UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE ESQUALENO PROVENIENTE DO ÓLEO DO FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL VIA PRECIPITAÇÃO COM CO_2 SUPERCRÍTICO

PIRASSUNUNGA

2016

DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE ESQUALENO PROVENIENTE DO ÓLEO DO FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL VIA PRECIPITAÇÃO COM CO_2 SUPERCRÍTICO

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Engenharia de Alimentos

Orientadora: Profª. Drª. Alessandra Lopes de Oliveira

PIRASSUNUNGA
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237m

Santos, Débora Nascimento e
MICROENCAPSULAÇÃO DE ESQUALENO PROVENIENTE DO ÓLEO DO FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL VIA PRECIPITAÇÃO COM CO2 SUPERCRÍTICO / Débora Nascimento e Santos ; orientadora Alessandra Lopes de Oliveira. -- Pirassununga, 2016.
167 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.

1. Prionace glauca. 2. óleo de peixe. 3. esqualeno. 4. extração supercrítica. 5. PGSS. I. Oliveira, Alessandra Lopes de , orient. II. Título.

Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - o autor

Eu e a minha irmã Diana, ainda molecas, sentadas no banco de trás da velha brasília amarela. O Sol se pondo e deixando o céu rosa avermelhado por entre os galhos das plantas secas do calor do Nordeste... E as músicas da escola cantaroladas durante todo o caminho de volta para o sítio, nossa casa, até pelo meu idoso pai, que tentava aprendê-las. Em casa, minha mãe sempre esperava por todos nós. Dias perfeitos. Ainda não acredito que tudo isso me trouxe até aqui.

Dedico esta tese aos meus amados pais, exemplos de amor, sacrifício e simplicidade.
À minha orientadora, profa. Alessandra Lopes de Oliveira, em retribuição a estes seis anos de convívio e aprendizado.

AGRADECIMENTOS

Admiração e um sonho a se realizar. Foi o que me fez sair do Piauí, deixando família, amigos, emprego, bichos de estimação e tudo mais para buscar um título de Mestra e depois, Doutora em Pirassununga, São Paulo, na renomada Universidade de São Paulo, em Engenharia de Alimentos. Seis anos se passaram entre o Mestrado e o Doutorado e olhando para trás, muito mais que os títulos, que para mim são símbolos concretos de que sonhos podem se tornar realidade, eu finalizo esta importante etapa levando comigo grandes experiências, amigos verdadeiros e um crescimento pessoal e profissional imensurável.

Dessa forma, agradeço...

...primeiramente à Deus, meu refúgio, esperança e minha fonte de força maior, bem como aos espíritos amigos e protetores. Aos meus pais, fonte de inspiração, amor, apoio e paciência. Às minhas irmãs, Diana e Bruna, pelo incentivo de sempre. Não foi fácil me 'aturar' em alguns momentos, agradeço em especial à Bruna Rafaela pela paciência.

...em especial à minha querida orientadora Alessandra Lopes de Oliveira. Foram seis anos de muito aprendizado ao seu lado e não foram apenas conhecimentos acadêmicos, houve sempre bons conselhos sobre a vida e muitos momentos de descontração (seja nos congressos e nas confraternizações). Sei que tudo foi para o meu bem e agradeço demais por isso. Obrigada por confiar no meu trabalho e me ajudar a superar tantos desafios que surgiram neste tempo. A sua força e perseverança são exemplos para mim e toda a sua equipe.

...ao meu namorado Tiago, que nestes três anos me apoiou e respeitou o meu trabalho e a minha dedicação, me dividindo nos finais de semana com o laboratório. Obrigada meu amor, por descontrair a minha vida e estar comigo sempre! Aos seus familiares (Dona Ilda e seu Pedro, Paulinha e Pedro Henrique), que muitas vezes foram meu porto seguro (sem mesmo notarem) em Pirassununga. Aos meus familiares que, mesmo longe, sempre me apoiaram.

...aos meus amigos de sempre e parceiros de laboratório, porque afinal, para se chegar tão longe, Deus nos envia inúmeros anjos da guarda pelo nosso caminho. Adja Medeiros, Amanda Batista, Ana Caroline Pinheiro, Camila Marques, Carol Capellini, Daniel Gonçalves,

Diane de Neeff, Eliane Ferrarezzo, Fausto Makishi, Fernando Putrino, Frankeline Arêa-Leão, Gabriela Marques, Gisele Lourenço, Heber Santiago, Helena Cruz, Josiane Borges, Keliani Bordin, Leandro Alface, Lidiane Silva, Mariana Séfora, Mayra Carraro, Melina Yasuoka, Naila Oliveira, Natali Valadão, Oyebola Binjo, Paola Maressa, Talitinha Comunian, Vitor Garcia, Volnei Brito, Walisson Silva e tantos outros, muito obrigada por tudo!

...especialmente ao Nilson José Ferreira (ou mestre dos magos, que diferente do personagem dos desenhos, sempre aparece para nos salvar de alguma furada!) por toda a amizade, auxílio, conselhos, revezamentos no horário do almoço, me permitir trabalhar nos fins de semana, enfim, por todo o seu companheirismo nestes 6 anos. A convivência e o ambiente de trabalho calmo são melhores na sua presença. O LTAPPN tem um grande esteio, você.

...à todos os professores do Departamento de Engenharia de Alimentos, representados pelos professores Antônio Trindade, Carmen Trindade, Christianne Rodrigues, Cíntia Bernardo, Elisabeth Viegas, Mônica Mazalli, Maria Teresa Freire e Rosemary Carvalho. À minha *teacher* mais querida, Monique Marangon, que foi mais que uma mestra em inglês para mim, foi uma grande amiga durante os 3 anos de aprendizado.

...aos demais funcionários do Departamento de Engenharia de Alimentos, representados pela Keylinha (auxílio com as análises de viscosidade e densidade), Marcelo (auxílio com as análises de umidade e atividade de água), Camila (auxílio com as análises de diâmetro médio de partículas), Fabinho (auxílio com as análises de cor), Carla, Guilherme, Rodrigo (auxílio com as análises de FTIR e microscopia eletrônica de varredura).

...à Pós-Doutora Sheyla Cristina Vargas (FZEA/ USP) pela doação das vísceras de beijupirá.

...ao Sr. José da empresa Oceanus (Recife, PE), Edson e a Pós-Doutora Mariana Gomes do Rêgo (UFRPE) por toda a ajuda na obtenção dos fígados de cação-azul. Ao Matadouro Escola da FZEA/USP pelo auxílio com o beneficiamento das amostras.

...ao Sr. Cláudio de Oliveira da Fazenda Marinha Bijupirá de Ubatuba (Ubatuba, SP) pela doação da segunda remessa de fígados de beijupirá.

...às minhas queridas alunas de iniciação científica, Alessandra, Eliane e Franciely, que tanto me ajudaram durante os experimentos, o meu 'muito obrigada' e votos de muito sucesso a vocês.

...à todos da seção de Pós-Graduação pelo auxílio com as questões burocráticas.

...às queridas Sônia e Carmen da cantina do ZEA, que sempre tinham um café quentinho, bons ouvidos e muitas histórias divertidas.

...à reumatologista Ângela de Campos, por me ajudar em um dos momentos mais complicados da minha vida, a recuperação da minha saúde.

...Ao Vitor e Mariana do INFABIC pelo auxílio com as análises de microscopia confocal.

...ao prof. Reinaldo Bazito (IQ/USP) e à Dra. Lígia Passos Maia pelo auxílio com o estudo da solubilidade dos polímeros em meio supercrítico.

...à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização dos cursos de Mestrado e Doutorado. Para mim, é um imenso orgulho fazer parte desta brilhante Instituição.

...à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de Doutorado (processo FAPESP n° 2012/00467-3) e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

"Diante da noite, não acuse
as trevas. Aprenda a fazer
luz." André Luiz

Mas como é bom morar lá na roça
Numa palhoça na beira do rio
A chuva cai e o sapo fica contente
Que até alegra a gente com seu desafio
- Tião
- Oi!
- Fostes?
- Fui!
- Comprastes?
- Comprei!
- Pagaste?
- Paguei!
- Me diz quanto foi?
- Foi quinhentos réis...

Cantiga do Sapo
Gilberto Gil

RESUMO

SANTOS, D. N. **Microencapsulação de esqualeno proveniente do óleo do fígado de cação-azul via precipitação com CO_2 supercrítico.** 2016. 166f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

O óleo do fígado de cação-azul tem um valor nutricional elevado e é rico em inúmeras substâncias ativas, tais como o esqualeno, vitamina A e ácidos graxos poli-insaturados. A proposta desta pesquisa foi obter o óleo de fígado de cação-azul (*Prionace glauca*) sob condições brandas de temperatura usando extração com fluido supercrítico (SFE) e estudar o processo de microencapsulação deste, utilizando o sistema de formação de partículas por soluções ou suspensões em gás saturado (PGSS). Para estudar os parâmetros de extração supercrítica do óleo de cação-azul, utilizou-se em um primeiro momento o fígado de beijupirá (*Rachycentron canadum*) como modelo e realizou-se extrações supercríticas a diferentes condições de temperatura (T, 50, 60 e 70 °C) e vazão de CO_2 (5, 8 e 11 g CO_2/min) sob uma mesma pressão (P) de 250 bar. Considerando as condições de maior rendimento, definiu-se para o fígado de cação-azul um delineamento de blocos completos, com 5 níveis de P (100, 150, 200, 250 e 300 bar) e 2 níveis de T (50 e 60°C). Com os diferentes óleos de fígado de cação-azul (OFCA) óleo de fígado de beijupirá (OFB) e óleo de fígado de tubarão comercial (OFTC), foram realizadas medidas físico-químicas (densidade, viscosidade, índice de refração, índice de acidez, valor de peróxido e índice de saponificação) e quantificou-se os ativos de interesse neste estudo, esqualeno, vitamina A e ácidos graxos essenciais. O OFCA com maior teor de esqualeno foi usado para a etapa de formação de micropartículas por meio da técnica PGSS, na qual partículas foram geradas usando como agentes de impregnação amidos modificados (Hi Cap® 100 e Purity Gum Ultra®) e caracterizadas. O OFB apresentou rendimentos distintos quando diferentes condições operacionais foram aplicadas, variando de 40 a 58% e estes resultados contribuíram para a definição das condições de extração do óleo de fígado de cação-azul. As características físico-químicas foram compatíveis com óleos sem refino, destacando-se o elevado teor de acidez (13,6 – 17% expresso como ácido oleico), que se julgou característico deste óleo. Foram encontrados ácidos graxos de elevado valor biológico. Os teores de ácidos graxos

monoinsaturados foram de 41,2 a 49 g/ 100 de OFB e ácidos graxos poli-insaturados variaram de 21,8 a 25,3 g/ 100g de OFB. O esqualeno nos óleos variou de 354 a 462 mg/ 100g de OFB, reforçando o potencial desta matriz para diversas aplicações. Os rendimentos das extrações do OFCA variaram de 0 a 60%, considerado, para os maiores valores, superiores aos métodos convencionais. O OFCA apresentou parâmetros físico-químicos como densidade de 0,920 a 0,922 $g.mL^{-1}$, viscosidade de 52 a 56 Pa.s, índice de refração de 1,4760 a 1,4785, índice de acidez de 1,1 a 2,2% em ácido oleico, valor de peróxido de 10 a 24 meq de O_2 ativo/ kg de OFCA e índice de saponificação de 171 a 556 mg KOH/ g de OFCA comparáveis a óleos de pescados refinados. Os ensaios de quantificação de esqualeno e vitamina A indicaram valores de 171 a 534mg de esqualeno/ 100 de OFCA e 579 a 3.682 Retinol equivalente/ g de OFCA. As micropartículas geradas exibiram um considerável índice de retenção de óleo na superfície, de 74 a 82% e, além disso, parâmetros como alta solubilidade e baixa higroscopicidade dos amidos modificados tornam estas partículas amplamente aplicáveis na área de alimentos. O estudo do comportamento dos amidos modificados Hi Cap® 100 e Purity Gum Ultra® em contato com CO_2 supercrítico não indicou expansão volumétrica nas amostras sob as condições avaliadas. Embora os óleos extraídos com CO_2 supercrítico tivessem características de óleos refinados, as análises de estabilidade das micropartículas mostraram a necessidade de refino para uma maior *shelf life* do produto. Os teores de esqualeno, composto encontrado em todos os dias e em todos os tratamentos analisados, decresceu ao longo do período de estudo da estabilidade (de 0 a 60 dias).

Palavras-chave: *Prionace glauca*, óleo de peixe, esqualeno, extração supercrítica, PGSS.

ABSTRACT

SANTOS, D. N. **Microencapsulation of squalene from blue shark liver oil by supercritical CO_2 precipitation.** 2016. 167 f. Thesis (PhD) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2016.

Blue shark liver oil has a high nutritional value and is rich in numerous active substances, such as squalene, vitamin A, polyunsaturated fatty acids. The purpose of this study was to obtain blue shark liver oil (*Prionace glauca*) under mild temperature conditions using supercritical fluid extraction (SFE) and to study the microencapsulation process of the oil using the particle formation system from gas saturated solution/suspension (PGSS). To study the supercritical extraction parameters of blue shark liver oil (BSLO), cobia liver (*Rachycentron canadum*) was used as a model and supercritical extractions were performed at different conditions of temperature (T, 50, 60 and 70 °C) and CO_2 flow rate (5, 8 and 11 g CO_2/min), under the same pressure (P) of 250 bar. Considering the higher yield conditions, it was set for the blue shark liver one complete block design with 5 levels of P (100, 150, 200, 250 and 300 bar) and 2 T levels (50 and 60 °C). With the different BSLO, cobia liver oil (CLO) and purchased shark liver oil (PSLO), physicochemical measurements (density, viscosity, refractive index, acid number, peroxide value and saponification number) were performed and the active of interest in this study (squalene, vitamin A and essential fatty acids) were quantified. The BSLO with the highest squalene content was used for microparticle formation step by the PGSS technique in which particles were generated using modified starches as impregnation agents (Hi Cap® 100 and Purity Gum Ultra®) and characterized. CLO had different yields, ranging from 40 to 58%, when different operating conditions were applied and these results contributed to the definition of extraction conditions of BSLO. The physicochemical characteristics were consistent with oils without refining, highlighting the high acid content (13.6 to 17% oleic acid), which was considered characteristic of CLO. The CLO has high biological value fatty acids. The levels of monounsaturated fatty acids were 41.2 to 49 g/ 100 of CLO and polyunsaturated fatty acids ranged from 21.8 to 25.3 g/ 100 g of CLO. Squalene in oils ranged 354 – 462 mg/ 100g of CLO, reinforcing the potential of this matrix for several applications. BSLO yields of extractions ranged 0-60%, considered for the highest values superior to conventional methods. BSLO showed physicochemical parameters

such as density from 0.920 to 0.922 g.mL^{-1}, viscosity from 52 to 56 Pa.s, refractive index of 1.4760 to 1.4785, acid number from 1.1 to 2.2% oleic acid, peroxide value from 10 to 24 meq of active O_2/ kg of BSLO and saponification number of 171-534 mg KOH/ kg of BSLO comparable to refined fish oils. The squalene and vitamin quantification assays indicated values of 161.30 to 542.55 mg of squalene/ 100g of BSLO and 579-3,682 retinol equivalent/ g of BSLO. The generated microparticles showed considerable oil retention index on the surface, 74-82% and, in addition, parameters such as low hygroscopicity and high solubility of modified starches makes these particles widely applicable in the food area. The behavior study of modified starches Hi Cap® 100 and Purity Gum Ultra® in contact with supercritical CO_2 has not indicated volumetric expansion in the samples under the conditions evaluated. Although the oil extracted with supercritical CO_2 had refined oils characteristics, analyzes the stability of the microparticles showed the necessity of refining for greater shelf life of the product. Squalene found decreased along the stability study period (0 to 60 days), however, it was found in every day and analyzed in all treatments. The squalene content, the compound found in every day and for all treatments analyzed, decreased along the stability study period (0 to 60 days).

Palavras-chave: *Prionace glauca*, fish oil, squalene, supercritical extraction, PGSS.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de produtos e sub produtos obtidos a partir do uso integral de pescado 25

Figura 2 - Evolução da aplicação de óleo de peixe 26

Figura 3 - Via de biossíntese do esqualeno e estrutura química do esqualeno ao centro..... 29

Figura 4 - Definição de estado supercrítico para um composto puro 35

Figura 5 - Cápsulas de óleo de fígado de tubarão comercial 49

Figura 6 - Amostra de fígado de beijupirá congelado antes da liofilização (a) e fígado liofilizado com sua embalagem de armazenamento ao lado (b)..... 50

Figura 7 - Obtenção e preparo dos fígados de cação-azul. O cação-azul (superior, esquerda) e seu fígado (superior direita). Detalhe na vesícula biliar (inferior, esquerda) e um fígado fatiado pronto para liofilização (inferior, direita)..... 51

Figura 8 - Extrator supercrítico da Thar Technologies Inc.. Em destaque, o cilindro de CO_2 (1), banho termostatizado (2), bomba HPLC (3), trocador de calor (4), controle das temperaturas (5), controlador de pressão (6), frasco de coleta de extratos (7) e tela do software (8) 53

Figura 9 - Amostra de óleo de fígado de beijupirá logo após a extração supercrítica (a) e fígado liofilizado após a SFE (b) 54

Figura 10 - Amostras de fígado de cação-azul antes da extração (a) e óleo resultante da SFE, com o óleo comercial da ECOMER à direita (b) 56

Figura 11 - Curva padrão de metil meristato com equação linear da reta para quantificação dos ácidos graxos 61

Figura 12 - Curva padrão de esqualeno com equação linear da reta para quantificação do esqualeno..... 63

Figura 13 – Desenho esquemático (sem escalas) do equipamento de microencapsulação em meio supercrítico. Cilindro de CO_2 (1), válvulas (2), filtro (3), banho termostatizado (4), bomba do CO_2 (5), autoclave (6), manômetro (7), termopar (8), misturador (9) e vaso de expansão (10) 66

Figura 14 - Monitor de fases utilizado nos ensaios de comportamento dos polímeros em meio supercrítico. Disposição do polímero do tubo de vidro (a) e dentro da cela do monitor de fases (b)..... 71

Figura 15 - Espaço de cor CIELab. 73

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura de fígado de beijupirá liofilizado antes da extração supercrítica do óleo (A) e após a extração a 250 bar, 8 g CO_2/ min, 60°C (B)..... 77

Figura 17 - Micrografias de amostras de fígado de cação-azul submetidas à SFE e amostra controle, sem extração 86

Figura 18 - Cromatogramas de íons totais do perfil de ácidos graxos dos óleos de fígado de cação-azul e óleo de tubarão comercial analisados em cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado..... 94

Figura 19 - Cromatogramas de íons totais da determinação de esqualeno nas amostras de óleo de tubarão realizadas em coluna RTX-5MS de acordo com Lu et al. (2003) 99

Figura 20 - Teores de esqualeno (mg/ 100g de amostra) em óleos de fígado de cação-azul obtidos por SFE e óleo de fígado de tubarão comercial (OFTC)..... 100

Figura 21 - Correlação entre teor de esqualeno e densidade do CO_2 aplicado na SFE dos óleos de fígado de cação-azul..... 101

