alimentos, incluindo bebidas funcionais, fortificação de leite em pó, produtos de panificação, produtos de carne (ZHU et al., 2015; PRADHAN et al, 2015; LACATUSU et al., 2013; SEKHON, 2010).

Finalmente os carreadores livres de astaxantina (NE1B e CLN1B) apresentam na sua formulação a maior quantidade encapsulada de CAGIT, sendo uma alternativa para encapsular ácidos graxos insaturados da tainha constituindo uma alternativa importante para aplicação em diversos alimentos, porque foi demonstrado que os ácidos graxos insaturados componentes do CAGIT se mantiveram estáveis durante 30 dias e não apresentaram incremento significativo no índice de peróxidos (ver Tabela 22).

6 CONCLUSÕES

A obtenção de óleo bruto de tainha separado por processo enzimático utilizando a enzima Alcalase apresentou um rendimento de 78,87%, em relação ao óleo presente na tainha inteira, as condições de extração foram a 58°C a 120 min utilizando 1,5% da enzima Alcalase e com um grau de hidrólise de 26,03%. O processo enzimático utilizado auxiliou com sucesso na separação do óleo da matriz proteica.

Para obter os concentrados de ácidos graxos insaturados de tainha (CAGIT), o óleo hidrolisado com a lipase de *Cândida rugosa* ao 0,5% (m/m) foi submetido a complexação da ureia, conseguindo-se uma concentração de 86,63% de ácidos graxos insaturados.

No concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha, o ácido eicosapentaenoico (EPA) foi concentrado de 10,37% até 20,73% e o ácido docosaenoico (DHA) foi concentrado de 6,14% até 13,22%.

Foram desenvolvidos dois tipos de nanocarreadores lipídicos, uma nanoemulsão e um carreador lipídico nanoestruturado. A nanoemulsão (NE) otimizada contendo óleo concentrados em ácidos graxos insaturados e ácido oleico, apresentou um sistema de 150 nm e teor de 172,96µg/mL de astaxantina, podendo ser utilizada em aplicações líquidas. O carreador lipídico nanoestruturado (CLN) otimizado contendo a mistura de cera de carnaúba, óleo concentrado em ácidos graxos insaturados e ácido oleico, apresentou um sistema de 270 nm e teor de astaxantina de 39,04 µg/mL, sendo interessantes para aplicação em produtos sólidos uma vez que sendo liofilizados liberariam o conteúdo encapsulado mais lentamente.

7 SUGESTÃO PARA TRABALHOS FUTUROS:

Consolidar o estudo da hidrólise lipídica e utilizar destilação molecular para fazer a concentração dos ácidos graxos insaturados.

Estudar a aplicação das nanoemulsões e carreadores lipídicos nanoestruturados assim desenvolvidos, em alimentos de interesse.

Estudar a estabilidade das nanoemulsões e carreadores lipídicos nanoestruturados e avaliar a capacidade antioxidante dos nanocarreadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADACHI D.A.; HAMA S. B.; NAKASHIMA K.C.; BOGAKI T.E.; OGINO C.A.; KONDO A. Production of biodiesel from plant oil hydrolysates using an *Aspergillus oryzae* whole-cell biocatalyst highly expressing *Candida antarctica* lipase B. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 410–416, 2013.
- ADLER-NISSEN, J. Enzymatic Hydrolysis of Food Proteins. **London, U.K.: Elsevier Applied Science Publishers**, 1985.
- ALGAMAS-DIMANTOV, A.; YEHUDA-SHNAIDMAN, E.; HERTZ, R.; PERI, I.; BARTANA, J.; SCHWARTZ, B. Prevention of diabetes-promoted colorectal cancer by (n-3) polyunsaturated fatty acids and (n-3) PUFA mimetic. **Oncotarget**, v. 5, p. 9851-9863, 2014.
- AL-SAYED, M.; LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Characterisation of the lipid fractions obtained by proteolytic and chemical extractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) roe. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 376–383, 2008.
- ANARJAN, A.; TAN, C. P. Chemical stability of astaxanthin nanodispersions in orange juice and skimmed milk as model food systems. **Food Chemistry**, v. 139, p. 527-531, 2013.
- A.O.A.C. **Association of Official Analytical Chemist's**. Official Methods of Analysis. 15^a ed., Washington, 1997.
- A.O.A.C. **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis, 17^a ed., v. 1-2, Washington, 2000.
- AUGUSTI, P.R. **Efeito dos Carotenoides Licopeno e Astaxantina sobre danos renais induzidos por cloreto de mercúrio**, Dissertação (Mestrado em Bioquímica Toxicológica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.
- AYORINDE F.O.; GELAIN S.V.; JOHNSON J.H.; WAN L.W. Analysis of some commercial polysorbate formulations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14 (22), p. 2116–2124, 2000.
- BHATT, T.; MADHAV, S. A detailed Review on nanoemulsion drug delivery system. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 2(10) p. 2482-2489, 2011.
- BLANCO-PADILLA, A.; SOTO, K.; HERNÁNDEZ, M.; MENDOZA, S. Food Antimicrobials Nanocarriers. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 0-11, 2014.
- BODMEIER, R.A. Waxes. **Encyclopedia Pharmaceutical Technology**. Marcel Dekker. New York, NY, p. 2988-2999, 2002.
- BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico Mercosul sobre “Lista geral harmonizada de aditivos alimentares e suas classes funcionais”**, 2005. Disponível em www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B12925-1-0%5D.PDF