Figura 22 - Vitamina A (expressa em retinol equivalente) no óleo de fígado de cação-azul obtidos por SFE sob diferentes condições e no OFTC 103
Figura 23 - Micrografias de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul em obtidas com a técnica PGSS, em diferentes tratamentos 105
Figura 24 - Estudo dos componentes individuais utilizando a microscopia confocal. Imagem dos polímeros e OFCA (esquerda) e gráfico de emissão de comprimento de onda (direita) 107
Figura 25 - Micrografia confocal da micropartícula de óleo de fígado de cação-azul com Purity Gum Ultra® (esquerda) e Hi Cap® 100 (direita) processadas a 60°C 108
Figura 26 - Distribuição do diâmetro médio de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul geradas pela técnica PGSS 110
Figura 27 - Espectros de FTIR dos componentes individuais da mistura e de cada pó produzido via técnica PGSS 112
Figura 28 - Imagens dos pós e polímeros puros ao final do ensaio de higroscopicidade 116
Figura 29 - Ensaio de expansão volumétrica com Hi Cap® 100 e Purity Gum Ultra® em meio supercrítico 118
Figura 30 - Amido modificado com anidrido octenil succínico 120
Figura 31 - Representação das cores das micropartículas 123
Figura 32 – Decaimento do índice de esqualeno (%) dos OFCA presentes nas micropartículas acondicionadas em dias diferentes 125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais ácidos graxos e sua respectiva classificação 33
Tabela 2 - Pontos críticos de alguns fluidos supercríticos 36
Tabela 3 - Algumas pesquisas de extração de óleo de pescados utilizando CO_2 supercrítico 37
Tabela 4 - Principais métodos de formação de partículas utilizando CO_2 supercrítico 40
Tabela 5 – Verificação da influência da temperatura e da vazão de CO_2 na extração supercrítica do óleo de fígado de beijupirá 54
Tabela 6 - Condições operacionais P e T usadas na extração supercrítica do óleo do fígado de cação-azul 55
Tabela 7 - Composição da mistura para formação de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul 65
Tabela 8 - Composição centesimal do fígado de Beijupirá 76
Tabela 9 - Rendimento das extrações supercríticas de óleo de fígado de beijupirá aplicando diferentes temperaturas e vazões de CO_2 78
Tabela 10 - Caracterização físico-química dos óleos de fígado de beijupirá 80
Tabela 11 - Composição de ácidos graxos (g/ 100g OFB) e teor de esqualeno em óleo de fígado de beijupirá 82
Tabela 12 - Composição centesimal dos fígados de Cação-azul 84
Tabela 13 - Rendimentos da extração supercrítica de óleo de fígado de cação-azul (*Prionace glauca*), sob diferentes condições de P e T 85
Tabela 14 - Parâmetros físico-químicos do óleo de fígado de cação-azul obtidos via SFE 89
Tabela 15 - Índices de acidez, saponificação, peróxido e de iodo em amostras de óleo de fígado de cação-azul obtidos com SFE e do óleo de fígado de tubarão comercial 91
Tabela 16 - Perfil de ácidos graxos (g/ 100g óleo de fígado de peixe) de óleo de fígado de cação-azul e de tubarão comercial 97
Tabela 17 - Diâmetro médio das micropartículas de óleo de fígado de cação-azul e seus respectivos polímeros 108
Tabela 18 - Valores médios de umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade e retenção de óleo de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul geradas com a técnica PGSS 114
Tabela 19 - Medidas dos parâmetros L*, a* e b* para as micropartículas de óleo de fígado de cação-azul analisados em diferentes dias 122
Tabela 20 - Diferença total de cor entre as micropartículas em função do acondicionamento por 60 dias 123
Tabela 21 - Índices de peróxido (meq de O_2 ativo/ Kg de óleo) dos óleos de fígados de cação-azul presentes em micropartículas acondicionadas em dias diferentes 125

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A_w	Atividade de água
CO_2SC	Dióxido de carbono supercrítico
DAGE	Diacilglicerol
DHA	Ácido docosahexaenoico
DVA	Deficiência de vitamina A
EPA	Ácido eicosapentaenoico
ESFA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Fourier Transformed Infrared Radiation
HPLC	High Pressure Liquid Cromatoghraphy
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MUFA	Ácidos graxos monoinsaturados
OFB	Óleo de fígado de beijupirá
OFCA	Óleo de fígado de cação-azul
OFTC	Óleo de fígado de tubarão comercial
OSA	Anidrido octenil succínico
PEG	Polietilenoglicol
PGSS	Particle from Gas Saturated Solution/ Suspension
PUFA	Ácidos graxos poli-insaturados
RE	Retinol equivalente
RESS	Expansão Rápida da Solução Supercrítica
SFE	Supercritical fluid extraction
TAG	Triacilglicerol
TIC	Cromatograma de íons totais
U.I.	Unidades internacionais
VAD	Deficiência de vitamina A

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

a*	Cromaticidade no eixo variando de vermelho ao verde
b*	Cromaticidade no eixo variando do amarelo ao azul
ρ	Densidade
€	Euro
°C	Graus Celsius
K	Graus Kelvin
L*	Luminosidade
µ	Micro
µL	Microlitro
mg	miligrama
meq	miliequivalente
ω	Ômega
ppm	Parte por milhão
P_c	Pressão crítica
kg	Quilograma
T_c	Temperatura crítica
η	Viscosidade cinemática

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO **21**

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA **24**

2.1 A CADEIA PRODUTORA DO PESCADO 24

2.2 CAÇÃO-AZUL (*PRIONACE GLAUCA*) E BEIJUPIRÁ (*RACHYCENTRON CANADUM*) 27

2.3 COMPOSTOS COM ATIVIDADE BIOLÓGICA PRESENTES NO ÓLEO DE FÍGADO DE CAÇÃO 28

2.3.1 Esqualeno *29*

2.3.2 Vitamina A *31*

2.3.3 Ácidos Graxos Poli-insaturados *32*

2.4 A EXTRAÇÃO E MICROENCAPSULAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO 34

2.4.1 Extração de Óleos de Pescado com CO_2 supercrítico *34*

2.4.2 A Microencapsulação em Meio Supercrítico - Particle Gas from Saturated Solutions/ Suspensions (PGSS) *38*

2.5 AMIDOS MODIFICADOS COMO AGENTES DE ENCAPSULAÇÃO 43

3 OBJETIVOS **47**

4 MATERIAIS E MÉTODOS **49**

4.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS 49

4.1.1 Obtenção do Fígado de Beijupirá (Rachycentron canadum) *49*

4.1.2 Obtenção do Fígado de Cação-Azul (Prionace glauca) *50*

4.2 EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA DE ÓLEO DE FÍGADO DE BEIJUPIRÁ (*RACHYCENTRON CANADUM*) E CAÇÃO-AZUL (*PRIONACE GLAUCA*) 52

4.2.1 Extração Supercrítica do Óleo de Fígado de Beijupirá *52*

4.2.2 Extração Supercrítica do Óleo do Fígado de Cação-Azul *55*

4.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA DO FÍGADO ANTES E APÓS A EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA 56

4.4 ESTUDO DO ÓLEO DO FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL E BEIJUPIRÁ 57

4.4.1 Caracterização do Óleo de Fígado de Cação-azul (OFCA) e Beijupirá (OFB) *57*

4.4.2 Análise dos compostos ativos presentes nos óleos de pescado *61*

4.5 FORMAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO DO FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL 64

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DO ÓLEO DO FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL 67

4.6.1 Estudos morfológicos via microscopia eletrônica de varredura *67*

4.6.2 Determinação do Tamanho médio e distribuição de tamanho de partícula *67*

4.6.3 Atividade de água *67*

4.6.4 Umidade *68*

4.6.5 Higroscopicidade *68*

4.6.6 Solubilidade em água *68*

4.6.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) *69*
4.6.8 Microscopia confocal *69*
4.6.9 Retenção de Óleo *70*
4.7 ESTUDO DO COMPORTAMENTO DOS POLÍMEROS EM MEIO SUPERCRÍTICO 70
4.7.1 Expansão volumétrica e solubilidade em meio supercrítico *70*
4.7.2 Visualização do ponto de névoa *72*
4.8 ANÁLISE DE ESTABILIDADE DAS MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO DE FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL 73
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS 74
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 76
5.1 ANÁLISES DO FÍGADO E DO ÓLEO DE BEIJUPIRÁ OBTIDO POR SFE 76
5.1.1 Composição do fígado de beijupirá *76*
5.1.2 Rendimento e caracterização do óleo de fígado de beijupirá *77*
5.1.3 Caracterização do óleo de fígado de beijupirá *79*
5.2 ANÁLISES DO FÍGADO E DO ÓLEO DE CAÇÃO-AZUL OBTIDO POR SFE 84
5.2.1 Composição do fígado de cação-azul e rendimento da extração supercrítica do óleo *84*
5.2.2 Caracterização do óleo de fígado de cação-azul *87*
5.2.3 Teores de esqualeno e vitamina A no óleo de fígado de cação-azul *99*
5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO DE FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL OBTIDAS PELA TÉCNICA PGSS 104
5.3.1 Parâmetros morfológicos e dimensionais *104*
5.3.2 FTIR *110*
5.3.3 Umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade e retenção de óleo *112*
5.4 O COMPORTAMENTO DOS POLÍMEROS EM MEIO SUPERCRÍTICO 117
5.5 ESTUDO DA ESTABILIDADE OXIDATIVA E DO TEOR DE ESQUALENO PRESENTE NAS MICROPARTÍCULAS DE ÓLEO DE FÍGADO DE CAÇÃO-AZUL OBTIDAS PELA TÉCNICA PGSS AO LONGO DE 60 DIAS 121
6 CONCLUSÕES 128
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS 129
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 130
9 APÊNDICES E ANEXOS 148
ANEXO A - AUTORIZAÇÃO DE ATIVIDADES COM FINALIDADE CIENTÍFICA EXPEDIDA PELO IBAMA/ IMCBIO. 149
ANEXO B - CROMATOGRAMA DE ÍONS TOTAIS (TIC, EM INGLÊS) REFERENTES ÀS ANÁLISES DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS E DE ESQUALENO EM ÓLEO DE FÍGADO DE BEIJUPIRÁ. 153
APÊNDICE A – VALORES DO ÍNDICE DE ESQUALENO (MG/ 100G DE ÓLEO) PRESENTES NAS MICROPARTÍCULAS PRESENTES EM MICROPARTÍCULAS ACONDICIONADAS EM DIAS DIFERENTES 155
APÊNDICE B – ANÁLISE DE VARIÂNCIA ANOVA DE TODOS OS RESULTADOS TRATADOS ESTATISTICAMENTE. 156
APÊNDICE C - PRODUÇÃO CIENTÍFICA ASSOCIADA A ESTA TESE DE DOUTORADO. 166

I INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os oceanos recobrem 70% da superfície do planeta Terra, uma área duas vezes mais extensa que a superfície da Lua e de Marte juntas, abrigando 95% da biosfera terrestre e a maior parte de sua biodiversidade (PEREZ, 2010). O ambiente marinho constitui uma rica fonte em termos de diversidade biológica com cerca de 300.000 espécies descritas, mas estima-se que este número é uma pequena percentagem do total de espécies ainda a serem descobertas e descritas (POMPONI, 1999).

O interesse das empresas farmacêutica e de química fina pelos produtos de origem marinha é, em grande parte, impulsionado pela diversidade de novas estruturas moleculares com funções e atividades inovadoras e na área de alimentos, a aplicação de novos produtos como pigmentos e corantes naturais, vitaminas, antioxidantes e estabilizadores também tem motivado diversas pesquisas (VAN DER WIELEN; CABATINGAN, 1999). O óleo de fígado de pescados é um produto complexo e reconhecida fonte de vitaminas lipossolúveis, ácidos graxos poli-insaturados e também contém, em grandes concentrações, substâncias como o esqualeno e alquilgliceróis, importantes na fisiologia humana (DÍAZ-ROJAS et al., 2004).

O esqualeno é um isoprenoide cuja principal fonte são os óleos de fígado de peixes marinhos e, em menor concentração, pode ser encontrado em óleo de oliva, óleo de soja, óleo de gérmen de trigo, óleo de palma, dentre outros. O esqualeno possui aplicação diversificada, estando presente em produtos da área cosmética, farmacêutica, alimentícia e química (BRUNNER; SAURE; BUSS, 2009). Neste contexto, não existem dados na literatura sobre a quantidade de esqualeno presente em resíduos de pescados utilizados na alimentação humana, como o fígado de cação-azul e o beijupirá, que podem ser usados como matéria-prima na extração de óleos de peixes e assim, darem a estes resíduos uma nobre aplicação.

Para produtos naturais desta classe, com destacadas funções metabólicas, é válida a incorporação de tecnologias que aumentem seu tempo de utilização, protegendo-o da agressão de agentes externos. Um recurso que tem se destacado nas últimas décadas é a microencapsulação, conceituada por Aguilera e Lillford (2008) como um processo no qual um ingrediente ativo puro ou uma mistura de ingredientes é coberta ou inserida em um material protetor ou em um sistema de materiais.

Dentre os métodos existentes de microencapsulação, os processos que empregam o CO_2 supercrítico têm grande destaque. Diferentes processos com fluidos supercríticos estão sendo desenvolvidos para produzir partículas compostas para vários fins, incluindo a preparação de medicamentos de liberação controlada, com base na incorporação da substância ativa em uma matriz de lenta dissolução, estabilização de moléculas sensíveis na forma sólida e melhoria de biodisponibilidade de compostos pouco solúveis pela incorporação da substância ativa em um excipiente hidrofílico de dissolução rápida (PERRUT; JUNG; LEOEUF, 2005). Embora a encapsulação de óleos de peixes seja bastante pesquisada, não existem trabalhos publicados sobre a microencapsulação desta matriz aplicando a tecnologia supercrítica.

Esta tese de Doutorado investiga a extração de óleo de fígado de duas matrizes de origem marinha, o beijupirá e o cação-azul, utilizando a tecnologia de extração supercrítica, bem como a caracterização físico-química e estudo da presença de compostos de interesse em alimentos. Este documento também abrange o processo de microencapsulação do óleo de cação-azul utilizando a técnica supercrítica PGSS, assim como a caracterização das micropartículas e as análises de estabilidade das micropartículas de óleo de fígado de cação-azul.

II REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

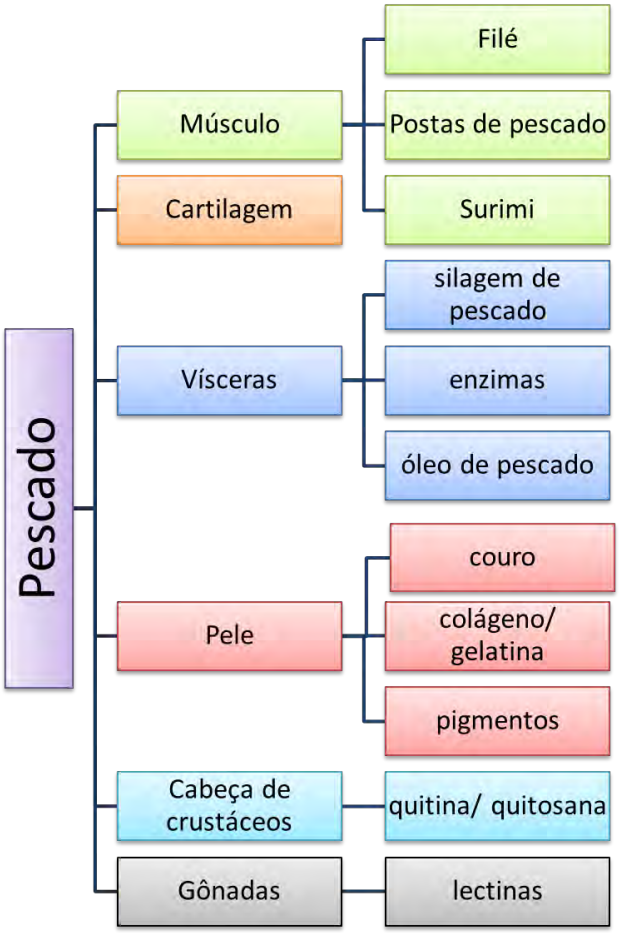
2.1 A Cadeia Produtora do Pescado

A aquicultura é a atividade que se desenvolve mais rapidamente dentre todos os setores da produção animal mundial, atingindo um crescimento anual médio de 8,8% desde 1970 e, ao contrário da criação de animais terrestres, cujo total da produção global é baseada em um número limitado de animais, a aquicultura dispõe de mais de 240 espécies de animais e plantas empregadas diretamente na alimentação humana (CREPALDI et al., 2006). A maior parte da produção brasileira tem sido proveniente da pesca extrativa marinha (42,4%), seguida pelo cultivo de organismos de água doce (31,2%), pela pesca extrativa continental (19,7%) e pela maricultura (6,7%), termo atribuído à aquicultura de águas marinhas. Dentre as regiões brasileiras, a Nordeste se destaca com a maior produção, e em relação a produção por estado, é Santa Catarina o detentor da maior produção nacional atualmente (BRASIL, 2012a).

Do total de captura mundial de pescado, cerca de 72% são utilizados nos mercados de pescado fresco, congelado, enlatado e salgado e os demais 28% seguem para o preparo de alimentação animal. Os processos de comercialização e industrialização para consumo humano rendem de 25 a 70% da matéria-prima como produto comestível (SEIBEL; SOUZA-SOARES, 2003). Dessa forma, os resíduos obtidos na aquicultura, na pesca e na elaboração de produtos à base de pescado podem chegar, em alguns casos, a 70% do peso inicial da matéria-prima a exemplo da tilápia, o peixe mais processado do Brasil (MARTINS et al., 2015). A Figura 1 mostra a diversidade de produtos que podem ser gerados com o beneficiamento do pescado.

São considerados resíduos de pescado as carnes escuras, peixes de baixo tamanho comercial, resíduos obtidos dos processos de filetagem, cabeça, carcaças e vísceras e no Brasil, o aproveitamento de resíduos da industrialização de pescado é baixo, sendo principalmente direcionado para a produção de farinhas de pescado (FELTES et al., 2010). Normalmente, esses resíduos são acumulados em tanques sem receber qualquer tipo de tratamento, ou são descartados nas imediações do local de processamento, contribuindo para a contaminação ambiental (VIDAL et al., 2011).

Figura 1 - Esquema de produtos e sub produtos obtidos a partir do uso integral de pescado



Fonte: Adaptado de: BLANCO, M. et al. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 29-36, 2007.

Um dos principais produtos provenientes dos resíduos de pescado é o óleo extraído do fígado, que em muitas espécies constituem uma boa fonte de vitaminas (A, D, E, K, tiamina, riboflavina e niacina), compõe de 4 a 9% do peso corporal e possuem entre 45 e 47% de gordura (PEREDA, 2005).

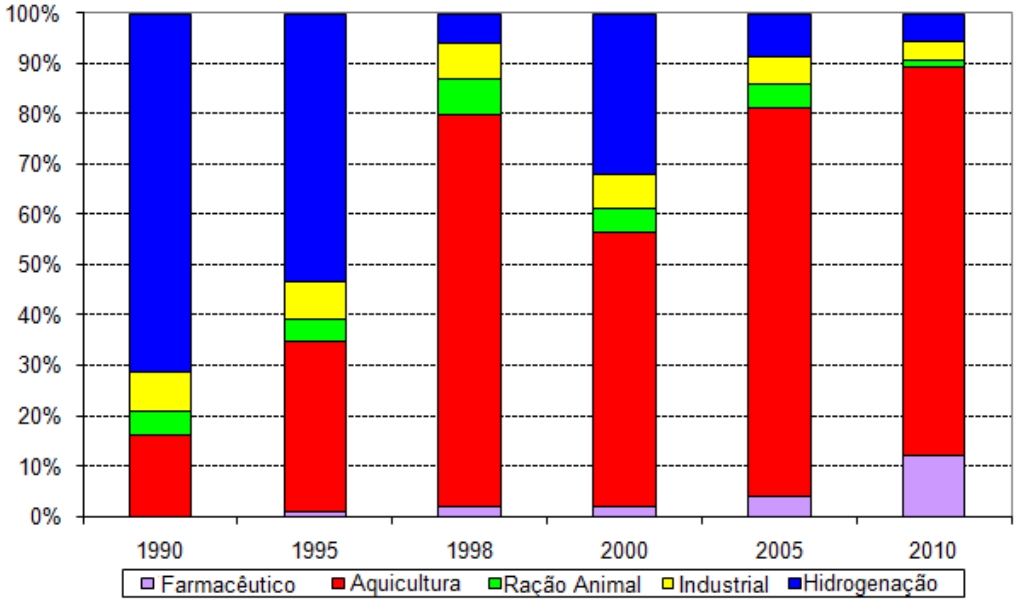
Tradicionalmente, os óleos de origem animal são obtidos por fusão ou aquecimento dos tecidos de 90 a 95 °C, o que permite a separação entre óleo e proteínas coaguladas. Este óleo facilmente separável e considerado de primeira qualidade é aplicado preferencialmente na indústria farmacêutica. O óleo de segunda linha é obtido por meio da prensagem das vísceras, que resulta em um produto de valor vitamínico menor. Ambos os tipos de óleo podem passar pelo processo de refino, com etapas como degomagem, branqueamento ou descoloração, desodorização e fracionamento (GONÇALVES, 2011; PEREDA, 2005).

Este método tradicional de cocção das vísceras apresenta inúmeras desvantagens, tais como o emprego de altas temperaturas de cozimento, que podem levar à oxidação do óleo

de peixe, além de ser considerada uma técnica de extração de eficiência moderada, dentre outros. Considerando a importância do óleo de peixe enriquecido com ômega-3 e ômega-6, no momento diversas pesquisas investigam técnicas alternativas de separação do óleo a partir da matriz (KUVENDZIEV et al., 2014).

O óleo de pescado pode ser utilizado para diversos fins, desde na produção de sabões e emulsificantes, tintas, vernizes e acabamento de couros, combustível em caldeiras e até mesmo biodiesel, como também pode ser hidrogenado e direcionado para a produção de margarina e produtos de panificação (GARCÍA-MORENO et al., 2014; OGAWA; MAIA, 1999). A principal aplicação para o óleo de peixe tem sido a aquicultura, mas a necessidade de óleos de peixe de alta qualidade está aumentando, devido à crescente compreensão de suas propriedades benéficas à saúde. Assim, a utilização deste produto vem cada vez mais sendo voltada para a aplicação farmacêutica, em detrimento da aplicação como gordura hidrogenada (FERRARO et al., 2013). A Figura 2 apresenta a evolução quanto à aplicação de óleos de peixes marinhos.

Figura 2 - Evolução da aplicação de óleo de peixe



Fonte: BIMBO, A. P. **Edible Oil Processing: The production and processing of marine oils**. AOCS Lipid Library: Urbana. Disponível em: <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/marine/index.htm>. Acessado em Julho de 2013.

2.2 Cação-azul (*Prionace glauca*) e Beijupirá (*Rachycentron canadum*)

O cação-azul pertence à classe Chondrichthyes, à subclasse Elasmobranchii e família Carcharhinidae, de aproximadamente 465 espécies com características muito variadas. Há diferenças consideráveis entre os cações e outros peixes, como seu esqueleto cartilaginoso e a manutenção do seu equilíbrio osmótico na presença de ureia e óxido de trimetilamina em seu sangue e tecidos. Eles não possuem o trato urinário usual, então a ureia presente no sangue, subproduto não-tóxico do metabolismo, é excretada pela pele e após a captura pode ser eliminada pela sangria (MACEDO, 2010; PACHECO; BARRERA-ARELLANO, 1994; VÖGLER et al., 2012). O óleo do seu fígado contém esqualeno, em quantidade que atinge de 10 a 20% em massa, também grandes concentrações de triacilgliceróis e vitamina A (BARTFAI et al., 2000).

O cação-azul (*Prionace glauca*) pode ser encontrado em águas tropicais e temperadas em todo o mundo e provavelmente é o mais abundante de todos os tubarões. Sua distribuição nas faixas do Oceano Atlântico se dá a partir da América do Norte até a Argentina à oeste e da Noruega à África do Sul ao leste. Encontra-se na superfície a pelo menos 1.000 m da plataforma continental, porém também pode ser encontrado em ambientes batipelágicos (zonas de elevadas profundidades a partir da superfície do oceano) (BORNATOWSKI; SCHWINGEL, 2008; TAVARES; ORTIZ; ROCHA, 2012). É principalmente capturado como pesca secundária em rede de espinhéis[1] e redes de emalhar[2] em pescarias dirigidas para atum e espadarte (VÁZQUEZ et al., 2016).

As capturas desta espécie estão em expansão, sendo uma das espécies mais pescadas na Europa em 2013, somando mais de 8.600 toneladas comercializadas como peixe fresco e congelado, os quais são comumente processados na forma de lombos, filés ou postas (VÁZQUEZ et al., 2016). Este alto índice de capturas a nível mundial ainda não é alarmante, pois o cação-azul não se encontra ameaçado de extinção (IUCN, 2016; MONTEALEGRE-QUIJANO et al., 2014). Em muitos países, a carne do cação-azul é consumida fresca,

---

[1] Rede de espinhéis: Constitui um aparelho de pesca simples, no qual a linha principal se mantém horizontalmente e nesta são fixadas, em distância adequada, inúmeras linhas secundárias, que por sua vez são sinalizadas por bandeirolas que flutuam na superfície da água (FARIAS, 1998).

[2] Rede de emalhar: É uma rede de pesca de panagem retangular. A rede é estendida entre duas linhas, de modo que a linha superior contém flutuadores e a inferior, um lastro, mantendo-se na posição vertical dentro da água. Por este mecanismo, os peixes ficam emalhados pelo opérculo e sem possibilidade de escapar (FARIAS, 1998).

defumada ou salgada, suas peles são usadas para o beneficiamento de produtos de couro, as barbatanas são comercializadas para a sopa de barbatana de tubarão e são também produzidos óleo de fígado e farinha de peixe (ABREU et al., 2011).

O beijupirá, *Rachycentron canadum*, é um peixe marinho nativo do Brasil encontrado em mares tropicais e subtropicais em todo o mundo e apresentam uma elevada taxa de crescimento com baixo índice de incidência de doenças, produzindo uma carne de alta qualidade (CHUANG et al., 2014, SUN et al., 2014). Silva-Junior et al. (2011) destaca outros atributos desta cultura, como facilidade de reprodução em cativeiro, tolerância das larvas à salinidade e aceitação de dietas extrusadas. Com estas vantagens, esta espécie tem sido muito aplicada na aquicultura em países da região da Ásia e Pacífico, gerando um produto de grande valor econômico (GENG et al., 2011).

A produção comercial de beijupirá teve início partir dos anos 90 em Taiwan e resultados satisfatórios como a sua elevada taxa de crescimento, ao redor de 6 kg ou mais em um ano, despertou o interesse na sua produção em vários países como os Estados Unidos, México e Brasil (SAMPAIO; TESSER; WASIELESKY JÚNIOR, 2010). No Brasil, a produção deste exemplar em cativeiro se iniciou em 2006 e ainda está em expansão com o incentivo do Ministério da Pesca e Aquicultura, além de iniciativa privada (CAVALLI; DOMINGUES; HAMILTON, 2011). Dentro desta atividade, a maioria dos estudos abordam técnicas de manejo e influência da alimentação modificada na eficiência de crescimento do beijupirá (GENG et al., 2011; WANG et al., 2016).

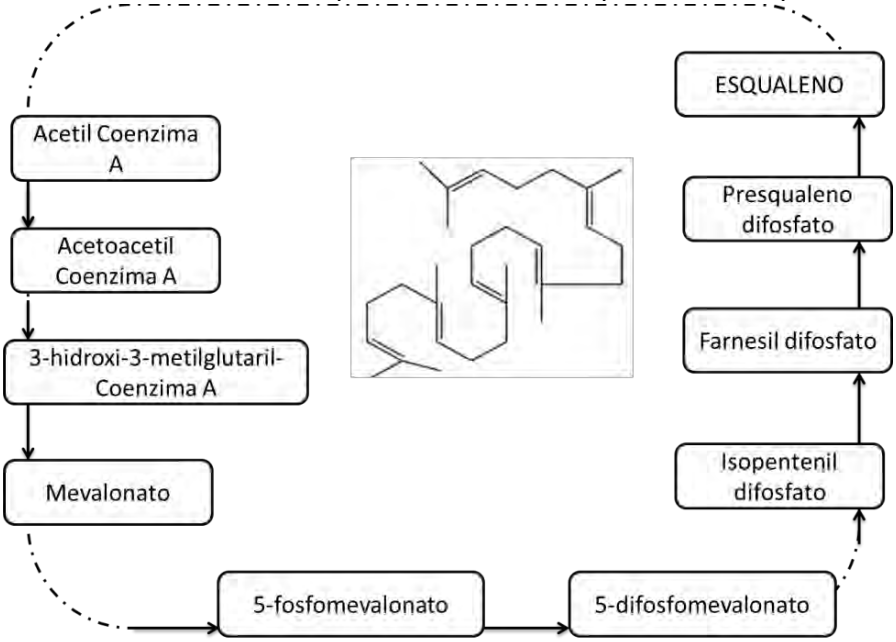
2.3 Compostos com Atividade Biológica Presentes no Óleo de Fígado de Cação

O óleo de fígado de cação é considerado útil no tratamento de doenças resultantes de resposta imunológica inadequada, no tratamento adjuvante de vários tipos de cânceres e, além disso, a ingestão de óleo de fígado de cação normaliza a atividade de células de defesa e a resposta de neutrófilos em relação a bactérias, aumenta a capacidade antioxidante total do soro, dentre outros efeitos (HAJIMORADI et al., 2009). Estas e outras aplicações estão relacionadas à sua composição, em grande parte formada por ácidos graxos poli-insaturados e pela presença de moléculas como esqualeno e alquilgliceróis. Algumas destas moléculas estão apresentadas a seguir.

2.3.1 Esqualeno

O esqualeno, um triterpeno poli-insaturado que contém seis unidades de isopreno, é um intermediário chave na biossíntese do colesterol (GUIL-GUERRERO et al., 2000) ou ergosterol, em plantas e fungos. A Figura 3 apresenta a via metabólica de síntese do esqualeno, cuja principal fonte é o fígado de tubarão da família Squalidae, do qual vem o nome, e outros peixes (ALISSON, 1999).

Figura 3 - Via de biossíntese do esqualeno e estrutura química do esqualeno ao centro



Fonte: Adaptado de: REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1412–1426, 2009.

Além das fontes animais, encontra-se esqualeno em matrizes vegetais como o azeite de oliva, óleo de palma, óleo do gérmen de trigo, óleo de amaranto e óleo de arroz (LIPPI; TARGHER; FRANCHINI, 2010). No azeite de oliva, ele constitui mais de 90% da fração hidrocarbônica, variando de 200 a 7.500 $mg.Kg^{-1}$ e o esqualeno também pode ser encontrado nos tecidos humanos, estando presente na pele e no tecido adiposo (AGUILERA et al., 2005).

Historicamente, o esqualeno tem sido usado na formulação de vários cosméticos, como emoliente, antioxidante e hidratante (CÁRDENO et al., 2015; KATABAMI et al., 2015). Contudo, mais recentemente, o esqualeno também tem sido usado como um adjuvante imunológico em diversas vacinas (atua em conjunto com a vacina estimulando o sistema

imune) para males como a malária, o vírus da imunodeficiência humana, vírus do herpes, citomegalovírus, papilomavírus humano e gripe pandêmica (LIPPI; TARGHER; FRANCHINI, 2010).

Pesquisas recentes têm aproveitado o potencial do esqualeno, um precursor natural de esteroides, para formar um conjugado fármaco-lipídio por meio de um acoplamento covalente a lipídios biocompatíveis. Neste sistema nanométrico, o esqualeno protege os fármacos de fatores ambientais prejudiciais e, em alguns casos, também melhora o seu perfil farmacocinético, diminuindo a toxicidade dos fármacos associados com um aumento do seu índice terapêutico (BORRELLI et al., 2014).

Quanto à atividade antitumoral, existe uma forte correlação entre a ausência de casos de câncer em tubarões da família Squalidae e os teores de esqualeno encontrados no óleo de fígado (que em alguns casos pode chegar a 40%). Também se atribui ao esqualeno presente no azeite de oliva os baixos índices de câncer em humanos na região do Mediterrâneo, onde o uso deste produto na alimentação é recorrente (REDDY; COUVREUR, 2009). Em experimentos com roedores alimentados com rações preparadas com 1% de esqualeno, foi possível verificar a inibição da formação de lesões indicativas de tumor no intestino (RAO; NEWMARK; REDDY, 1998), bem como em pulmão e pele (O'SULLIVAN; WOODS; O'BRIEN, 2002).

O esqualeno tem sido reportado por possuir propriedades antioxidante e de estabilização da membrana celular, com efeitos comparáveis a vitamina E (FARVIN et al., 2007). A sua atividade antioxidante está associada à capacidade de doação de elétrons (proveniente das insaturações das cadeias de isopreno) e somado a isso, pela natureza altamente lipofílica, o esqualeno administrado exogenamente consegue permear através das membranas celulares e alcançar a parte interna da célula, estabilizando o ambiente celular (BHILWADE et al., 2010). Também tem sido relatado que o esqualeno contribui para a eliminação de substâncias químicas do organismo, ao mesmo tempo em que reduz a toxicidade dos compostos formados a partir da metabolização de fármacos e outros compostos químicos (AGUILERA et al., 2005).

O grande número de insaturações presentes na molécula de esqualeno, responsável pela sua bioatividade, também o torna vulnerável ao ataque oxidativo de espécies como radicais livres, peróxidos, aldeídos e cetonas, reduzindo a disponibilidade biológica e seu valor nutritivo (WANG et al., 2011). A importância do esqualeno nas indústrias cosmética e

farmacêutica motivaram o desenvolvimento de novas tecnologias para purificar esqualeno de diferentes fontes e para isso diversas metodologias têm sido descritas, como a destilação molecular, cromatografia contracorrente de alta velocidade e extração com fluido supercrítico (VÁZQUEZ et al., 2007).

2.3.2 Vitamina A

A vitamina A é um termo genérico que se refere a um grupo de hidrocarbonetos insaturados, incluindo o retinol e seus derivados, tais como retinal, ácido retinóico e carotenoides pró-vitamina A, abrangendo α-caroteno, β-caroteno, dentre outros (WU et al., 2015). A pré-vitamina A é consumida na forma de ésteres de retinil, que são hidrolisados endogenamente para formar o retinol. A vitamina A também pode ser convertida a partir dos seus precursores dietéticos β-caroteno, α-caroteno e β-criptoxantina, encontrados principalmente em vegetais de folhas verdes e de cor amarela (WEBER; GRUNE, 2012).

Uma fonte de vitamina A é o fígado de espécies de peixes cartilagíneos (tubarões e raias) e o seu conteúdo no óleo de fígado de tubarão tem sido relatado na faixa de 160.000 a 360.000 U.I./ g de óleo (SUNARYA; HOLE; TAYLOR, 1996). No Brasil, o óleo do fígado de cação tem sido usado desde meados da 2° Guerra mundial, quando a antiga fonte, o óleo de bacalhau, tornou-se cada vez mais escassa (CARDOSO, 1943).

A vitamina A desempenha um papel importante na saúde. No desenvolvimento fetal, está associada à regulação da expressão genética, diferenciação, proliferação e migração de células no embrião e no feto (MEDEIROS et al., 2015). Os retinoides favorecem o crescimento, diferenciação e morte celular e a desregulação das suas vias de sinalização está ligada a tumorigênese. Por esta razão, eles têm sido cada vez mais apontados como potenciais agentes terapêuticos para várias doenças, incluindo o câncer (MUZIO et al., 2016).

A deficiência de vitamina A (VAD, em inglês) é um dos maiores problemas de desnutrição do mundo e no Brasil, a prevalência da ausência de micronutrientes é em sua maioria subclínica, assintomática (CHAVES et al., 2015). Segundo a FAO, estima-se que mais de 250 milhões de crianças estejam sob o risco de ter deficiência de vitamina A (FAO, 2014). Baixos níveis séricos de vitamina A estão associados a maior mortalidade e morbidade, retardo de crescimento, aumento da suscetibilidade a infecções, xeroftalmia e cegueira

noturna, sobretudo em crianças menores de 5 anos (GRILO et al., 2015; PEREIRA et al., 2008).

Altas concentrações de vitamina A no organismo também tem efeitos nocivos. A pré-vitamina A adquire um caráter pró-oxidante em doses elevadas e ao desequilibrar a capacidade antioxidante do organismo, desencadeia um mecanismo pró-carcinogênico que facilita a indução de alguns tipos de cânceres (MEDEIROS et al., 2015; SAUVANT et al., 2012).

No Brasil, o uso do óleo do fígado de cação é amparado pela Portaria n° 19, de 15 de março de 1995 (ANVISA), que o considera um complemento nutricional alimentício, no qual deve conter por grama, no mínimo, 3.000 U.I. de vitamina A e 85 U.I. de vitamina D e aborda também alguns parâmetros de qualidade para o óleo produzido (BRASIL, 1995).

2.3.3 Ácidos Graxos Poli-insaturados

Os ácidos graxos compõe um amplo grupo de moléculas que, do ponto de vista estrutural, podem ser classificadas quanto ao número de ligações duplas como saturadas (sem ligações duplas), mono- (uma insaturação) ou poli-insaturadas (duas ou mais insaturações). Os ácidos graxos poli-insaturados (PUFA em inglês) são ainda classificados de acordo com a posição da primeira ligação dupla a partir da porção n-terminal da molécula, tal como o ω-3 (ou ômega-3) ou ω-6 (SHAPIRO, 2003). A Tabela 1 apresenta os principais tipos de cada grupo de ácidos graxos.

Os ácidos graxos essenciais, ácido linoleico e α-linolênico, não podem ser sintetizados por vertebrados e a alimentação deve suprir as necessidades para a manutenção de funções que, em humanos, são consideradas essenciais, tais como a manutenção da barreira de água da pele, função cerebral ótica, regulação do sistema imune e reprodução (BABIREKERE-IRISO et al., 2016). Além das funções citadas, ácidos graxos importantes como o ácido araquidônico são sintetizados por seres humanos a partir de ácido linoleico e outros ácidos graxos como icosapentanoico (EPA), docosapentaenoico (DPA) e docosahexaenoico (DHA), a partir do ácido α-linolênico (SOLANA; RIZZA; BERTUCCO, 2014).