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura 2014, disponível em <http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Publicidade/Cartilha-Balan%C3%A7o-2013-Minist%C3%A9rio-Pesca-Aquicultura.pdf>. Acesso em 24 de Outubro do 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Pecuária 2015. Plano de Gestão para o Uso Sustentável da Tainha (*Mugil liza*) nas Regiões Sudeste e Sul do Brasil”, formalizado através da Portaria Interministerial nº 03, de 14 de maio de 2015 disponível em <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-aquatica/recursos-pesqueiros/item/10444-plano-de-gest%C3%A3o-da-tainha>. Acesso em 26 de Março de 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 270, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para óleos vegetais, gorduras vegetais e creme vegetal. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em 23 de março de 2015.

BRITANNICA ACADEMIC, s. v. "fatty acid" **Encyclopaedia Britannica**, 2016 disponível em <http://academic-ebritannica.ez40.periodicos.capes.gov.br/EBchecked/topic/202621/fatty-aci>. Acesso em 07 de Março de 2016.

CALDER, P.C. n–3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, p. S1505–S1519, 2006.

CALDER, P.C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 75:3, p. 645–662, 2012.

CALVIELLO, G.; SERINI, S.; PICCIONI, E. n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and the Prevention of Colorectal Cancer: Molecular. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p 3059-3069, 2007.

CARVALHO, P.; CAMPOS, P.; D’ADDIO NOFFS M.; OLIVEIRA, J.; SHIMIZU, M.; DA SILVA, D. Aplicação de Lipases microbianas na obtenção de concentrados de ácidos graxos poli-insaturados. **Química Nova**, v. 26, p. 75-80, 2003.

CAVALHEIRO, J. C. **Hidrolise de óleo de canola catalisada por mistura de lipases imobilizadas**. Trabalho de conclusão de curso, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2013.

CENTENARIO, G. **Obtenção de biopeptídeos com atividade antioxidante a partir de proteínas de origem animal**. Tese (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2011.

CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe). **Perspectivas de la agricultura y la vida rural en las Américas 2014**, San José, Costa Rica: IICA, 2013. 230 p. disponível em: <http://www.fao.org/docrep/019/i3702s/i3702s.pdf>. Acesso em 30 de out. de 2014. 23:34:14.

CHAUDARI, K. R.; UKAWALA, M.; MANJAPPA, A. S.; KUMAR, A.; MUNDALA, P. K.; MISHRA, A. K. Opsonization, Biodistribution, Cellular Uptake and Apoptosis Study of PEGylated PBCA Nanoparticle as Potential Drug Delivery Carrier. **Pharmaceutical Research**, v. 29, p. 53 – 68, 2012.

CHEN, B.; MC CLEMENTS, J.; DECKER, E. Design of Foods with Bioactive Lipids for Improved Health. **Annual Review Food Science and Technology**, v.4, p. 35-56, 2013.

CHO, Y.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D. Formation of Protein-Rich Coatings around Lipid Droplets Using the Electrostatic Deposition Method. **Langmuir**, v. 26 p. 7937-7945, 2010.

CLAYTON, E. H.; HANSTOCK, T. L.; GARG, M. L.; HAZELL, P. L. Long chain omega-3 polyunsaturated fatty acids in the treatment of psychiatric illnesses in children and adolescents. **Acta Neuropsychiatrica**, v. 19, p. 92–103, 2007.

CODEX, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Organización Mundial de la Salud. **INFORME DE LA 24.ª REUNIÓN DEL COMITÉ DEL CODEX SOBRE GRASAS Y ACEITES**. Melaka, Malasya, 2015.

CODEX, Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura. Organización Mundial de la Salud. **NORMA GENERAL PARA LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS**. CODEX STAN 192-1995 Adoptado en 1995. Revisión 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011, 2012, 2013, 2014, 2015.

CREXI, V.T.; GRUNENVALDT, F. L.; SOARES, L.; PINTO, L. A. Deodorisation process variables for croaker (*M. furnieri*) oil. **Food Chemistry**, v. 114, p. 396–401, 2009.

CREXI, V.T. **ÓLEO DE CARPA (Cyprinus carpio): obtenção, refino e produção de concentração de ácidos graxos poli-insaturados**, 131f. Teses (Doutorado em Engenharia e Ciências de Alimentos) - Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2010.

CREXI, V.T.; MONTE, M.; MONTE, M.; PINTO, L. A. Polyunsaturated Fatty Acid Concentrates of Carp Oil: Chemical Hydrolysis and Urea Complexation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p.329–334, 2012.

DAS; CHAUDHURY. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **AAPS PharmSciTech**, v.12, p. 62–76, 2011.

DHANKHAR, J.; SUMITA, S.; SHARMA, A. Astaxanthin: a potential carotenoid. **International Journal of Pharmaceutical Science and Research**, v. 3, p. 1246-1259, 2012.

DIMA, S.; DIMA, C.; IORDĂCHESCU, G. Encapsulation of Functional Lipophilic Food and Drug Biocomponents. **Food Engineer Review**, v.7, p.417–438, 2015.

DORA, C. **Nanocarreadores lipídicos contendo quercetina: Desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação biológica *in vivo***. f. 225. Teses (Doutorado em Farmácia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2010.

DUNCAN, T. V. Applications of nanotechnology in food packaging and food safety: Barrier materials, antimicrobials and sensors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 363, p. 21–24, 2011.

DURAN, N.; CAPPARELLI, L.; MORAIS, C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. Imp. Artliber, 2012. São Paulo. 208 p.

ESQUERDO, V.M.; DOTTO, B.; PINTO, L.A.A. Preparation of nanoemulsions containing unsaturated fatty acid concentrate–chitosan capsules. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 445, p 137–142, 2015.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), **Fishery Statistics**, 2014, disponível em <http://www.fao.org/fishery/en>. Acesso em 10 de out. 2014, 8:05:23.

FANGUEIRO, J. **Desenvolvimento e formulação de nanopartículas lipídicas muco adesivas**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2012.

FATHI, H.; KELLY, J.; VASQUEZ, V.; GRAEVE, O. Ionic Concentration Effects on Reverse Micelle Size and Stability: Implications for the Synthesis of Nanoparticles. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, v.28 (25), p. 9267-9274, 2012

FATHI, M.; VARSHOSAZ, J.; MOHEBBI, M.; SHAHIDI, F. Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, p.1464–1475, 2013.

GAMEZ-MEZA, A.; RODRIGUEZ, A.; MEDINA, L.; JUAREZ, A.; ORTEGA-GARCIA, J.; MONROY-RIVERA, B.; TORO-VAZQUEZ, C.; GARCIA H; ÂNGULO–GUERRERO, B. Concentration of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil by hydrolysis and urea complexation. **Food Research International**, v. 36, p.721–727, 2003.

GANDHI, N. Applications of Lipase. Review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 74, p. 621-634,1997.

GIONGO, L. J. **Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus sp.*** Dissertação. (Mestrado em Microbiologia agrícola e médio ambiente) Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 2006.

HARRISON, I.J. **Mugillidae, FAO Species Identification Guide for Fisheries Purposes, The living Marine Resources of the Western Central Pacific**, v. 4. Bony, ed. K. Carpenter and V. H. Neim, Rome: FAO, 1999.

HATEGEKIMANA, J.; MASAMBAA, K.J.; JIANGUO, M.; ZHONGA, F. Encapsulation of vitamin E: Effect of physicochemical properties of wall material on retention and stability, **Carbohydrate Polymers**, v. 124, p. 172–179, 2015

HIGUERA-CIAPARA, I.; FELIX-VALENZUELA L.; GOYCOOLEA F. Astaxanthin: A review of its chemistry and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, p. 185–196, 2006.

HOMAYOONI, B.; SAHARI, M.; E BARZEGAR, M. Concentrations of omega-3 fatty acids from rainbow sardine fish oil by various methods. **International Food Research Journal**, v. 21, p. 743-748, 2014.

HU, Y.; XIE, J.; TONG, Y. W.; WANG, C. H. Effect of peg conformation and particle size on the cellular uptake efficiency of nanoparticles with the hep G2 cells. **Journal of Controlled Release**, v. 118, p. 7-17, 2007.