Tabela 1 - Principais ácidos graxos e sua respectiva classificação

Ácidos graxos saturados		Ácidos graxos monoinsaturados		Ácidos graxos poli-insaturados	
Nome comum	C-0[1]:0[2]	Nome comum	C-0[1]:0[2]	Nome comum	C-0[1]:0[2]
Láurico	C-12:0	Palmitoleico (ω -7)	C-16:1	Linoleico (ω -6)	C-18:2
Mirístico	C-14:0	Oleico (ω -9)	C-18:1	Linolênico (ω -3)	C-18:3
Palmítico	C-16:0	Erúcico (ω -9)	C-22:1	Araquidônico (ω -6)	C-20:4
Esteárico	C-18:0			EPA (ω -3)	C-20:5
Araquídico	C-20:0			DPA (ω -3)	C-22:5
Behênico	C-22:0			DHA (ω -3)	C-22:6
Lignocérico	C-24:0				

[1] = número de carbonos da molécula. [2] = número de insaturações.
Fonte: FENNEMA, O. R. ed. **Food Chemistry**. Marcel Dekker: New York, 1996. 1262p.
O'BRIEN, R. D. **Fats and oils: formulating and processing for applications.** CRC Press: Boca Raton, 2004. 574 p.

Os ácidos graxos poli-insaturados estão associados a inúmeros efeitos benéficos ao organismo e o óleo de peixe é uma reconhecida fonte destes compostos (DASILVA et al., 2015; GIRI et al., 2016; HUANG et al., 2015). De acordo com La Rovere e Christensen (2015), existem dois tipos de PUFA, os PUFA ω-3 e ω-6. Os PUFA ω-6 são principalmente encontrados em óleos vegetais, sendo o ácido linoleico o mais recorrente e em relação aos PUFA ω-3, estes são sintetizados em grande quantidade por fitoplânctons e se acumulam ao longo da cadeia alimentar. Logo, os peixes são a principal fonte de PUFA ω-3.

Para explicar a relação dos PUFA ω-3 com os múltiplos efeitos ao organismo, são apontados três mecanismos de ação dessa classe de substâncias: *(i)* incorporação em membranas celulares, *(ii)* interação direta com canais iônicos e outros componentes celulares e, *(iii)* ação como precursores de mediadores lipídicos ativos (BONAFINI et al., 2015).

Os efeitos benéficos à saúde dos PUFA ω-3 foram descritos pela primeira vez ao se relatar sobre os esquimós da Groenlândia, que possuíam uma dieta rica em frutos do mar e foram observadas baixas taxas de problemas cardiovasculares, asma, diabetes mellitus tipo 1 e esclerose múltipla (SIMOPOULOS, 2008). Os PUFA ω-3 estão ligados a inúmeras funções favoráveis ao organismo, como compor os lipídios da retina, do esperma e cérebro, contribuir para a maturação da função visual e cortical em prematuros, estimular o crescimento e exercer um efeito protetor contra doenças cardiovasculares, atenuar os sintomas inflamatórios em casos de doenças como artrite reumatoide e colite ulcerativa (SETHOM et al., 2010; TAPIERO et al., 2002).

Sahena et al. (2010b) estende os efeitos dos PUFA ω-3 à prevenção de doenças como hipertensão, desordens autoimunes, alergias e câncer, além do abaixamento do índice de triacilgliceróis no sangue. Sahena et al. (2010a) também aponta benefícios relacionados a doenças mentais, incluindo depressão, transtorno do déficit de atenção com hiperatividade e demência.

Vários métodos são usados para concentrar PUFA ω-3, dentre eles destacam-se a cristalização, a distribuição contracorrente, destilação fracional ou molecular, adsorção cromatográfica, destilação a vácuo e complexação com ureia seguida de destilação a vácuo. O uso de altas temperaturas ou solventes tóxicos coloca a utilização de fluido em estado supercrítico em grande vantagem em relação às técnicas tradicionais, pela ausência desses inconvenientes de processo (MISHRA; TEMELLI; OORAIKUL, 1993).

2.4 A Extração e Microencapsulação com Fluido Supercrítico

2.4.1 Extração de Óleos de Pescado com CO_2 supercrítico

Óleos e gorduras são misturas complexas de componentes lipídicos, pois além dos majoritários triacilgliceróis, podem estar presentes neste sistema mono e diacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios, glicolipídios, esteróis e outros componentes solúveis em gordura, incluindo tocoferois, tocotrienois, carotenoides e esqualeno, todos com diferentes propriedades químicas, físicas e fisiológicas (JAYASINGHE; HAWBOLDT, 2012). As gorduras e os óleos, bem como os seus vários componentes lipídicos, são utilizados extensivamente não só na indústria de alimentos, mas também na indústria cosmética, farmacêutica, oleoquímica e outras (ADEOTI; HAWBOLDT, 2014; TEMELLI, 2009).

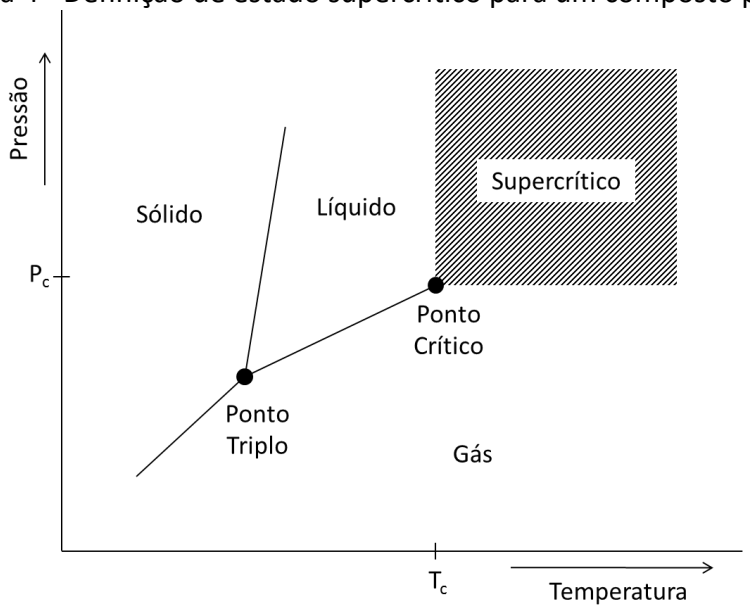
Vários métodos têm sido relatados para a extração de óleos de peixe, tais como extração com hexano, destilação a vácuo, complexação com ureia ou cristalização convencional. Esses métodos têm como desvantagens empregar altas temperaturas ou solventes tóxicos, que resultam em decomposição ou degradação dos compostos termicamente lábeis e riscos à saúde, respectivamente (SAHENA et al., 2010a).

Neste contexto, a extração com fluido supercrítico (SFE) tem se apresentado como uma alternativa promissora de obtenção de óleos de pescado. Esta técnica se baseia nas

propriedades de solvatação do fluido supercrítico, que pode ser obtido pelo emprego de pressão e temperatura acima do ponto crítico de um composto, mistura ou elemento. A SFE está ligada ao ajuste de alguns fatores inerentes ao fluido supercrítico, como temperatura e pressão e de alguns recursos extrínsecos como as características da amostra, a interação com os compostos-alvo e outros fatores ambientais (SHARIF et al., 2014; SILVA; ROCHA-SANTOS; DUARTE, 2016).

No estado supercrítico (Figura 4), a densidade se assemelha a de líquidos, enquanto que a viscosidade é próxima a de gases normais e a difusividade é cerca de duas ordens de grandeza mais elevada do que nos líquidos típicos (BRUNNER, 2005).

Figura 4 - Definição de estado supercrítico para um composto puro



Fonte: Adaptado de: BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21-33, 2005.

Na extração com fluido supercrítico, o potencial de transferência de massa e calor é determinado pela diferença do estado de equilíbrio. O estado de equilíbrio fornece informações sobre: (*i*) a capacidade de um solvente supercrítico, definido como a quantidade de uma substância dissolvida pelo fluido em equilíbrio termodinâmico; (*ii*) a quantidade de solvente que se dissolve na fase líquida ou sólida e a composição de equilíbrio de cada fase; (*iii*) a seletividade de um solvente, que é a capacidade de um solvente para dissolver seletivamente um ou mais compostos (*iv*) a dependência destas propriedades

solventes em condições de estado (p, T) e, (*v*) a medida da área de duas fases, como condição limitante para um processo de duas fases (BRUNNER, 2005).

Inúmeras são as vantagens em se utilizar o dióxido de carbono (CO_2) como um solvente supercrítico. Ele é um gás em condições atmosféricas, sendo facilmente separado dos produtos extraídos, tornando o produto final livre de solventes. É considerado um "solvente verde", de baixa toxicidade, não inflamável e relativamente barato (BUCIO et al., 2016; SAHENA et al., 2010a). Knez et al. (2014) acrescenta que o CO_2 supercrítico (CO_2SC) é não carcinogênico, não mutagênico e termodinamicamente estável e o fato de se ajustar a propriedades termofísicas (como difusividade, viscosidade, densidade e constante dielétrica) pela simples variação da pressão e temperatura operacionais é uma grande vantagem desse solvente. A Tabela 2 apresenta valores de pontos críticos de algumas substâncias, evidenciando as condições amenas de operação utilizando o dióxido de carbono.

Tabela 2 - Pontos críticos de alguns fluidos supercríticos

Fluido	T_c (°C)	P_c (bar)	Observações
Dióxido de carbono	31,2	73,8	-
Amônia	132,4	112,9	Tóxico
Água	374,1	221	Alta T_c, corrosiva
Etano	32,5	49,1	Inflamável
Propano	96,8	42,6	Inflamável
Ciclohexano	279,9	40,3	Alta T_c
Metanol	240,0	79,5	Alta T_c
Etanol	243,1	63,9	Alta T_c
Isopropanol	235,6	53,7	Alta T_c
Acetona	235,0	47,6	Alta T_c

Fonte: SANLI, D.; BOZBAG, S. E.; ERKEY, C. Synthesis of nanostructured materials using supercritical CO_2: Part I. Physical transformations. **J Mater Sci**, v. 47, p. 2995–3025, 2012.

Os primeiros estudos de aplicação da técnica de extração com CO_2 supercrítico (CO_2SC) em óleos de pescados, iniciados na década de 50, obtiveram dados de equilíbrio de fases de compostos constituintes de óleos de peixes em meio supercrítico, utilizando dióxido de carbono e outros solventes orgânicos (STABY; MOLLERUP, 1993). As pesquisas posteriores abordaram a obtenção de frações purificadas de substâncias como etil ésteres de ácido eicosapentaenoico e ácido docosahexadienoico (NILSSON et al., 1988), ésteres ácidos de óleos de pescados (HIGASHIDATE; YAMAUCHI; SAITO, 1990) e ainda contaminantes (KRUKONIS, 1989), dentre outras. Nos recentes estudos, a extração supercrítica tem sido

aplicada a pesquisa com novas espécies de peixes ou subprodutos (RUBIO-RODRÍGUEZ et al., 2008), ou ainda combinada com processos como destilação molecular (TENLLADO; REGLERO; TORRES, 2011), buscando otimizar o fracionamento de compostos com atividade biológica reconhecida como alquilgliceróis e esqualeno.

A extração com CO_2SC é considerada um processo de eco-separação contemporâneo e preciso que produz um impacto mínimo ao meio ambiente. Além disso, esse procedimento de extração é conduzido a temperaturas de operação relativamente baixas e se mostra mais seletivo para ácidos graxos poli-insaturados em comparação com técnicas convencionais. Para este tipo de produto, essa técnica tem a vantagem de promover uma redução da oxidação de óleo de peixe (HERRERO et al., 2010; KUVENDZIEV et al., 2014).

Indústrias de beneficiamento de pescado produzem grandes quantidades de resíduos, constituídos principalmente por cabeças de peixe, pele e caudas, a partir do qual óleos contendo ácidos graxos ω-3 poderiam ser extraídos (LOPES et al., 2012). A Tabela 3 sumariza alguns trabalhos de aplicação da tecnologia supercrítica na obtenção de óleos de subprodutos de pescados.

Tabela 3 - Algumas pesquisas de extração de óleo de pescados utilizando CO_2 supercrítico (Continua)

Autor, ano	Matriz	Condições de extração	Condição de maior rendimento
Kuvendziev, 2014	Vísceras de carpa	P= 200 - 400 bar T= 40 - 60 °C V= 3,23 - 5,89 g/min t= 180 min	400 bar/ 60 °C – 51,52 g óleo/100 g matriz
Amiguet, 2012	Subprodutos do camarão do Norte	P= 150, 350 bar T= 40, 50 °C V= 3-5 L/min t=90 min	10,89% de óleo
Létisse, 2006	Cabeça de sardinha	P= 100 - 350 bar T= 40 - 80°C V= 0,5 - 3,5 L/min t=9 - 55 min	350 bar/ 60 °C/ 15 min - 10,91%
Lisichkov, 2014	Vísceras de carpa	P= 200 - 400 bar T= 40 - 60°C V= 3,23 - 5,89 g/min t=30 - 180 min	400 bar/ 60 °C/ 180 min – 74,845%

Tabela 3 - Algumas pesquisas de extração de óleo de pescados utilizando CO_2 supercrítico (Conclusão)

Rubio-Rodríguez, 2008	Subprodutos de merluza	P= 100 - 577 bar T= 40°C V= 83 – 332 g/min t= 180 min	250 bar/ 40 °C/ 180min – 96,4%
Sahena, 2010a	Pele de cavalas indianas	P= 200- 350 bar T= 45 - 75°C V= 2 mL/min t= 480 min	350bar/ 75°C -24,7%
Gedi, 2015	Músculos de sardinhas	P= 200- 400 bar T= 40 - 70°C V= 3 mL/min t= 80 min	300 bar/ 55 °C – 8,16%
Sarker, 2012	Víscera de bagre africano	P= 100- 400 bar T= 35 - 80°C V=1 – 3 mL/min t= 60 - 240 min	400 bar/ 57,5 °C/ 2 mL/min/ 150 min – 67%
Nguyen, 2015	Lagosta australiana	P= 250- 350 bar T= 50°C V= 7,23 g/min t= 240 min	350 bar/ 50 °C – 22,84%
Sahena, 2013	Cabeça de atum de cauda longa	P= 132- 468 bar T= 38,2 – 71,8°C V= 1 – 3 mL/min t= 240 min	400 bar/ 65 °C/ 3 mL/min – 35,6%

P= Pressão, T= temperatura, V= vazão, t= tempo de extração.
Fonte: Baseado em diferentes autores.

Além de ser aplicado como um solvente de baixa toxicidade em extrações, o dióxido de carbono supercrítico ainda tem sido usado como fase móvel para determinar fármacos em cromatografia gás-líquido e ainda cada vez mais estudos tem sugerido que o CO_2SC tem um uso potencial na micronização de fármacos, especialmente para aqueles que são pouco solúveis em água (CHIOU; CHENG; WANG, 2006).

2.4.2 A Microencapsulação em Meio Supercrítico - Particle Gas from Saturated Solutions/ Suspensions (PGSS)

A microencapsulação é descrita como um processo de incorporação de partículas micronizadas de materiais sólidos, líquidos ou mesmo gasosos em um revestimento inerte, que por sua vez, os isola e protege do ambiente externo sendo os seus produtos obtidos por

este processo chamados de micropartículas, microcápsulas ou microesferas, que se diferenciam na morfologia e estrutura interna (JYOTHI et al., 2010). As técnicas de microencapsulação são muito variadas e podem ser classificadas em processos físicos, como *spray drying*, *spray cooling*, *spray chilling*, extrusão centrifugal, *freeze drying*, jato anular, separação por suspensão rotacional e recobrimento por suspensão no ar; e ainda em processos químicos como coacervação, co-cristalização, aprisionamento em lipossomas, polimerização interfacial, inclusão molecular, dentre outros (COCERO et al., 2009).

Os processos de microencapsulação podem ser aplicados em diferentes áreas industriais, como na encapsulação de ingredientes alimentícios, no controle de liberação de pesticidas em agroquímica, na liberação de drogas específicas, em cosméticos e eletrônicos, na biomedicina e no processamento de materiais especiais, dentre outras (GARAY; POCHEVILLE; MADARIAGA, 2010).

Zuidam e Nedović (2009) apontam inúmeras vantagens para o uso de ingredientes microencapsulados em produtos alimentícios, tais como uma melhor aplicação do agente ativo, imobilidade do agente ativo no sistema alimentício, melhora da estabilidade do produto final e durante o processamento, atenuação do *off-flavor*, criação de efeitos de cor e textura, dentre outros. No caso de óleos de origem marinha, objeto de estudo desse trabalho, a encapsulação é uma técnica que contribui para a superação de determinadas propriedades intrínsecas do produto, como possuir um sabor forte e odor indesejável e ser altamente propenso à oxidação lipídica (DÍAZ-ROJAS et al., 2004; GARCÍA et al., 2006).

As técnicas de preparação de micropartículas convencionais têm mostrado resultados promissores na preparação de sistemas de liberação para muitas substâncias bioativas. No entanto, apresentam uma série de desvantagens e limitações, a exemplo do uso extensivo de solventes orgânicos na dissolução de materiais, emprego de altas temperaturas que podem prejudicar o desempenho de proteínas, ácidos graxos insaturados e outras substâncias termossensíveis (SANTOS et al., 2002). Além disso, alguns métodos exigem uma etapa de secagem após o processo de formação das partículas, para diminuir a umidade ou mesmo a presença de solventes residuais (CHEN et al., 2011).

Os métodos de microencapsulação supercrítica, desenvolvidos nos últimos anos, têm sido uma boa alternativa aos métodos tradicionais já consolidados, por superar restrições de outros processos de obtenção de micropartículas (TEMELLI, 2009). Devido às suas características de pressão e temperatura críticas moderadas, pode-se processar partículas

em condições mais amenas, adequadas para substâncias termolábeis. O dióxido de carbono, principal fluido utilizado no processo, possui inúmeros atributos que torna esta técnica competitiva em relação às convencionais, como ser ambientalmente adequado, de baixa toxicidade, não inflamável, barato e reciclável (BAHRAMI; RANJBARIAN, 2007). Além disso, como o CO_2 é separado das micropartículas ao final do processo apenas pela despressurização, a microencapsulação com CO_2SC pode ser considerada um processo livre de solventes (COCERO et al., 2009).

A Tabela 4 traz informações quanto à diversidade de métodos de microencapsulação com CO_2 supercrítico agrupados por diferentes atribuições do CO_2SC.

Tabela 4 - Principais métodos de formação de partículas utilizando CO_2 supercrítico

Função do CO_2SC	Método
Solvente	RESS - Rápida expansão de soluções supercríticas RESOLV - Rápida expansão da solução supercrítica em solvente líquido
Anti-solvente	GAS - Gás anti-solvente PCA – Partículas por anti-solvente comprimido SAS - Supercrítico anti-solvente ASES – Sistema de extração de solvente em aerossol ARISE- Injeção rápida atomizada para extração de solvente SEDS - Solução de dispersão melhorada por fluido supercrítico
Solução de gás saturado ou co-solvente	PGSS - Partículas de soluções ou suspensões em gás saturado DELOS - Despressurização de uma solução orgânica em líquido expandido GAMA - Fusão de Atomização de Gás Assistida CPSCP - Processo contínuo de revestimento de pó em pulverização
Composto de nebulização	CAN-BN - Nebulização de dióxido de carbono assistida com secador de bolhas SAA - Atomização assistida por fluidos supercríticos

Fonte: GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology**, v. 197, p. 211–217, 2010.
PASQUALI, I.; BETTINI, R. Are pharmaceutics really going supercritical? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 176–187, 2008.
TABERNERO, A.; DEL VALLE, A. M. M.; GALÁN, M. A. Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modeling. **Chemical Engineering and Processing**, v. 60, p. 9 - 25, 2012.