HUANG, Q.; YU, H.; RU, Q. Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. **Journal Food and Science**, v. 75, p. R50–R57, 2010.

IICA, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Informe anual 2013 del IICA Por una agricultura competitiva y sustentable para las Américas**, 2014 disponível em www.iicabr.iica.org.br/tag/informe-anual-2013, acesso em novembro 2014.

ICI AMERICAS, Meaning of HLB. Advantages and Limitations, p. 0-22, 1990.

KAHVECI, D.; XU, X. Repeated hydrolysis process is effective for enrichment of omega 3 polyunsaturated fatty acids in salmon oil by *Candida rugosa* lipase. **Food Chemistry**, v.129, p.1552–1558, 2011.

KHAN, A.Y.; TALEGAONKAR, S.; IQBAL, Z.; AHMED, T.J.; KHAR, R.K. Multiple emulsions: an overview. **Current Drug Delivery Journal**, v. 3, p. 429-443, 2006.

KIM, D. M.; HYUN, S. S.; YUN, P.; LEE, C.H.; BYUN, S. Y. Identification of an emulsifier and conditions for preparing stable nanoemulsions containing the antioxidant astaxanthin. **International Journal of Cosmetic Science**, v., 34, p. 64–73, 2012.

KOMAICO, J.; MC CLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 122–128, 2015.

KRALOVEC, J.; BARROW, C.; ZHANG, S.; ZHANG, W. A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. **Food Chemistry**, v. 131, p. 639–644, 2012.

KUMAR, G. P.; DIVYA, A. Nanoemulsion Based Targeting in Cancer Therapeutics. **Medicinal chemistry**, v. 5, p. 272-284, 2015.

KUROZAWA, L.; PARK, K.; HUBINGER, M. Influence of process conditions on enzymatic hydrolysis kinetics of chicken meat. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 29(3). p. 557-566, 2009.

LACATUSU, I.; BADEA, N.; OVIDIU, O.; BOJIN, D.; MEGHEA, A. Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. **The Journal of Nanoparticle Research**, v. 14:902, p. 1-16, 2012.

LACATUSU, I.; BADEA, N.; NICULAE, G.; BORDEI, N.; STAN, R.; MEGHEA, A. Lipid nanocarriers based on natural compounds: An evolving role in plant extract delivery. **European Journal Lipid Science and Technology**, v. 116, p. 1708–1717, 2014.

LACATUSU, I.; MITREA, E.; BADEA, N.; STAN, R.; OVIDIU, O.; MEGHEA, A. Lipid nanoparticles based on omega-3 fatty acids as effective carriers for lutein delivery:

Preparation and in vitro characterization studies. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 1260-1269, 2013.

LAVIE, C.; MILANI, R.; MEHRA, M.; VENTURA, H. Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Cardiovascular Diseases. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 54, p. 585-594, 2009

LI, Y.; ZHENG, J.; XIAO, H.; MC CLEMENTS, D. J. Nanoemulsion-based delivery systems for poorly water-soluble bioactive compounds: Influence of formulation parameters on polymethoxyflavone crystallization. **Food Hydrocolloids**, v. 27, p. 517- 528, 2012.

LINDER, M.; KOCHANOWSKI, N.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Response surface optimisation of lipase-catalysed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acids from salmon oil. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 273–279, 2005.

LINDER, M.; FANNI, J.; PARMENTIER, M. Proteolytic Extraction of Salmon Oil and PUFA Concentration by Lipases. **Marine Biotechnology**, v. 15, p. 70-76, 2005.

LIU, S.; ZHANG, C.; HONG, P.; JI, H. Concentration of docosahexaenoic acid (DHA) and eicosapentaenoic acid (EPA) of tuna oil by urea complexation: optimization of process parameters. **Journal of Food Engineering**, v. 73, p. 203–209, 2006.

LIU, G. Y.; WANG, J. M.; XIA, Q. Application of nanostructured lipid carrier in food for the improved bioavailability. **European Food Research Technology**, v. 234, p. 391–398, 2012.

LIVNEY; YOAV, D. Nanostructured delivery systems in food: latest developments and potential future directions. **Current Opinion in Food Science**, v. 3, p.125–135, 2015.

LV, G.; WANG, F.; CAI, W.; ZHANG, X. Characterization of the addition of lipophilic Span 80 to the hydrophilic Tween 80-stabilized emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects**, v.447, p. 8–13, 2014.

MAZZA, M.; POMPONI, M.; JANIRI, L.; BRIA, P.; MAZZA, S. Omega-3 fatty acids and antioxidants in neurological and psychiatric diseases: **An overview. Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 31, p. 12–26, 2007.

MC CLEMENTS, D. J. Edible nanoemulsions: Fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v. 7, p. 2297–2316, 2011.

MC CLEMENTS, J.; DECKER, E.; PARK, Y.; WEISS, J. Structural design principles for delivery of bioactive components in nutraceuticals and functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 577–606, 2009.

MC CLEMENTS, J.; RAO, J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51(4), p. 285-330, 2011.

MC CLEMENTS, J.; DECKER, E.; PARK, Y. Controlling lipid bioavailability through physicochemical and structural approaches. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 48–67, 2008.

- MC NAMARA, R. K. The emerging role of omega-3 fatty acids in psychiatry. Prostaglandins, **Leukotriens and Essential Fatty Acids**, v. 75, p. 223–225, 2006.
- MC NEILL, G. P.; MOORE, S. R. e ACKMAN, R. G. Lipase-catalyzed enrichment of long-chain polyunsaturated fatty acids. **Journal of American Oil Chemist's Society**, 73(11), 1403–1407, 1996.
- METCALFE, L. D.; SCHMITZ, A. A.; PELKA, J. R. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. **Analytical Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 514 - 515, 1966.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-196, 2001.
- MENEZES, M. E.; LIRA, M. G.; OMENA, C. M.; FREITAS, D.; SANT'ANA, A. Composição centesimal, colesterol e perfil de ácidos graxos dos peixes tainha (*Mugil cephalus*) e camurim (*Centropomus undecimalis*) da Lagoa Mundaú, AL/Brasil. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 67, p. 89-95, 2008.
- MORAIS, H.F.N. **Terrine de tainha: Avaliação Sensorial, Físico-Química e Microbiológica**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.
- MULLER, R.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W.; LUCKS, J. Production of solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. **Proceedings of international symposium on control release bioactive material**, 1993
- MÜLLER, R.; SHEGOKAR, R.; KECK, C. 20 year of lipid nanoparticles (SLN and NLC): present state of development and industrial applications. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 8, p. 207 – 227, 2011.
- NAGUIB, Y.M.A. Antioxidant Activities of Astaxanthin and Related Carotenoids, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p. 1150-1154, 2000.
- NELSON, J.S. **Fishes of the World**. Third ed. John Wiley and Sons, INC. New York, Unites States, 1994.
- NEVES, M; RIBEIRO, H.S.; FUJII, K.; KOBAYASHI, I.; NAKAJIMA, M. Formulation of Controlled Size PUFA-Loaded Oil-in-Water Emulsions by Microchannel Emulsification Using β -Carotene-Rich Palm Oil. **Industry Engineering and Chemical Resources**, v. 47, p. 1- 17, 2008
- NO, D. S.; ZHAO, T. T.; KIM, Y.; YOON, W.; LEE, J.; KIM I., Preparation of highly purified pinolenic acid from pine nut oil using a combination of enzymatic esterification and urea complexation. **Food Chemistry**, v. 170, p. 386–393, 2015.
- NOBRE, L. **Elaboração de concentrados de ácidos graxos insaturados obtidos a partir de óleos de bijupirá (*Rachycentron canadum*) e castanha (*Umbrina canosai*)** 87 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, 2014.

OKADA, T.; MORRISSEY, M. Production of n-3 polyunsaturated fatty acid concentrate from sardine oil by lipase-catalyzed hydrolysis. **Food Chemistry**, v. 103, p. 1411–1419, 2007.

PADILHA, M. E. ; AUGUSTO-RUIZ, W. Enzymatic hydrolysis of the fish oil. **Ciência, Tecnologia de Alimentos**, v. 27(2), p. 285-290, 2007

PADILHA, M. E. ; AUGUSTO-RUIZ, W. Fatty acid isolation by crystallization of fish oil fractioned by enzymatic hydrolysis. **Ciência, Tecnologia de Alimentos**, v. 30, 2010

PASTORE G. M.; DA COSTA, V.; KOBLITZ, M. G. Production, partial purification and biochemical characterization of a novell *Rhizopus* sp. strain lipase. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 23(2), p. 135- 140, 2003.

PRADHAN, N.; SINGH, S.; OJHA, N.; SHRIVASTAVA, A.; BARLA, A.; RAI, V.; BOSE, S. Facets of Nanotechnology as Seen in Food Processing, Packaging, and Preservation Industry. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 0-17, 2015.