Durante o processo de microencapsulação em meio supercrítico, no qual o polímero permanece sob determinado tempo na presença de CO_2, o CO_2SC induz ao inchamento do polímero, provocando uma melhora na taxa de difusão deste e facilitando a entrada de material na partícula e após a impregnação, o CO_2 é despressurizado e as partículas

retornam ao seu tamanho original, aprisionando o ativo microencapsulado. Dessa forma, esta técnica separa as etapas de formação de partículas e microencapsulação, proporcionando um melhor controle do tamanho de partícula e da polidispersividade (LIU; FINN; YATES, 2005; WEIDNER, 2009).

Uma técnica que pode ser aplicada na encapsulação por meio de CO_2 supercrítico refere-se à formação de partículas por soluções ou suspensões em gás saturado (PGSS, Particles from gas-saturated solutions/ suspensions). Este processo, relatado pela primeira vez na publicação de Weidner, Steiner e Knez (1996)[3], segundo Tandya et al. (2007), consiste na dissolução de um fluido supercrítico em uma solução ou dispersão do substrato em um solvente líquido ou uma mistura liquefeita, seguida por uma rápida despressurização através de um bocal que causa a formação de partículas sólidas ou líquidas, de acordo com os constituintes empregados (JUNG; PERRUT, 2001; YEO; KIRAN, 2005).

As características do produto (como morfologia, tamanho, distribuição do tamanho e cristalinidade das micropartículas) podem ser modificadas pelo ajuste de alguns parâmetros de processo, tais como concentração do soluto, pressão e temperatura de pré-expansão, pressão e temperatura de expansão e geometria do bico (MISHIMA, 2008; TANDYA et al., 2007). De acordo com Labuschagne, Naicker e Kalombo (2016), para que o CO_2 seja absorvido pelo polímero e ocorra a posterior liquefação do sistema, é necessário que o polímero possua grupos de afinidade com CO_2, a exemplos de grupos doadores de elétrons, como carbonil, éter, cetona ou grupos com flúor em sua formação.

O processo PGSS é considerado uma técnica de formação de partículas adequada quando se trabalha com polímeros de baixo ponto de fusão e gorduras, pois muitos desses componentes dissolvem grandes quantidades de CO_2, mesmo em pressões moderadas (FRAILE et al., 2013). Com a dissolução de CO_2 em compostos orgânicos parâmetros como a viscosidade, ponto de fusão e a temperatura de transição vítrea dos polímeros são reduzidos. Esta despressurização rápida libera CO_2 no estado gasoso, que retira calor da solução do material encapsulado. Este efeito de super-resfriamento, semelhante ao processo RESS, também é resultante do efeito de Joule-Thomson[4], que somados, decrescem a temperatura para baixo da temperatura de cristalização, e como consequência, a

[3] WEIDNER, E.; STEINER, R.; KNEZ, Z. Powder generation from polyethyleneglycol with compressible fluids. In: High Pressure Chemical Engineering, Elsevier, Amsterdam. P. 223–228, 1996.

[4] O efeito Joule-Thomson se refere a variações de temperatura causadas por variações de pressão em condição isoentálpica (sem variação de entalpia), para um gás real (SAYGIN; ŞIŞMAN, 2001).

atomização e a precipitação da substância alvo é desencadeada (COCERO et al., 2009; SANLI; BOZBAG; ERKEY, 2012).

A técnica PGSS oferece numerosas vantagens: a pressão utilizada é menor do que a necessária na RESS; a quantidade requerida de gás é relativamente pequena; é dispensável o uso de solventes orgânicos; o processo pode acontecer em modo continuo quando o equipamento for adequado para tal e quando bem-sucedido, o processo proporciona um bom rendimento (PASQUALI; BETTINI, 2008). Outra importante vantagem desse processo é que as substâncias aplicadas, materiais de núcleo ou de parede, não necessitam ser solúveis em CO_2SC (BYRAPPA; OHARA; ADSCHIRI, 2008).

A técnica PGSS também tem uma variação, a PGSS-*drying*, na qual a precipitação ocorre com base na utilização de CO_2SC como propulsor e meio de secagem e com esta técnica podem-se produzir partículas de soluções aquosas, sendo um processo alternativo a métodos como secagem por pulverização e criodessecagem. As principais vantagens do método PGSS-drying sobre as técnicas convencionais são uma atomização mais eficiente, devido à rápida liberação e expansão do gás a partir da solução supercrítica durante a despressurização em condições ambiente e a possibilidade de secar o material com temperaturas mais baixas na torre de pulverização (40-80 °C), limitando a exposição do material encapsulado a altas temperaturas, o que torna possível a utilização de materiais de suporte que não podem ser processados por secagem convencional (PAZ; MARTÍN; COCERO, 2012).

Muitos estudos estão sendo realizados sobre a produção de partículas diversas com o emprego da técnica PGSS envolvendo materiais de núcleo variados, a exemplo de fármacos como iboprufeno (FRAILE et al., 2013), teofilina (RODRIGUES et al., 2004) e nifedipina, felodipina e fenofibrato (KERČ et al., 1999). Produtos como óleo essencial de lavanda (VARONA et al., 2010), albumina bovina sérica (PERINELLI et al., 2014), limoneno (MACHADO; PELEGATI; OLIVEIRA, 2016) e outros.

Os custos médios para a aplicação de micropartículas na área de alimentos são menores do que para fins farmacêuticos apenas quando se tem uma larga aplicação com grande volume de produção. Neste contexto, com base em uma análise econômica de uma planta de microencapsulação que opera com uma capacidade de produção de 1,5 toneladas por hora, dependendo das horas anuais de operação e a quantidade de CO_2 necessária para gerar 1 kg de pó microencapsulado pela técnica PGSS, os custos podem chegar a apenas 0,20

€ e para plantas desse porte, com uma unidade de recuperação de CO_2, poderia reduzir 25 vezes ou mais no valor final do produto (WEIDNER, 2009).

Tão importante quanto a definição da técnica a ser empregada, é a escolha do material encapsulante utilizado no processo. No caso de óleos ricos em ácidos graxos poli-insaturados, a estabilização química do material do núcleo em si é um fator-chave a se considerar. É sabido que os fatores ambientais e as diferentes etapas durante operação de microencapsulação e armazenamentos subsequentes requerem uma composição equilibrada de compostos antioxidantes, sinérgicos e quelantes com polaridade diferente (DRUSCH; MANNINO, 2009).

A maioria das pesquisas na microencapsulação de óleo de peixe tem se concentrado em descobrir a melhor combinação de materiais de parede. Para os métodos convencionais de microencapsulação, uma série de materiais de microencapsulação pode ser empregada. Caseinato de sódio e cálcio, proteína de soja, proteína do soro de leite, gelatina, maltodextrina, sacarose, lactose, goma acácia, amidos naturais e modificados, celulose modificada e ciclodextrina modificada altamente ramificada foram relatados como protetores de óleos de peixe contra a oxidação. A liberação controlada do núcleo a partir da cápsula e a proteção dos materiais do núcleo de ambientes circundantes são dependentes das propriedades dos materiais de encapsulação usados e, além disso, as propriedades hidrofílicas dos materiais de encapsulação modulam a qualidade dos produtos finais. (AVERINA; KUTYREV, 2011).

2.5 Amidos Modificados Como Agentes de Encapsulação

Os materiais usados como revestimento nos processos de microencapsulação devem satisfazer a vários requisitos: (*i*) ser compatível com o seu material de núcleo e ao fim a que se destina, (*ii*) ausente de toxicidade, (*iii*) proporcionar um meio adequado para conservar as propriedades e a atividade da substância ativa, (*iv*) ser fácil de processar com a técnica de precipitação selecionada, dentre outros. Existe uma infinidade de materiais, dentre polímeros naturais ou sintéticos como agentes de revestimento e os polissacarídeos tem grande destaque (COCERO et al., 2009).

Amido, especialmente de milho, é um ingrediente alimentar comum, disponível em grandes quantidades e a baixo custo, que tem encontrado usos além da nutrição humana, incluindo aplicação na indústria de papel, têxtil, de cosméticos, de produtos adesivos, como substrato para a produção de etanol e modificador de viscosidade e em perfuração de petróleo. Na indústria alimentícia, uma das suas muitas aplicações tem sido como veículo de liberação de substratos de alto valor, incluindo óleos e outros agentes aromatizantes (COMIN; TEMELLI; SALDAÑA, 2012).

O amido é um hidrato de carbono polimérico utilizado como matriz sólida para a encapsulação de ingredientes alimentares. Ele está presente em muitas espécies de plantas e é purificado na forma de grânulos, cujas especificidades refletem a sua origem botânica. Os principais componentes de amido são amilose e amilopectina, dois tipos de α-glucana, que representam cerca de 98-99% do peso seco do amido (ALMEIDA et al., 2013).

Um material comum para a microencapsulação na indústria alimentar é o amido modificado com anidrido octenil succínico (amido OSA, KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005). A sua modificação consiste na adição de um composto lipofílico, anidrido octenil succínico, o que aumenta a estabilidade da emulsão e a sua utilização pela indústria de alimentos e farmacêutica com a aprovação do FDA como aditivo alimentar, desde que o conteúdo de ramificações de octenil succinato não exceda 3% (BORRMANN et al., 2013; XIE et al., 2010).

Os amidos modificados com octenil succinato mais utilizados são os derivados do milho ceroso. Estes amidos contêm grupos de amilopectina quimicamente modificada quanto à adição de um grupo lateral (octenil succinato), o qual é aniônico e apolar. Estes grupos laterais ligam a molécula de amido à superfície das gotas de óleo ou outras substâncias não lipídicas apolares, enquanto as cadeias de amido hidrofílicas sobressaem para a fase aquosa e protegem as porções apolares contra a agregação por meio de repulsão estérica, tornando as emulsões estabilizadas por amido modificado resistentes a alterações do pH, força iônica e temperatura (SILVA, VIEIRA; HUBINGER, 2014). Este carácter anfifílico atribuído aos amidos modificados confere a esse material uma excelente capacidade de retenção de voláteis durante a atomização, além de uma boa propriedade emulsificante (FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2014).

Os amidos modificados têm sido extensivamente usados em processos de microencapsulação, a exemplo da microencapsulação de óleo de peixe (ANWAR; KUNZ,

2011) e óleo essencial de alecrim (DRUSCH et al., 2007; FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2014). Também foram empregados na secagem de suco de maracujá, com um acréscimo de 10% em relação ao volume de suco (BORRMANN et al., 2013), de óleo de semente de romã (SAHIN-NADEEM; ÖZEN, 2014), β-caroteno (MATTEA et al., 2009), oleoresina de cardamomo (KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005), oleoresina de cominho (KANAKDANDE; BHOSALE; SINGHAL, 2007), óleo de café verde (SILVA; VIEIRA; HUBINGER, 2014), dentre muitos outros.

III OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo geral estudar a obtenção do esqualeno presente no óleo de fígado de cação-azul (*Prionace glauca*) e beijupirá (*Rachycetron canadum*) utilizando a extração com CO_2 supercrítico e o processo de formação de micropartículas utilizando a técnica de formação de partículas por soluções ou suspensões em gás saturado (PGSS).

Para este fim, os objetivos específicos foram:

- Obter as amostras de fígado de cação-azul e beijupirá;
- Caracterizar físico-quimicamente as amostras de fígado de cação-azul e beijupirá;
- Extrair e caracterizar o óleo de fígado de beijupirá físico-quimicamente e quanto ao perfil de ácidos graxos e esqualeno;
- Determinar, dentro das condições estudadas de pressão e temperatura, a condição operacional que favorece a obtenção do óleo do fígado de cação-azul com maior concentração de esqualeno;
- Caracterizar o óleo de fígado de cação-azul físico-quimicamente e quanto ao perfil de ácidos graxos e esqualeno, e comparar os valores encontrados com óleo de fígado de tubarão adquirido comercialmente;
- Proceder a microencapsulação do óleo do fígado de cação-azul utilizando a técnica de formação de partículas por soluções ou suspensões em gás saturado (PGSS), aplicando diferentes agentes de impregnação e condições de pressão e temperatura do fluido supercrítico;
- Realizar análises de caracterização das micropartículas e estudo da estabilidade do material formado por um período de 60 dias.
- Estudar o comportamento dos polímeros aplicados neste trabalho em meio supercrítico sob determinadas condições utilizando parâmetros como expansão volumétrica e determinação do ponto de névoa.

IV MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das Amostras

Neste trabalho foram estudados óleos de origem marinha provenientes de três fontes distintas: fígado de cação-azul, fígado de beijupirá e óleo comercial de tubarão. O óleo comercial de tubarão foi obtido junto à empresa Ecomer® (São Paulo, SP, Brasil), acondicionado em cápsulas de gelatina farmacêutica, glicerina e água (Figura 5).

Figura 5 - Cápsulas de óleo de fígado de tubarão comercial

Fonte: Própria autoria.

4.1.1 Obtenção do Fígado de Beijupirá (*Rachycentron canadum*)

Amostras de fígado de beijupirá foram cedidas por uma fazenda marinha localizada em Ubatuba/SP em abril de 2013. Os peixes (machos e fêmeas em idade de abate, com peso médio de 3 a 4 kg) foram trazidos refrigerados até o Abatedouro Escola da FZEA/USP e lá foram devidamente eviscerados e seus fígados foram separados das outras vísceras. Os fígados foram prontamente congelados e transportados ao Laboratório de Tecnologia de Alta Pressão e Produtos Naturais (LTAPPN) da FZEA/ USP, onde foram armazenados em freezer a -20 °C. As amostras congeladas de fígado foram fatiadas ou cortadas em pequenos pedaços e então liofilizadas por 24h (Figura 6) (LC-1500 Terroni, São Carlos, SP, Brasil).

Figura 6 - Amostra de fígado de beijupirá congelado antes da liofilização (a) e fígado liofilizado com sua embalagem de armazenamento ao lado (b)

(a)

(b)

Fonte: Própria autoria.

Após a liofilização, as amostras de fígado foram acondicionadas novamente em freezer a -20°C, até o momento da extração supercrítica. Uma alíquota destas amostras foi utilizada para análise da composição centesimal, de acordo com as normas do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Ensaios de umidade (método 012/IV), cinzas (método 018/IV), lipídios (método 032/IV), fibras (método 044/IV), proteínas (método 036/IV) e carboidratos foram realizados em triplicata.

4.1.2 Obtenção do Fígado de Cação-Azul (*Prionace glauca*)

Os exemplares de cação-azul foram pescados e gentilmente cedidos pela empresa Oceanus Comércio e Transporte LTDA, localizada no Porto de Recife (PE) em junho de 2013. Os nove cações, entre machos e fêmeas (Figura 7) com mais de 1 m de comprimento foram coletados pelos pescadores utilizando a modalidade de espinhel ao longo dos 15 dias de permanência da embarcação no mar, na Zona Econômica Exclusiva (ZEE) do Brasil. Os exemplares de cações recém-pescados ficaram resfriados durante os diferentes dias de pesca.

Quando o barco retornou ao porto, os cações foram colocados no convés onde foi feita a retirada das vísceras e do fígado de cada animal. Logo depois, estas foram colocadas em caixa térmica com gelo. Os fígados foram transportados via aérea para São Paulo e chegando ao LTAPPN, os fígados foram rapidamente manipulados para a retirada da vesícula biliar

(estrutura de cor esverdeada, Figura 7) e depois desse procedimento, foram congelados em freezer a -20 °C.

Figura 7 - Obtenção e preparo dos fígados de cação-azul. O cação-azul (superior, esquerda) e seu fígado (superior direita). Detalhe na vesícula biliar (inferior, esquerda) e um fígado fatiado pronto para liofilização (inferior, direita)

Fonte: Própria autoria.

Para a secagem dos fígados por meio da liofilização, necessitou-se filetá-los e esta etapa foi realizada no Abatedouro Escola da FZEA/USP. Cada pedaço de fígado foi embalado separadamente para evitar aderência entre eles durante o recongelamento. Transportados em caixa térmica com gelo, os fígados foram liofilizados na indústria Berkka Liofoods (Araras, Brasil) em liofilizador de solo (Liotop LP1040, Liobrás, São Carlos, SP, Brasil) durante 24h. Após a secagem, os fígados foram embalados à vácuo em embalagem laminada (dois pedaços de fígado em cada) com o intuito de eliminar o oxigênio e evitar o contato com a luz e com isso, preservar as amostras pelo máximo de tempo possível, sem drásticas alterações

na composição. Assim como nas amostras de fígado de beijupirá, também foram realizadas análise da composição centesimal (ver item 4.1.1).

Para a obtenção, coleta da víscera e transporte aéreo e terrestre do fígado de cação-azul, foi necessário solicitar a autorização para tais atividades junto ao Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), vinculado ao Ministério do Meio Ambiente (MMA). O SISBIO (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade), foi implementado em 2007 com o objetivo de permitir aos pesquisadores a solicitação à distância de autorização para a realização de pesquisas e a coleta de material biológico em todo o território nacional, sobretudo aquelas com espécies ameaçadas, em unidades de conservação federais ou cavernas (BRASIL, 2012b). No apêndice C desta tese pode-se visualizar a autorização para atividades com finalidade científica expedida IBAMA/ IMCBio.

4.2 Extração Supercrítica de Óleo de Fígado de Beijupirá (*Rachycentron canadum*) e Cação-Azul (*Prionace glauca*)

4.2.1 Extração Supercrítica do Óleo de Fígado de Beijupirá

Para a extração supercrítica do óleo de fígado de beijupirá, cortou-se os fígados liofilizados em pedaços desuniformes e com dimensões que variaram de 1 a 4 cm^3. Os ensaios de extração foram conduzidos em um extrator supercrítico (Thar SFC, Pittsburgh, Estados Unidos) no LTAPPN/ FZEA/ USP.

O fígado liofilizado (10 g) foi acondicionado em um leito fixo de 300 cm^3, o qual teve o seu volume completado com esferas de vidro e colocado no equipamento (Figura 8). Durante o funcionamento do equipamento, o dióxido de carbono (1) (99,5%, Oxinitro, Pirassununga, Brasil) deixa o cilindro por uma tubulação que segue para ser resfriado em um banho termostatizado (2) até -2,3 °C (Thermo Scientific, Walthan, Massachusetts, Estados Unidos). O CO_2 é bombeado no estado líquido com uma bomba HPLC (3) (Thar P54, Pittsburgh, Estados Unidos) para um trocador de calor (4) no qual é aquecido a uma temperatura 2 °C inferior à temperatura de operação. O valor da temperatura operacional escolhida é atingido no próprio extrator encamisado. O controle da P e T operacional é feito por manômetros e termopares (5), respectivamente, os quais são operados via software (8) (Thar Technologies Inc., SuperChrom SFC Suite v. 5.9, Pittsburgh, Pensilvânia, Estados

Unidos). Uma vez o sistema pronto para a extração, aguardava-se a pressão e a temperatura estabilizar por alguns minutos e logo se iniciava a extração supercrítica.

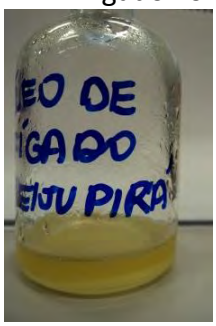
Figura 8 - Extrator supercrítico da Thar Technologies Inc.. Em destaque, o cilindro de CO_2 (1), banho termostatizado (2), bomba HPLC (3), trocador de calor (4), controle das temperaturas (5), controlador de pressão (6), frasco de coleta de extratos (7) e tela do software (8)

Fonte: Própria autoria.