PURI, A; LOOMIS, K; SMITH, B; LEE, J.H.; YAVLOVICH, A.; HELDMAN, E.; BLUMENTHAL, R. Lipid based nanoparticles as pharmaceutical drug carriers: from concepts to clinic. **Critical reviews in therapeutic drug carrier systems**. v. 26, p.523-580, 2009.

QIAN, J.; ZHANG, H.; LIAO, Q. The properties and kinetics of enzymatic reaction in the process of the enzymatic extraction of fish oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p. 280–284, 2011.

QIAN, C.; MC CLEMENTS, J.; DECKER, E.A.; XIAO, H., Inhibition of β -carotene degradation in oil-in-water nanoemulsions: Influence of oil-soluble and water-soluble antioxidants. **Food Chemistry**, v.135, p.1036-1043, 2012.

RANJAN, S.; DASGUPTA, N.; CHAKRABORTY, R. A.; SAMUEL, S. M.; RAMALINGAM, C.; SHANKER, R.; KUMAR, A. Nanoscience and nanotechnologies in food industries: opportunities and research trends. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, p.1-23, 2014.

REESE, M., Nanotechnology: using co-regulation to bring regulation of modern technologies into of 21st. **Health Matrix**, v. 23, 2013.

REGO, F. L., **Estudo de perfil de ácidos graxos e a razão entre ômega6/ômega 3 em pescado**, Tese (Doutor em Ciências), Universidade Federal de Bahia, Bahia, 2012.

RELKIN, P.; ANTON, M. **Nanotechnologies for Solubilization and Delivery in Foods, Cosmetics and Pharmaceuticals**, ed. Nissim Garti, Idit Amar-Yuli, EUA, 2012

RIBEIRO, H.; GUERRERO, J.; BRIVIBA, K.; RECHKEMMER, G.; SCHUCHMANN, H.; SCHUBERT, H., Cellular uptake of carotenoid-loaded oil-in-water emulsions in colon carcinoma cells in vitro, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 9366–9369, 2006.

- RODRIGUES, M.I.; LEMMA, A.F. **Desenho experimental e Otimização de Processos**. Casa de Espirito Amigo Fraternidade Fé e Amor, Campinas, SP, Brasil, 2012.
- RUBIO-RODRÍGUEZ, N.; BELTRÁN, S.; JAIME, I.; DE DIEGO, S.; SANZ, M.; CARBALLIDO, J. Production of omega-3 polyunsaturated fatty acid concentrates: A review. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.11, p. 1-12, 2010.
- SAHARI, M. A.; FARAHANI, F.; SOLEIMANIAN, Y.; MOKHLESI, A. n-3 Fatty Acid Distribution of Commercial Fish Species Components. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 90, p. 1167-1178, 2013.
- SÁNCHEZ-CAMARGO, A. P.; MARTINEZ-CORREA, H. A.; PAVIANI, L. C.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of lipids and astaxanthin from Brazilian red spotted shrimp waste (*Farfantepenaeus paulensis*). **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 164–173, 2011.
- SANGUANSRI, P.; AUGUSTIN, M.A. Review Nanoscale materials development e a food industry perspective. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, p. 547 – 556, 2006.
- SEKHON, BHUPINDER S. Food nanotechnology – an overview, **Nanotechnology, Science and Applications** , v. 3, p. 1–15, 2010.
- SHAH, R.; ELDRIDGE, D.; PALOMBO, E.; HARDING, I. **Lipid Nanoparticles: Production, Characterization and Stability**. Australia: Springer Cham Heidelberg New York Dordrecht London, 2014.
- SHAHIDIA, F.; ZHONG, Y., Lipid oxidation and improving the oxidative stability, **Chemical Society review**, v.39, p. 4067-4079, 2010
- SHIMADA, Y.; FUKUSHIMA, N.; FUJITA, H.; HONDA, Y.; SUGIHARA, A.; TOMINAGA, Y. Selective Hydrolysis of Borage Oil with *Candida rugosa* Lipase: Two Factors Affecting the Reaction. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 75, p. 1581–1586, 1998.
- SCHMIDT, C.G.; SALAS-MELLADO, M. Influência da ação das enzimas alcalase e flavourzyme no grau de hidrólise das proteínas de carne de frango. **Química Nova**, v. 32, p. 1144-1150, 2009
- SILVA, D.; CERQUEIRA, M.; ANTÓNIO A. V. Influence of surfactant and processing conditions in the stability of oil-in-water nanoemulsions. **Journal of Food Engineering**, v. 167, p. 89–98, 2015
- SILVA, D.; CERQUEIRA, M.; ANTÓNIO A. V. Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization. **Food Bioprocess Technol**, v. 5, p. 854-867, 2012.
- SOUTO, E.; MÜLLER, R. Lipid nanoparticle (NLS and NLC) for Drug delivery. **Nanoparticles for Pharmaceuticals Applications**, p. 103- 122, 2007.
- SOUTO, D.; MARTINSA, S.; COSTA-LIMA, B.; CARNEIRO, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, B.; FERREIRA, A., Solid lipid nanoparticles as intracellular drug transporters: An

investigation of the uptake mechanism and pathway. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 430, p. 216–227, 2012.