O óleo bruto (7), separado do gás, foi continuamente coletado em um frasco coletor imerso em banho de gelo. O frasco coletor foi deixado aberto ao abrigo da luz por 1h após a extração para a saída do CO_2 dissolvido na amostra (Figura 9) e só então os frascos com os óleos foram pesados e relacionados com a massa da matriz (fígado de beijupirá liofilizado) para o cálculo do rendimento (eq.(1)).

$$R = \frac{massa\ do\ óleo}{massa\ do\ fígado} \times 100 \qquad (1)$$

Figura 9 - Amostra de óleo de fígado de beijupirá logo após a extração supercrítica (a) e fígado liofilizado após a SFE (b)



(a)

(b)

Fonte: Própria autoria.

Nos experimentos iniciais, os frascos coletores dos óleos foram trocados a cada hora e a partir da sétima hora notou-se um incremento de rendimento muito pouco significativo, o que determinou o tempo de extração em 6 h. As condições operacionais das extrações preliminares do óleo do fígado de beijupirá foram baseadas em informações contidas na literatura. Davarnejad et al. (2008) afirma que o óleo de peixe é termicamente sensível e por isso, em seu estudo de solubilidade deste óleo em CO2 supercrítico, foi utilizado uma faixa de temperatura de 40 a 70 °C. Pontos deste intervalo de temperatura serviram de base para as primeiras extrações de óleo de fígado de beijupirá. As diferentes extrações foram feitas segundo as condições operacionais apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Verificação da influência da temperatura e da vazão de CO_2 na extração supercrítica do óleo de fígado de beijupirá

Primeira etapa do estudo das condições operacionais	
Vazão (g de CO_2/ min)	Temperatura (°C)
8	50 60 70
Segunda etapa do estudo das condições operacionais	
Vazão (g CO_2/ min)	Temperatura (°C)
5 8 11	50 60

Pressão fixa a 250 bar para todas as extrações.
Fonte: Própria autoria.

Na primeira etapa do estudo das condições operacionais para a escolha das temperaturas que propiciam maiores rendimentos (entre 50, 60 e 70 °C), a pressão (P) de

250 bar foi baseada no trabalho de Rubio-Rodríguez et al. (2012), o qual nos seus ensaios de extração de óleo a partir de subprodutos de pescado, obteve elevados rendimentos de extração usando este valor de P na temperatura de 40 °C. Na escolha inicial da vazão (V) de CO_2 foi adotada a média entre as vazões mínima e máxima operáveis pela bomba HPLC do equipamento, sendo 5 g de CO_2/ min e 11 g de CO_2/ min.

Com as temperaturas escolhidas (de 50 e 60 °C) foram realizadas novas extrações para avaliar o efeito da vazão de CO_2 no rendimento das extrações supercríticas (segunda etapa do estudo das condições operacionais).

4.2.2 Extração Supercrítica do Óleo do Fígado de Cação-Azul

Os resultados observados nas extrações com o fígado de beijupirá serviram de base para a definição dos parâmetros operacionais que foram estudados na extração supercrítica do óleo de fígado de cação-azul (Tabela 6). Os fígados liofilizados foram cortados em pequenos pedaços (Figura 10a) e acondicionados (15 g) no leito fixo de 300 cm^3, sendo preenchidos com esferas de vidro. As extrações foram realizadas durante 6 h utilizando uma vazão constante de 8 g de CO_2/ min e em triplicata, totalizando 30 ensaios. Utilizou-se um delineamento estatístico com 3 repetições e esquema fatorial 5x2, abrangendo 5 pressões e 2 temperaturas.

Tabela 6 - Condições operacionais P e T usadas na extração supercrítica do óleo do fígado de cação-azul

Condição	P (bar)	T (°C)
1	100	50
2		60
3	150	50
4		60
5	200	50
6		60
7	250	50
8		60
9	300	50
10		60

Fonte: Própria autoria.

A Figura 10b apresenta a imagem do óleo de fígado de cação-azul (200 bar e 60 °C) e à direita, mais claro, o óleo comercial de fígado de tubarão.

Figura 10 - Amostras de fígado de cação-azul antes da extração (a) e óleo resultante da SFE, com o óleo comercial da ECOMER à direita (b)

(a)

(b)

Fonte: Própria autoria.

Os rendimentos de óleos obtidos nas diferentes condições operacionais foram calculados de dois modos. Pelo balanço de massa calculado pela razão mássica, ou pela relação entre a massa inicial de fígado empacotada no leito fixo e a massa final após a extração denominado rendimento global (RG) (eq.(2)) ou pelo rendimento da extração (RE) relação entre a massa de óleo coletada no frasco, ao final da extração e a massa inicial de fígado empacotada no extrator (eq.(3)).

$$\text{RG (\%)} = \frac{(MF_i - MF_f)}{MF_i} \times 100 \qquad (2)$$

em que:

MF_i – massa de fígado inicial;

MF_f – massa de fígado ao final da extração.

$$\text{RE (\%)} = \frac{(M_{óleo})}{MF_i} \times 100 \qquad (3)$$

em que:

$M_{óleo}$ – massa de óleo extraída;

MF_i – massa de fígado inicial.

4.3 Análise Morfológica do Fígado Antes e Após a Extração Supercrítica

A morfologia das amostras de fígado de beijupirá e do cação-azul bem como possíveis mudanças após o contato com o CO_2 em condições supercríticas foram visualizadas com a microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram separadas amostras antes e depois das extrações e estas foram levadas ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA/FZEA/USP),

onde foram fixadas com fita adesiva dupla face de carbono em suporte de alumínio e em seguida foram geradas micrografias em microscópio eletrônico de varredura com tensão de aceleração de 5 kV (Hitachi, TM 3000, Tóquio, Japão), com aumentos variados.

4.4 Estudo do Óleo do Fígado de Cação-azul e Beijupirá

4.4.1 Caracterização do Óleo de Fígado de Cação-azul (OFCA) e Beijupirá (OFB)

Com o intuito de caracterizar o OFCA e OFB extraídos por SFE e comparar com o óleo de fígado de tubarão comercial (OFTC), foram realizadas as seguintes análises físico-químicas e de quantificação dos compostos de interesse neste trabalho. Vale lembrar que, como se trata de óleos provenientes de matrizes animais pouco estudadas, estes resultados constituem importantes dados originais.

O índice de refração das amostras de óleo (OFCA, OFB e OFTC) foi mensurado em refratômetro (LAMBDA 2WAJ, ATTO Instruments Co, Tsuen Wan, Hong Kong), em função da luz de sódio no comprimento de onda de 589,3 nm e à temperatura de 25 e 40 °C. A calibração do aparelho foi feita com água destilada, cujo índice de refração é de 1,3330 a 20°C (ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Para manter a temperatura constante durante as medidas, circulou-se água por meio da conexão do refratômetro a um banho termostatizado na temperatura de leitura.

A análise de densidade dos óleos (OFCA e OFTC) foi realizada em densímetro digital de bancada (DMA 4500, Anton Paar, Graz, Áustria). Este equipamento é capaz de fornecer dados de densidade com incerteza de 0,00005 g/cm^3 e com repetibilidade do desvio padrão igual a 0,00001 g/cm^3. O óleo foi injetado com uma seringa diretamente no equipamento e as leituras de densidade foram feitas a 25 e 40 °C, em triplicata e após a estabilização de cada temperatura.

A viscosidade das amostras de óleo, também realizada nas mesmas temperaturas da análise de densidade, foi feita em micro-viscosímetro automático de queda de esfera para as amotras de OFCA e OFTC (AMVn, Anton Paar, Graz, Áustria). Além do controle de temperatura, este equipamento permite a determinação da viscosidade de uma mesma amostra em diferentes ângulos de inclinação e repetições, proporcionando assim, maior precisão e confiabilidade nos resultados. As amostras foram colocadas em tubo capilar de

vidro calibrado de 1,8 mm. Acoplou-se o tubo capilar no aparelho e procederam-se as leituras em quadriplicata a cada temperatura sob três ângulos diferentes de deslocamento (50, 60 e 70 °), totalizando 12 medidas por amostra.

Para a determinação do índice de acidez em ácido oleico (%), 2 g de óleo (OFCA, OFB e OFTC) foram misturados a uma solução de éter etílico (Ecibra, São Paulo, SP, Brasil): álcool (Panreac Química S.A.U., Barcelona, Espanha) na proporção de 2:1 e em seguida foram adicionados 3 gotas do indicador fenolftaleína (Synth, Diadema, SP, Brasil). A titulação foi realizada com uma solução padronizada de hidróxido de sódio (Haloquímica, São Paulo, SP, Brasil) 0,01 M até o aparecimento da cor rósea e permanência dela na solução por até 30 s (método 325/IV de ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). Os resultados do índice de acidez (IA) foram calculados a partir do volume da solução de hidróxido de sódio gasto na titulação (eq.(4)).

$$\mathrm{IA}\ (\%) = \frac{\mathrm{v} \times \mathrm{f} \times 0{,}01 \times 28{,}2}{m} \qquad (4)$$

na qual:

v = volume gasto na titulação (mL);

f = fator de correção da solução;

m = massa da amostra (g).

Para a determinação do índice de peróxido (IP) dos óleos de fígado de cação-azul, de beijupirá e de tubarão comercial, 2,5 g de amostra pesados em um frasco tipo Erlenmeyer foram misturados a 15 mL de uma solução de ácido acético (Synth São Paulo, Brasil): clorofórmio (Êxodo, São Paulo, Brasil) (3:2) e 15 mL de uma solução saturada de iodeto de potássio (Synth, São Paulo, Brasil) (30 g em 21 mL de água destilada). A mistura foi colocada em repouso ao abrigo da luz por 1 min. Após este período, foram adicionados 15 mL de água destilada e a titulação foi realizada com uma solução padrão de tiossulfato de sódio (Haloquímica, São Paulo, Brasil) 0,01M até a solução passar da cor amarelada para quase branco. A seguir, foram acrescentados 0,5 mL de amido 1% (Haloquímica, São Paulo, Brasil), tornando o meio azul escuro. A titulação continuou até a solução azulada passar para branco. Uma solução controle, sem óleo, foi feita e titulada nas mesmas condições (método

326/IV de ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). A eq.(5) foi utilizada para expressar os resultados em índice de peróxido em miliequivalentes de O_2 ativo por kg de amostra.

$$IP = \frac{(A-C) \times M \times f \times 1000}{m} \quad (5)$$

Em que:

A = volume gasto na titulação da amostra (mL);

C = volume gasto na titulação do controle (mL);

M= molaridade da solução de tiossulfato de sódio (M);

f = fator de correção da solução de tiossulfato de sódio;

m = massa da amostra (g).

Na determinação do índice de iodo (IO) ou valor de iodo, amostras de óleo (0,25 g de OFCA, OFB e OFTC) foram misturadas com 10 mL de ciclohexano (Synth, São Paulo, Brasil) e 25 mL da solução de Wijs (Haloquímica, São Paulo, Brasil). Foi feita uma agitação lenta e circular e o sistema foi mantido em repouso por 30 min. Em seguida foram adicionados 10 mL de iodeto de potássio 15% e 100 mL de água destilada. A titulação foi realizada com uma solução padrão de tiossulfato de sódio, até a solução passar da cor amarelada para quase branco. A seguir, foram acrescentados 0,5 mL de amido 1%. A titulação continuou até a solução azulada passar para branco. Uma solução controle, sem óleo, foi feita e titulada nas mesmas condições (método 329/IV de ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). A eq.(6) expressa os resultados.

$$IO = \frac{(C-A) \times M \times 12{,}69}{m} \quad (6)$$

Em que:

C = volume gasto na titulação do controle (mL);

A = volume gasto na titulação da amostra (mL);

M = molaridade da solução de tiossulfato de sódio (M);

m = massa da amostra (g).

O índice de saponificação dos óleos (IS) foi determinado a partir da mistura de 4 g de amostra de óleo (OFCA, OFB e OFTC) com 50 mL de solução alcoólica de hidróxido de potássio a 4% (Êxodo, São Paulo, Brasil). Essa mistura ficou sob aquecimento por 30 min. Em seguida, adicionou-se fenolftaleína e titulou-se com uma solução padronizada de ácido clorídrico 0,5 M (Haloquímica, São Paulo, Brasil) até a mistura passar de rósea para branco. Uma solução controle, sem óleo, foi feita e titulada nas mesmas condições (método 328/IV de ZENEBON; PASCUET; TIGLEA, 2008). A eq.(7) expressa os resultados.

$$\mathrm{IS} = \frac{(\mathrm{C}-\mathrm{A}) \times \mathrm{f} \times 28{,}05}{\mathrm{m}} \qquad (7)$$

Em que:

C = volume gasto na titulação do controle (mL);

A = volume gasto na titulação da amostra (mL);

f= fator de correção do ácido clorídrico;

m = massa da amostra (g).

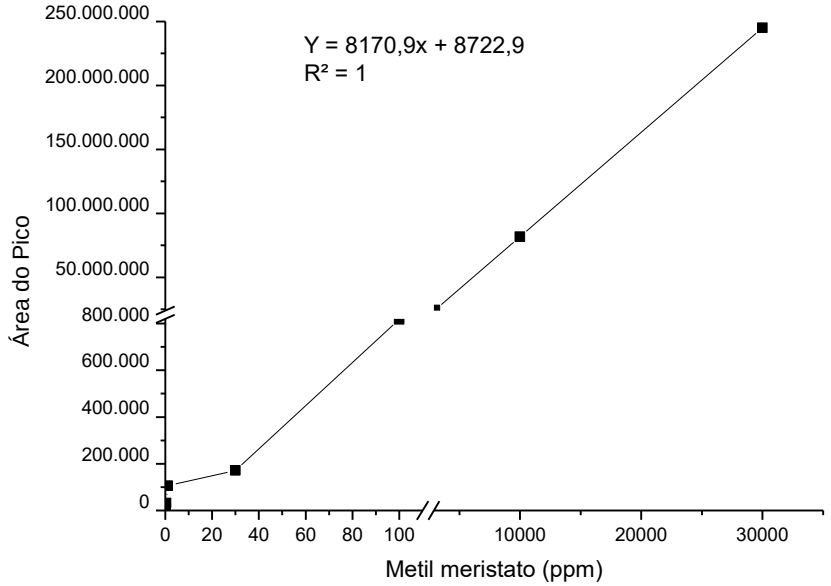
O perfil de ácidos graxos foi realizado segundo a AOAC 2005 (Método 991.39) com modificações. Em um tubo de Falcon contendo 50 mg de amostra de óleo (OFCA, OFB e OFTC) foi adicionado 3,0 mL da solução metanólica de NaOH (Synth, Diadema, S, Brasil) 0,5 M e levou-se a mistura para aquecimento em banho-maria a 100 °C por 5 min. A seguir, adicionou-se 4,0 mL do reagente de esterificação, o BF_3 metanólico (Sigma-Aldrich, Sant Louis, MO, Estados Unidos). A mistura foi, novamente, aquecida durante 30 min. Em seguida, foi adicionado 10 mL de solução salina (35,7 g NaCl/100 mL H_2O) e 1 mL de hexano (Merck, Darmstadt, Alemanha) e a mistura foi colocada sob agitação por 1 min. O tubo foi repousado para a separação de fases e então a fase superior, contendo os metil ésteres de ácidos graxos, foi seca em capela com circulação de ar e os metil ésteres de ácidos graxos foram diluídos novamente em hexano, na concentração de 10.000 ppm.

A análise dos ácidos graxos foi feita em cromatógrafo gasoso com espectrômetro de massas acoplado, CG-EM, (QP 2010 Plus, Shimadzu, Tóquio, Japão) com injetor automático (AOC-5000, Shimadzu, Tóquio, Japão). Nesta análise utilizou-se uma coluna capilar com fase estacionária de bis-cianopropil polisiloxano (100 m × 0,25 mm id × 0,20 µm df, SP–2560

Supelco, Bellefonte, Estados Unidos) e gás Hélio como gás de arraste a uma velocidade interna de 19,5 cm/s.

Foi injetado 1,0 µL da solução contendo metil ésteres em hexano no modo *splitless*. A temperatura do injetor foi de 250 °C e a do detector foi de 260 °C. A temperatura do forno foi regulada de forma a se obter uma rampa, iniciando em 100 °C por 1 min, 100 °C a 195 °C a uma razão de 5 °C/ min e depois de 195 °C para 250 °C. A identificação prévia dos picos foi feita via comparação dos espectros de massas das bibliotecas NIST e NIST 08 e a quantificação foi feita por normalização externa relacionando a área dos picos com a curva padrão de metil meristato (Figura 11) (Sigma-Aldrich, Sant Louis, Estados Unidos). Estas condições foram baseadas na AOAC (método 996.05, 2005).

Figura 11 - Curva padrão de metil meristato com equação linear da reta para quantificação dos ácidos graxos



Fonte: Própria autoria.

4.4.2 Análise dos compostos ativos presentes nos óleos de pescado

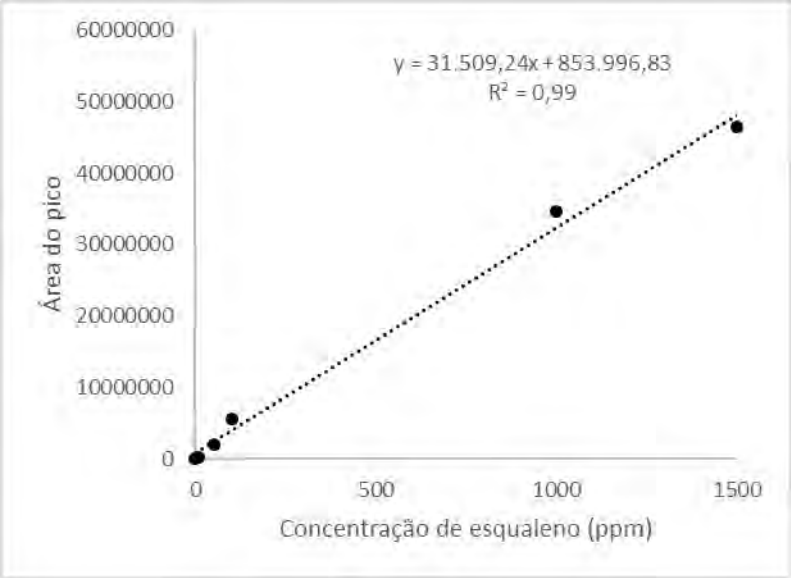
A quantificação de esqualeno foi realizada seguindo a metodologia do estudo de Lu, Jiang e Chen (2003). Em um tudo de Falcon contendo 0,5 g de óleo (de fígado de cação-azul, beijupirá e de tubarão comercial) foram adicionados 40 mL de uma mistura de metanol-acetona (7:3, v/v). A mistura foi homogeneizada durante 5 min em um agitador mecânico (IKA, VG 3 S000, Washington, Estados Unidos) e armazenado a -2 °C, durante 30 h. O sobrenadante foi filtrado rapidamente com uma membrana de 0,45 mm (Whaltman, Kent,

Reino Unido) e o resíduo foi lavado com 5 mL de uma solução refrigerada de metanol-acetona (7:3, v/v) a -20 °C. o filtrado resultante foi seco em capela em um frasco tipo penicilina e armazenado sob refrigeração. No momento da injeção em CG-EM (QP 2010 Plus, Shimadzu, Japan), foi ressuspendido em 5 mL de acetona.

A cristalização fracionada é conhecida como a mais antiga operação de separação na área de engenharia química, sendo considerado um dos melhores e mais baratos métodos disponíveis para a produção de sólidos puros a partir de soluções impuras e embora seja simples, o ponto crucial para a separação é a escolha do solvente adequado (XU et al., 2005).