STAMP, L.K.; JAMES, M.J.; CLELAND, L.G. Diet and rheumatoid arthritis: a review of the literature. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 35, p. 77–94, 2005.

STILLWELL, W.; WASSALL, S. R. Docosahexaenoic acid: Membrane properties of a unique fatty acid. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, p. 1–27, 2003.

TAKSIMA, T; LIMPAWATTANA, M.; KLAYPRADIT, W. Astaxanthin encapsulated in beads using ultrasonic atomizer and application in yogurt as evaluated by consumer sensory profile. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 431 e 437, 2015.

TAN, C.P.; ANARJAN, A.; IRHOSSEINI, H.; BAHARIN, B.S. Effect of processing conditions on physicochemical properties of sodium caseinate-stabilized astaxanthin nanodispersions. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1658 - 1665, 2011.

TAMJIDI, F.; SHAHEDI, M; VARSHOZAS, J.; NASIRPOUR, A. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 26, p. 366-374, 2014.

VISENTAINER, J. V.; SOUZA, E.; MAXIMILIANO, A.; CARVALHO, P.; ALMEIDA, V.; OLIVEIRA, D. Lipid Content and Fatty Acid Composition of 15 Marine Fish Species from the Southeast Coast of Brazil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 84, p. 543-547, 2007

WANASUNDARA, U.; SHAHIDI, F. Concentration of omega 3-polyunsaturated fatty acids of seal blubber oil by urea complexation: optimization of reaction conditions. **Food Chemistry**, v. 65, p. 41–49, 1999.

GU, Z.; SUBURU, J.; CHEN, H.; CHEN, Y. Mechanisms of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids in Prostate Cancer Prevention. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-10, 2013.

ZHENG, K.; ZOU, A.; YANG, X.; LIU, F.; XIA, Q.; RUQIANG, M. B. The effect of polymer surfactant emulsifying agent on the formation and stability of α -lipoic acid loaded nanostructured lipid carriers (NLC). **Food Hydrocolloids**, v. 32, p.72-78, 2013

ZHU, J.; ZHUANG, P.; LUAN, L.; SUN, Q.; CAO, F. Preparation and characterization of novel nanocarriers containing krill oil for food application. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 902–912, 2015.

ZIANI, K.; FANG, Y.; MC CLEMENTS D. J. Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: Effect of composition and storage conditions. **Food Research International**, v. 46, p. 209–216, 2012.

ZUTA, C.; SIMPSON, B.; CHAN, H.; PHILLIPS, C., Concentrating PUFA from mackerel processing waste, **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, p. 933-936, 2003

APÊNDICE

Tabela A-1 - Perfil de ácidos graxos de óleo refinado de tainha e óleo hidrolisado com lipases a diferentes concentrações.

%ACIDOS GRAXOS	OLEO REFINADO	LYPOSYME 0,75%	LYPOSYME 0,50%	LYPOSYME 0,25%	AMANO 0,75%	AMANO 0,50%	AMANO 0,25%
C12 (Láurico)	0,132±0,000 ^a	0,329±0,003 ^c	0,430±0,039 ^{b,c}	0,066±0,000 ^a	0,552±0,017 ^b	0,331±0,132 ^c	0,493±0,00 ^{b,c}
C16 (Palmítico)	24,523±017 ^b	23,547±0,289 ^b	24,416±0,049 ^b	24,377±0,175 ^b	23,744±0,344 ^a	22,141±0,027 ^a	21,944±0,571 ^a
C17 (Margárico)	0,846±0,061 ^a	0,675±0,165 ^a	0,866±0,005 ^a	0,817±0,027 ^a	0,886±0,014 ^a	0,631±0,137 ^a	0,672±0,164 ^a
C18 (Esteárico)	3,182±0,196 ^a	0,105±0,022 ^b	0,164±0,081 ^b	0,111±0,010 ^b	0,148±0,024 ^b	0,166±0,012 ^b	0,141±0,044 ^b
∑AGS	28,683	25,371	25,876	24,656	22,250	21,935	22,369
C:16:1 (Palmitoleico)	8,435±0,243 ^a	8,397±0,422 ^a	8,631±0,068 ^a	8,103±0,508 ^a	8,490±0,059 ^a	8,145±0,605 ^a	8,658±0,336 ^a
C:17:1 (Heptadecenoico)	2,374±0,089 ^b	2,390±0,050 ^b	2,474±0,016 ^b	2,390±0,055 ^b	2,642±0,038 ^a	2,297±0,107 ^b	2,488±0,043 ^a
C18:1 n9 (Oleico)	34,441±0,319 ^c	34,442±0,132 ^c	33,311±0,103 ^a	34,521±0,213 ^c	32,454±0,033 ^b	35,207±0,101 ^a	33,275±0,525 ^{c,d}
C20:1 n9	1,649±0,004 ^a	1,148±0,062 ^b	1,092±0,002 ^b	1,079±0,014 ^b	1,126±0,019 ^b	1,076±0,051 ^b	1,109±0,019 ^b
C22:1n9	3,041±0,003 ^b	3,219±0,060 ^b	3,112±0,009 ^b	3,237±0,049 ^b	3,142±0,060 ^b	2,986±0,015 ^b	2,554±0,018 ^a
∑AGMI	49,940	49,330	48,620	49,612	48,114	49,310	47,855
C18:3 n3 (α linolênico)	0,581±0,100 ^a	1,762±0,082 ^d	1,626±0,060 ^{b,c}	1,743±0,109 ^d	1,655±0,049 ^d	1,560±0,049 ^{b,c}	1,481±0,081 ^c
C20:4 n6	2,069±0,030 ^{a,b}	2,206±0,113 ^a	2,004±0,029 ^b	2,089±0,061 ^{a,b}	2,010±0,009 ^b	2,172±0,039 ^{a,b}	2,081±0,034 ^{a,b}
C20:5 n3 (Eicosapentaenoico)	10,367±0,299 ^a	12,847±0,167 ^d	12,89±0,150 ^d	12,326±0,0110 ^d	15,523±0,009 ^b	15,098±0,188 ^b	14,524±0,116 ^c
C22:4n6	0,399±0,099 ^b	0,543±0,113 ^b	0,536±0,048 ^b	0,281±0,098 ^b	0,780±0,208 ^b	0,513±0,322 ^b	2,041±0,291 ^a
C22:5n3 (Docosapentaenoico)	1,817±0,042 ^a	1,886±0,033 ^a	1,822±0,026 ^a	1,830±0,188 ^a	1,946±0,009 ^a	1,806±0,035 ^a	1,848±0,069 ^a
C22:6n3 (Docosaexaenoico)	6,142±0,173 ^b	7,043±0,081 ^{a,d}	6,656±0,026 ^{b,d}	6,856±0,382 ^d	7,043±0,81 ^{a,d}	7,625±0,224 ^{a,c}	7,722±0,173 ^c
∑AGPI	21,377	25,312	25,536	26,101	29,699	28,774	30,008
∑AGI	71,317	74,643	74,156	75,713	77,813	78,084	77,862

Tabela A-2 - Formulações de nanocarreadores lipídicos contendo concentrado de ácidos graxos insaturados de tainha com o sem astaxantina testadas com diferentes tipos e concentrações de surfactantes lipídeos.

Formulações testadas	NE1	NE2	NE3	NE4	CLN1	CLN2	CLN3
CAGIT	800 mg	400 mg	350 mg	350 mg	105 mg	105 mg	240 mg
Ácido oléico	-	400 mg	350 mg	350 mg	105 mg	105 mg	-
Cera carnauba	-	-	-	-	-	-	560mg
Dynasan	-	-	-	-	490 mg	490 mg	-
Lecitina	200 mg	200 mg	300 mg	-	300 mg	-	200 mg
Tween 20	-	-	-	300 mg	-	300 mg	-
Tween 80	-	-	-	-	-	-	250 mg
Tocoferol	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg	50 mg
Astaxantina	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg	3 mg
Solutol 0,5%	400 mg	400 mg	300 mg	-	300 mg	-	-
Span 80	-	-	-	300 mg	-	300 mg	-
Fase aquosa	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Observações	Separou	Separou	Separou	Formou nanoemulsão porém precipitou Astaxantina	Separou	Separou	Formou carreador precipitou astaxantina

NE1, NE2, NE3,N4: nanoemulsões com diferentes formulações, CLN1, CLN2, CLN3: carreadores lipídicos nanoestruturados com diferentes formulações; CAGIT: concentrado de ácidos graxos de tainha