As condições da análise cromatográfica testadas foram as sugeridas em trabalho de Brunner, Saure e Buss (2009) com modificações. Usou-se como fase estacionária a coluna 5% difenil/ 95% dimetilpolisiloxano RTX-5MS (30 m × 0,25 mm i.d. × 0,20 µm d.f.; Restek, Bellefonte, Estados Unidos), o gás hélio como gás de arraste a uma velocidade interna de 19,5 cm/ s. Foi injetado 1,0 µL do filtrado no modo *splitless*. As temperaturas do injetor, detector e interface foram de 280, 300 e 300 °C, respectivamente. A temperatura do forno foi regulada de forma a se obter uma rampa iniciando em 130 °C por 2 min, 130 °C a 200 °C a uma razão de 10 °C/min, de 200 °C a 290 °C a 5 °C/min e permanecendo a 290 °C por 15 min. A identificação prévia dos picos foi feita via comparação dos espectros de massas com aqueles da biblioteca NIST e NIST 08S e também pela comparação o tempo de retenção do analito com o padrão, que foi analisado nas mesmas condições. A quantificação foi feita utilizando a normalização externa com concentrações de esqualeno de 5 a 2.000 ppm (Figura 12), relacionando a área do pico com a curva padrão de esqualeno (Santa Cruz, Dallas, Estados Unidos).

Figura 12 - Curva padrão de esqualeno com equação linear da reta para quantificação do esqualeno



Fonte: Própria autoria.

A determinação da vitamina A foi realizada de acordo com metodologia da Farmacopeia Europeia (2004) com modificações. A 1,0 g de óleo de fígado de cação-azul e de tubarão comercial foram adicionados 3 mL de solução de hidróxido de potássio (50% em água destilada) e 30 mL de etanol. A mistura permaneceu por 30 min em aquecimento em tubo tipo Falcon e depois foi resfriada rapidamente. Após ser transferida para balão de decantação, foram adicionados 30 mL de água destilada e em seguida, lavou-se o sistema três vezes com 50 mL de éter etílico. A fase superior foi lavada quatro vezes com 50 mL de água destilada. A fração de éter etílico contendo a vitamina A (all-*trans*-retinol) foi seca em nitrogênio e em seguida a fração seca foi ressuspendida em isopropanol (Synth, São Paulo, Brasil), na concentração de 500 ppm. A solução foi levada para leitura em espectrofotômetro (FEMTO, Cirrus 80ST, São Paulo, Brasil) a 325 nm. Para o cálculo do conteúdo de vitamina A, como equivalente de retinol (RE), utilizou-se a eq.(8).

$$Vit.\ A\ (RE\ p/\ grama) = \left(A_{325} \times \frac{1830}{100m} \times V\right) \times 0{,}30 \qquad (8)$$

Em que:

A_{325} = absorbância a 325 nm;

M = massa da amostra, em gramas;

V = volume total da solução contendo 10-15 U.I. de vitamina A por mL;

1830 = fator de conversão para a absorbância específica de all-*trans*-retinol, em U.I.

O óleo de fígado de cação-azul foi caracterizado e ainda adotou-se como parâmetro de escolha da condição operacional de extração, o óleo que contiver maior quantidade de esqualeno, o principal composto bioativo deste trabalho. Esta condição operacional de extração foi reproduzida sucessivas vezes, gerando o óleo que foi direcionado para o processo de microencapsulação com CO_2 supercrítico, detalhada a seguir.

4.5 Formação de Micropartículas de Óleo do Fígado de Cação-Azul

O processo de formação de partículas do óleo de fígado de cação-azul aplicando a técnica PGSS foi dividido em 3 etapas: (*i*) mistura do agente de impregnação (polímero) + agente encapsulado (óleo de fígado de cação), (*ii*) homogeneização da mistura com CO_2 no próprio sistema com fluido supercrítico seguida de despressurização rápida e (*iii*) estudo das micropartículas geradas a partir deste processo.

Para a fase inicial de estudo das micropartículas, alguns fatores devem ser levados em consideração, tais como a escolha do agente encapsulante, o uso (ou não) de agentes emulsificantes, a escolha do cossolvente no qual os materiais sólidos estarão dispersos e ainda a proporção entre os materiais utilizados.

Sabendo-se da diversidade de materiais poliméricos relatados na literatura como agentes de impregnação, definiu-se que os agentes de impregnação testados nesta etapa do trabalho seriam polímeros naturais, da classe dos polissacarídeos, de uso recorrente na indústria de alimentos. Embora haja informações científicas consolidadas sobre a aplicação deles em emulsões lipídicas, o emprego do etanol como cossolvente atribui características novas a estes sistemas e demanda novos estudos.

A exemplo de outros trabalhos, o etanol foi utilizado no processo de encapsulação como cossolvente na tentativa de aumentar ou facilitar a dispersão do polímero no CO_2 supercrítico. O etanol foi escolhido pelo seu comportamento não-solvente com relação às microcápsulas poliméricas produzidas, evitando a aglomeração destas após o processo de encapsulação (SANTOS et al., 2013).

Como materiais poliméricos, foi seguido o trabalho de Machado, Pelegati e Oliveira (2016), que utilizaram dois polissacarídeos, o HI CAP® 100 e a Purity Gum Ultra® (Ingredion,

Mogi Guaçu, SP, Brasil). Ambos são amidos OSA, diferindo entre si apenas pelo grau de hidrofobicidade (que é maior para a Purity Gum Ultra®). Também foi utilizada lecitina de soja (Acros Organics, New Jersey, Estados Unidos) como agente emulsificante da mistura (Tabela 7).

Tabela 7 - Composição da mistura para formação de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul

Componentes	Massa (g)
Hi Cap® 100 ou Purity Gum Ultra®	8,0
Lecitina de soja	0,2
Etanol 99,8%	8,0
Óleo de fígado de cação-azul (OFCA)	2,0
Total	18,2

Fonte: Própria autoria.

A razão polímero: núcleo, de 1:4, foi utilizada baseada em outros estudos com estabilização de produtos extraídos por fluido supercrítico que por sua vez foram encapsulados utilizando o CO_2SC como técnica (SANTOS et al., 2013). Além disso, em se tratando de microencapsulação de óleo de peixe, várias proporções são encontradas na literatura, como 1:2 (AGHBASHLO et al., 2012; HEINZELMANN; FRANKE, 1999), 1:4 (ANWAR; KUNZ, 2011), dentre outras.

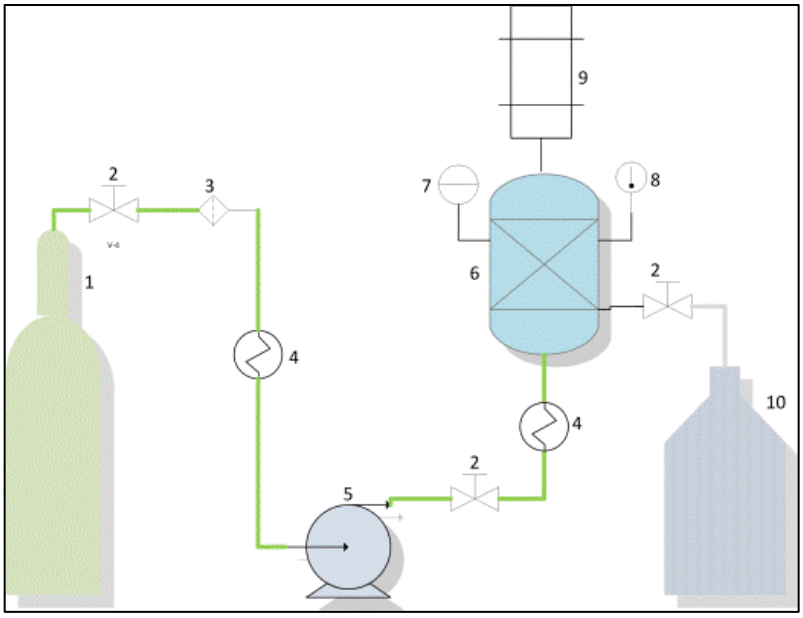
Após a pesagem dos componentes da mistura, esta foi homogeneizada de forma manual e por tempo de 2 a 3 min (testes realizados a alta rotação não resultaram em uma estabilização da dispersão, dados não mostrados) e os componentes foram colocados na autoclave. A formação de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul pela técnica PGSS foi realizada por um outro segmento do mesmo equipamento no qual se obteve os óleos de fígado de cação-azul e beijupirá com CO_2SC, o Superparticle Ress Systems (Waters Corporation). O equipamento faz os dois processos de forma separada utilizando uma mesma estrutura inicial (captação de CO_2, bombas e zonas de aquecimento), mas pode direcionar o fluxo do solvente para o leito fixo (extração) ou para a autoclave (microencapsulação).

A Figura 13 mostra o esquema do equipamento de microencapsulação supercrítica configurado com a autoclave onde foi acondicionada a suspensão contendo o polissacarídeo e o óleo de fígado de cação. O CO_2 supercrítico entra no sistema a partir do reservatório

(cilindro, 1), pressurizado pela bomba de CO_2 (5) e aquecido (4), até chegar na câmara de mistura (6), sendo pressurizado até atingir a pressão operacional de 120 bar. Esta autoclave também mantém a sua temperatura controlada, e nos ensaios realizados foram de 40 ou 60 °C.

Após o contato e estabilização da mistura com o CO_2 por um período de 40 min a 750 rpm, a válvula foi aberta e ocorreu a despressurização rápida do sistema. Neste momento, a solução supercrítica passa por uma válvula a jusante da autoclave (2) e segue para um vaso ou câmara de expansão (10). A pressão então diminui instantaneamente, resultando na formação de partículas de dimensões micrométricas. No final, o sistema fica despressurizado e as micropartículas são recolhidas e examinadas.

Figura 13 – Desenho esquemático (sem escalas) do equipamento de microencapsulação em meio supercrítico. Cilindro de CO_2 (1), válvulas (2), filtro (3), banho termostatizado (4), bomba do CO_2 (5), autoclave (6), manômetro (7), termopar (8), misturador (9) e vaso de expansão (10)



Fonte: Própria autoria.

As condições de pressão (120 bar), temperaturas (40 e 60 °C) e tempo de homogeneização (40 min) utilizadas no processo de formação de partículas foram baseadas no trabalho de Machado, Pelegati e Oliveira (2016), gerando quatro tratamentos, os quais foram:

- Hi Cap® 100 processado a 40°C e 120 bar;
- Hi Cap® 100 processado a 60°C e 120 bar;

- Purity Gum Ultra® processada a 40°C e 120 bar e
- Purity Gum Ultra® processada a 60°C e 120 bar.

4.6 Caracterização das Micropartículas do Óleo do Fígado de Cação-Azul

No presente estudo, foram realizadas análises de caracterização das micropartículas e dos polímeros puros, para fins de comparação.

4.6.1 Estudos morfológicos via microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura foi usada para caracterizar a formato das partículas. As amostras de micropartículas e polímeros puros foram fixados individualmente em um fita dupla face de carbono e analisadas em MEV (HITACHI TM3000, JP), que possui um aumento de até 30.000 vezes com uma voltagem de aceleração variável entre 5 kV e 15 kV (KALOGIANNIS et al., 2006).

4.6.2 Determinação do Tamanho médio e distribuição de tamanho de partícula

Para a análise da distribuição de tamanho das partículas foi empregado um analisador de partículas por difração a laser (SALD-201V, Shimadzu, Japão) a um comprimento de onda de 375 nm, o qual permite conhecer o diâmetro de partículas entre 0,5 e 350 μm (SANTOS; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2005). Micropartículas de óleo de fígado de cação-azul foram dispersas em vaselina líquida (Synth, Brasil) por 18h antes das leituras no equipamento. Os polímeros puros também foram analisados.

4.6.3 Atividade de água

A atividade de água (a_w) das micropartículas foi determinada experimentalmente no equipamento AQUALAB (modelo Series 3 TE, Decagon Devices, Pullman, Estados Unidos), a 25 °C com base na verificação do ponto de orvalho. Este equipamento utiliza o princípio do ponto de orvalho para medir a atividade de água da amostra e a temperatura é precisamente controlada por um resfriador termoelétrico.

4.6.4 Umidade

O teor de umidade das micropartículas e dos polímeros puros foi medido diretamente em um analisador de umidade (modelo MB35, Ohaus, Switzerland). A temperatura final de leitura foi a 105 °C com aquecimento uniforme por meio de lâmpada de halogênio, depois da estabilização da massa final.

4.6.5 Higroscopicidade

Esta análise foi realizada com base em Cai e Corke (2000) com modificações. Uma massa de 0,2 g de amostras (micropartículas e polímeros puros) foi pesada em frascos tipo pesa filtros previamente tarados e estes foram acondicionados em dessecadores contendo uma solução supersaturada de cloreto de sódio (a_w = 0,75). Os dessecadores foram, por sua vez, armazenados em estufa incubadora a 25 °C durante uma semana. A higroscopicidade das amostras foi determinada pela diferença entre a massa absorvida e a massa inicial, em g/ 100g de amostra.

4.6.6 Solubilidade em água

Para os testes de solubilidade em água, realizado de acordo com Santos et al. (2015) com modificações, amostras de 0,5 g de micropartículas e seus respectivos polímeros puros foram pesadas em frasco do tipo Erlenmeyer, e a estes adicionaram-se 50 mL de água destilada. As micropartículas foram homogeneizadas em mesa agitadora orbital (Tecnal, Piracicaba, SP) por 30 min a 100 rpm, em temperatura ambiente. Após a homogeneização da solução, esta foi centrifugada (modelo 5430R Eppendorf, Alemanha) a 3.000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi transferida para secagem em cápsula de porcelana previamente tarada em estufa a 105 °C, até a completa evaporação da água. O resultado foi expresso em % de amostras solubilizadas em água.

4.6.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho (IV) ou de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) tem uma grande área de aplicação, a partir da análise de pequenas moléculas ou complexos moleculares, investigando as vibrações moleculares. Os grupos funcionais podem ser associados com as bandas de absorção de infravermelho características, que correspondem às vibrações fundamentais dos grupos funcionais. Na região do infravermelho médio (4.000 - 1.000 cm^{-1}), são observados dois tipos principais de vibrações: vibrações de ligações químicas, chamadas de vibrações de alongamento (ν) e as vibrações que envolvem alterações nos ângulos de ligação, as chamadas vibrações de flexão (BERTHOMIEU; HIENERWADEL, 2009).

A utilização de espectroscopia FTIR na indústria farmacêutica tem ganhado popularidade como uma ferramenta quantitativa devido à sua natureza rápida e não destrutiva, com preparação de amostra simples, facilidade na aplicação da técnica e ainda, menor ou nenhum consumo de solvente (MALLAH et al., 2015).

As micropartículas e os materiais individuais tiveram seus espectros gerados no espectrômetro Spectrum One FT-IR Spectrometer, Perkin Elmer (Massachussetts, Estados Unidos), utilizando o acessório universal de amostras para espectroscopia no infravermelho por Refletância Total Atenuada (ATR), na região espectral de 4.000 a 650 cm^{-1}, ganho 1, resolução 4cm^{-1}, 40 varreduras, utilizando o software Spectrum One versão 5.3.1.

4.6.8 Microscopia confocal

As micropartículas foram processadas novamente para esta análise, mas desta vez com a adição de 0,05% do corante Nile red (9-diethylamino-5H-benzo[alpha]phenoxazine-5-one, Sigma, Munich, Alemanha) em relação à massa de óleo de cação-azul adicionada na mistura. As imagens das amostras geradas por esta técnica, com e sem corante, foram geradas em um microscópio invertido Zeiss Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, modelo LSM780-NLO, AG, Alemanha). O microscópio foi configurado para que o filtro de emissão fosse específico para o Nile red, de 560 a 600 mn e a excitação do laser aplicado foi de 488 nm. As imagens geradas, lineares e em 3D, foram tratadas pelo programa ImageJ, versão 1.48 da Zeiss.

4.6.9 Retenção de Óleo

O óleo presente na superfície foi quantificado segundo Kim (2005). Um grama das micropartículas foi lavada com 3 x 20 mL de hexano (Synth, Brasil). O solvente orgânico contendo a fração lipídica da parte externa da cápsula foi evaporado até massa constante. O óleo de superfície foi apresentado como % de óleo de superfície em relação ao óleo inicialmente adicionado na mistura, calculado conforme eq.(9).

$$\text{Retenção de óleo } (\%) = \frac{\text{óleo}_{\,total}}{\text{óleo}_{\,inicial}} \times 100 \qquad (9)$$

4.7 Estudo do comportamento dos polímeros em meio supercrítico

Esta etapa deste trabalho compõe-se de análises complementares que visaram avaliar o comportamento dos polímeros em meio supercrítico. Os estudos envolveram dois ensaios, a verificação da expansão volumétrica (e da solubilidade) e o estudo do comportamento de fase.

4.7.1 Expansão volumétrica e solubilidade em meio supercrítico

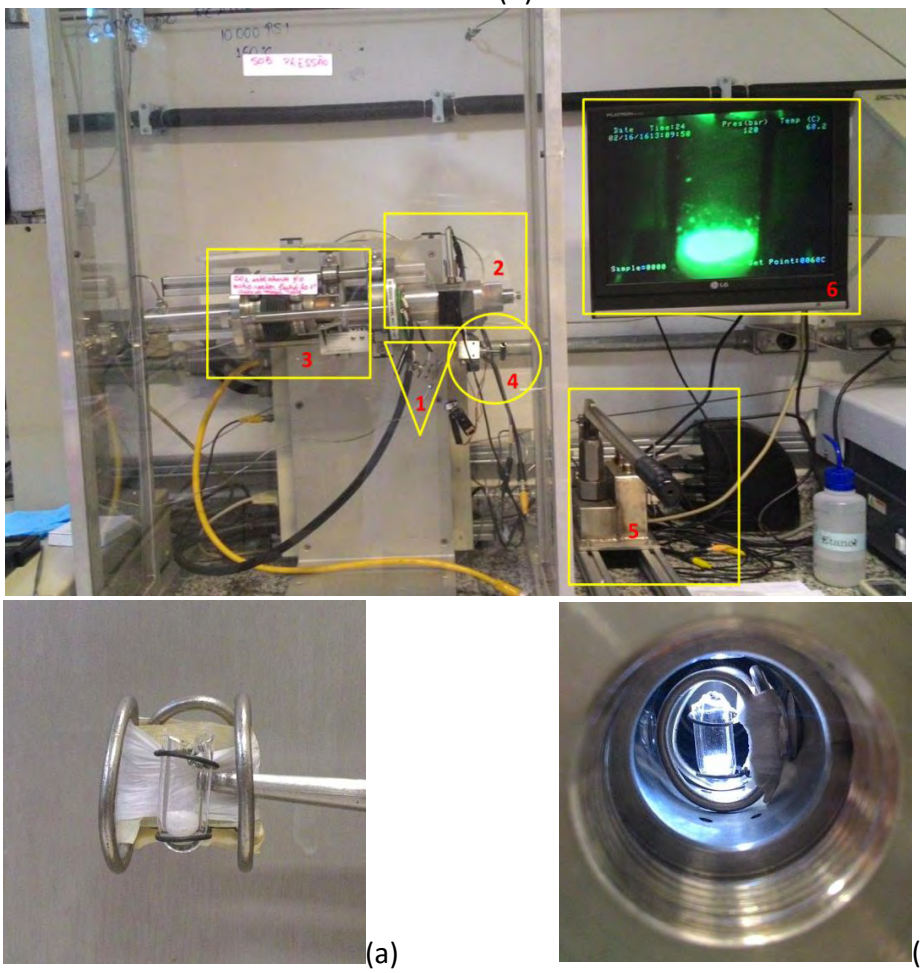
A expansão volumétrica foi realizada em um monitor de fases de alta pressão (Thar, modelo SPM20, Pittsburgh, Estados Unidos) mostrado na Figura 14.

Neste equipamento, o CO_2 é conduzido por uma bomba seringa automática (Thar P54, Pittsburgh, Estados Unidos) mantida a 1 °C com o auxílio de um recirculador (JULABO, F12-ED, Seelbach, Alemanha) até a cela do monitor de fases. A cela, que para estes experimentos foi mantida na posição horizontal sem agitador acoplado, também pode operar na posição vertical com agitação se necessário. Os polímeros foram pesados em um tubo de vidro previamente tarado, que por sua vez foram colocados em um suporte para que o tubo se mantesse na posição vertical dentro da cela.

A cela possui um volume variável, compreendido entre 5,5 mL e 15,5 mL e duas janelas de safira, nas quais ficam acopladas a fonte de iluminação de LED e a câmara CCD,

responsáveis respectivamente pela iluminação e registro das imagens que, por sua vez, são tratadas em um programa de captura de vídeo (Pinnacle Studio, Estados Unidos).

Figura 14 - Monitor de fases utilizado nos ensaios de comportamento dos polímeros em meio supercrítico. Disposição do polímero do tubo de vidro (a) e dentro da cela do monitor de fases (b)



Acima e centralizado, uma visão global do equipamento com destaque para válvula-agulha (1) de entrada para o CO_2, cela do monitor de fases (2), pistão de aço (3) que varia o volume da cela, válvula-agulha de saída de CO_2 (4), bomba hidráulica (5) e imagem captada pela câmara CCD (6) com dados instantâneos de P e T dentro da cela. Inferior, esquerda tem-se o tubo de vidro com polímero no anteparo (a) e em inferior, direita; o anteparo adequadamente disposto na cela do monitor de fases (b).
Fonte: Própria autoria.

A variação do volume é feito por meio do acionamento manual de uma bomba hidráulica que possui uma válvula de regulação tipo agulha que, quando fechada, mantém o sistema sob o volume constante. A pressurização é lenta e a vazão é controlada por uma válvula agulha na entrada da cela. A temperatura operacional é monitorada por termopares via programa computacional. O programa registra na imagem gerada da cela os valores instantâneos de pressão e temperatura, os quais também aparecem nas imagens geradas

durante os experimentos. Ao final do ensaio, despressuriza-se o sistema pela abertura da válvula agulha de saída e abre-se a cela do monitor de fase, recuperando o suporte com o tubo de vidro e a amostra testada.

Nos ensaios de expansão volumétrica realizados de acordo com Silva (2011) para os amidos modificados Hi Cap® 100 e Purity Gum Ultra®, foram pesados cerca de 5 mg de amostra em tubo de vidro previamente tarado. O tubo foi colocado no anteparo e posicionado verticalmente dentro da cela do monitor de fases. As condições de P e T utilizadas foram as mesmas aplicadas na etapa de formação de partículas, 120 bar e 40 e 60 °C. Assim, a cela do monitor de fases foi aquecida na temperatura escolhida e foi realizada uma lenta pressurização do sistema, com um volume de cela de 15 mL. Após o sistema atingir as condições de P e T, deixou-se estático por 60 min e monitorado com a captura de imagens a cada minuto.

O resultado deriva da visualização de possíveis alterações de volume em relação ao volume do tudo de vidro e da massa inicial de amostra. Com estes dados, pode-se estimar o percentual de expansão de volume e com a coleta, no momento da despressurização do sistema, do material solubilizado em CO_2, pode-se calcular a solubilidade deste material em meio supercrítico.

4.7.2 Visualização do ponto de névoa

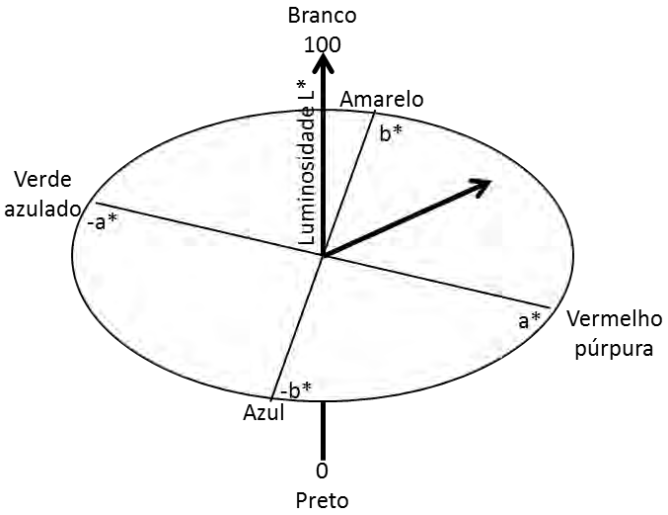
A visualização do ponto de névoa pode ser caracterizada como a situação na qual não é possível visualizar a parede do tudo de vidro. É definida por Yoon; Kim e Byun (2014) como sendo o ponto no qual a solução se torna opaca o suficiente para não se visualizar uma barra de agitação dentro da solução. Esta medida foi também realizada no monitor de fases de alta pressão. Para estes ensaios, pesou-se cerca de 2 mg de polímero no tubo de vidro previamente tarado e foi colocado na posição vertical dentro do monitor de fases. O equipamento foi fechado e pressurizado até 110 bar na temperatura de 40 ou 60 °C, com a cela em um volume inicial de 15,5 mL. A partir de então, a bomba hidráulica foi acionada manualmente diminuindo o volume da cela para 5,5 mL. Nestas condições, o sistema foi mantido estático por 30 min (alcançando 250 bar) e após este intervalo, a válvula agulha da bomba hidráulica foi aberta lentamente, aumentando o volume (e diminuindo a pressão), gerando condições operacionais para visualizar o ponto de névoa do polímero.

4.8 Análise de estabilidade das micropartículas de óleo de fígado de cação-azul

No estudo da estabilidade das micropartículas produzidas pela técnica PGSS, estas foram acondicionadas em estufa incubadora B.O.D. (TE-371, Tecnal, Piracicaba, São Paulo) a 25 °C, em recipientes de vidro hermeticamente fechados e protegidos da luz. As análises das micropartículas seguiram pelos tempos de 0, 10, 20, 30, 45 e 60 dias e com as amostras foram realizadas as análises de cor, índice de peróxido e esqualeno, detalhadas a seguir.

Na determinação de cor instrumental, as micropartículas geradas, coletadas nos tempos pré-determinados, foram analisadas quanto à cor utilizando um espectrofotômetro modelo Mini Scan XE (Hunterlab, Reston, VA, Estados Unidos), o qual é calibrado com duas placas, preta e branca, antes da leitura usando o iluminante D65 e com o padrão de observação a 10° (percepção do observador humano). Amostras dos pós foram colocadas em placas de alumínio no momento da leitura e os dados obtidos foram analisados segundo o sistema CIELAB sendo a cor expressa como L* (luminosidade), a*(de vermelho a verde) e b* (de amarelo a azul), de acordo com a Figura 15.

Figura 15 - Espaço de cor CIElab.



Fonte: Adaptado de: GONNET, J.-F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-I. A calorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 409-415, 1998.

A diferença total de cor foi avaliada pelo valor numérico ΔE*, dado pela eq.(10) (MAIER et al., 2009).

$$\Delta E^* = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2} \quad (10)$$

Em que: $\Delta L^* = L^*_{\text{tempo inicial}} - L^*_{\text{tempo final}}$; $\Delta a^* = a^*_{\text{tempo inicial}} - a^*_{\text{tempo final}}$; $\Delta b^* = b^*_{\text{tempo inicial}} - b^*_{\text{tempo final}}$.

A estabilidade oxidativa das partículas foi avaliada pelo índice de peróxido. Para isso, uma fração dos pós produzidos foi submetida a extração do óleo da superfície como explicado no item 4.6.9. Com o óleo resultante foi realizado a análise do índice de peróxido, conforme item 4.4.1.

A estabilidade do esqualeno foi avaliada no óleo extraído das partículas; em uma alíquota de cada tratamento e realizou-se a análise quantitativa de esqualeno presente. O método de quantificação foi o mesmo descrito no item 4.4.2, definido como cristalização fracionada, seguindo para análise em cromatografia gasosa (BRUNNER; SAURA; BUSS, 2009; LU et al., 2003).

4.9 Análise Estatística dos Resultados

Os resultados deste trabalho estão expressos na forma de média ± desvio padrão. As médias dos resultados foram avaliadas estatisticamente pelo teste ANOVA de uma via e de duas vias utilizando o pós-teste de médias de Tukey, ao nível de 95% de significância para detectar as diferenças significativas nas respostas entre os diferentes tratamentos. Análises de correlação de Pearson ($p<0,05$) foram realizadas entre os teores de esqualeno e as densidades de CO_2 para cada extração supercrítica.

IV RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análises do fígado e do óleo de beijupirá obtido por SFE

5.1.1 Composição do fígado de beijupirá

O fígado de beijupirá é uma rica fonte de lipídios, representando mais de 65% do total da amostra, além de possuir quantidade significativa de proteínas (Tabela 8). O processo de liofilização realizado nas matrizes reduziu o conteúdo de água e obviamente disponibilizou os lipídios (grupo macromolecular mais abundante nas vísceras depois da água) para extração.

Tabela 8 - Composição centesimal do fígado de Beijupirá

Umidade	4,9 ± 0,1
Cinzas	2 ± 0
Proteínas	21,7 ± 0,1
Fibras	0,3 ± 0,1
Lipídios	65,9 ± 0,8
Carboidratos (por diferença)	5,0 ± 0,9

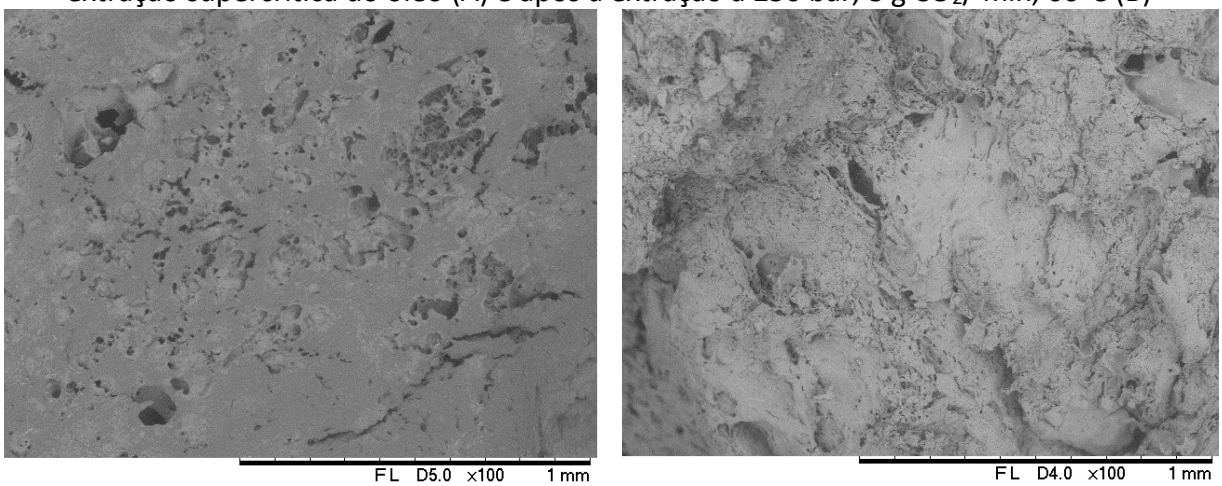
Todas as medidas estão expressas em g $\times$ 100^{-1} g amostra seca.
Fonte: Própria autoria.

A quantidade de proteínas presente nos fígados foi em torno de 21%. O CO_2 supercrítico não solubiliza proteínas, portanto, este resíduo proteico isento de lipídios após a extração pode ser aproveitado como fonte de proteína para aplicações diversas como, por exemplo, na formulação de alimentação animal e o estudo da composição em aminoácidos poderia estender a sua utilização para fins mais específicos. No trabalho de Chalamaiah et al. (2012), são listadas várias biotécnicas atualmente utilizadas para recuperar os peptídeos importantes do ponto de vista nutricional e fisiológico, tal como a hidrólise enzimática das proteínas de peixe, que resulta na produção de hidrolisados de proteína biologicamente ativos. Estudos de hidrólise proteica do fígado de pescado livre de material lipídico e sem contaminante pode ser um exemplo de aplicação para esta matéria-prima.

Outra importante observação experimental preliminar no fígado de beijupirá refere-se à variação da estrutura do material antes e após a extração com fluido supercrítico, que pode ser observada nas micrografias do fígado liofilizado. Os poros produzidos pela saída da

água durante a liofilização são evidentes (Figura 16A) e, após a extração, observa-se a aparência desuniforme do material (Figura 16B), no qual se notam os fossos formados após a passagem do CO_2 supercrítico pela amostra durante o tempo de extração o que aparenta um material extrusado.

Figura 16 - Microscopia eletrônica de varredura de fígado de beijupirá liofilizado antes da extração supercrítica do óleo (A) e após a extração a 250 bar, 8 g CO_2/ min, 60°C (B)



(A) (B)

Fonte: Própria autoria.

5.1.2 Rendimento e caracterização do óleo de fígado de beijupirá

Diferentes condições operacionais aplicadas à extração supercrítica de óleo de fígado de beijupirá resultaram em valores de rendimento distintos, como mostra a Tabela 9. Na primeira etapa do estudo das condições operacionais, as temperaturas de 50 e 60 °C obtiveram significativamente os maiores rendimentos, sendo estas as selecionadas para a segunda etapa, com diferentes vazões de CO_2 aplicadas na extração supercrítica. Considerando a qualidade dos óleos extraídos, este resultado contribui para que as amostras sejam obtidas em condições de temperaturas mais brandas.

Ao se considerar a vazão mássica do solvente, para a temperatura de 50 °C não se constatou diferença significativa, mas a 60 °C pode-se notar que as duas maiores vazões propiciaram maiores rendimentos. De acordo com Brunner (2005), dentre os fatores que podem influenciar a diferença do estado de equilíbrio entre soluto e solvente estão a quantidade de solvente e a sua contribuição no equilíbrio de fases bem como a sua seletividade, vista como a capacidade de dissolver seletivamente um ou mais compostos a

partir da matriz. Neste caso, constata-se que a maior quantidade de solvente contribuiu para o maior rendimento da extração.

Diante disso, considerou-se que a vazão mais adequada para o processo seria a de 8 g CO_2/ min, por consumir menos CO_2 para produzir um rendimento tão alto quanto a 11 g de CO_2/min. Além de produzirem óleo de fígado de beijupirá para caracterização cujos resultados estão adiante, estas análises de rendimento foram importantes para estabelecer parâmetros importantes de extração do óleo de fígado de cação-azul, relatada no item 5.2.1.

Tabela 9 - Rendimento das extrações supercríticas de óleo de fígado de beijupirá aplicando diferentes temperaturas e vazões de CO_2

Primeira etapa do estudo das condições operacionais		
V (g CO_2/ min)	T (°C)	OFB (%)
8	50	57,7 ± 2,6[a]
	60	54,3 ± 0,9[ab]
	70	49,1 ± 0,7[b]
Segunda etapa do estudo das condições operacionais		
V (g CO_2/ min)	OFB - 50°C (%)	OFB - 60°C (%)
5	39,9 ± 6,2[a]	44,5 ± 0,2[b]
8	57,7 ± 1,9[a]	54,3 ± 0,9[a]
11	43,7 ± 0,6[a]	51,9 ± 2,8[a]

P – pressão; V – vazão; T – temperatura.
Rendimentos de óleos seguidos de letras iguais não diferem estatisticamente ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.
Fonte: Própria autoria.

Em relação à extração com fluido supercrítico do óleo de beijupirá, uma discussão mais complexa se faz necessária. Pelas condições designadas para as diferentes extrações, têm-se que vários fatores podem influenciar no rendimento, como a densidades do CO_2 (as quais são diferentes em cada condição), as vazões diferentes e ainda uma matriz não homogênea com dimensões macrométricas.

O processo de extração com fluido supercrítico engloba as seguintes etapas; (*i*) a passagem do solvente supercrítico pela superfície das partículas e, em seguida, a partir da superfície das partículas para o interior das partículas por difusão, (*ii*) a dissolução do soluto com o solvente supercrítico, (*iii*) o transporte de solvente supercrítico com moléculas dissolvidas nele do interior da partícula, para a superfície da partícula e (*iv*) a passagem do solvente supercrítico com as moléculas do soluto a partir da superfície das partículas para a corrente de fluido supercrítico (RAI et al., 2014).

Embora não se tenha partículas de dimensões micrométricas neste processo, o princípio da extração é aplicado para o fígado de beijupirá, que se apresenta como uma matriz de natureza porosa. Como a amostra não foi micronizada e homogeneizada, sua heterogeneidade pode ter levado a uma variação nas médias dos rendimentos. Vale ressaltar que embora não se tenha esgotado a matriz, já que não foi extraído todo o óleo contido, ainda assim são considerados rendimentos elevados, quando se leva em consideração que é um método de extração livre de solventes orgânicos e realizado com temperaturas muito brandas, se comparado aos processos convencionais como Soxhlet, por exemplo.

A solubilidade dos solutos em fluidos supercríticos é influenciada pela temperatura e pela pressão e é geralmente, uma função da densidade do solvente. Contudo, o efeito da temperatura na solubilidade pode ser complexo se considerado outros fatores importantes que são oponentes como a pressão de vapor do soluto. O aumento da temperatura eleva a pressão de vapor do soluto e facilita sua solubilização, ao mesmo tempo em que diminui a densidade do solvente (ρCO_2 - 50°C = 834,62, ρCO_2 - 60°C = 786,99 kg/m³, ρCO_2 - 70°C 737,26 kg/m³), que por sua vez adquire menor poder de solvência, influenciando negativamente a solubilidade do soluto no sistema (MOURA et al., 2012).

Nos ensaios realizados, considerando apenas a interação *densidade x solubilidade*, já que foram empregados baixos valores de T, não foi possível identificar a influência de T na pressão de vapor do soluto. Se temperaturas mais elevadas tivessem sido aplicadas, talvez melhores rendimentos teriam sido obtidos.

5.1.3 Caracterização do óleo de fígado de beijupirá

A caracterização físico-química das amostras de óleo de beijupirá está apresentada na Tabela 10.

Os valores de índice de refração para as duas temperaturas não variaram entre os tratamentos ($p<0,05$), apresentando valores de 1,47. Os valores se assemelham aos encontrados no trabalho de Menegazzo, Petenuci e Fonseca (2014), realizado com óleos crus de tilápia do Nilo e pintado. Na pesquisa de Immanuel et al. (2009), óleos de fígado de *Sufflamen capistratus* obtidos por vários métodos também não mostraram diferenças significativas no índice de refração. Gorduras têm ângulos definidos de refração e uma

variação entre os valores indica diferenciação na composição da mistura. Este índice assegura o padrão de qualidade de óleos e gorduras já que pode indicar adulteração.

Tabela 10 - Caracterização físico-química dos óleos de fígado de beijupirá

OFB	IR (25°C)	IR (40°C)	IA[1]	IO[2]	IS[3]	IP[4]
50°C	1,47[a] ± 0	1,47[a] ± 0	13,6 ± 0,2[a]	68,9 ± 6,3[ab]	179,7 ± 18,4[a]	-
60°C	1,47[a] ± 0	1,47[a] ± 0	14,8 ± 1,5[a]	66,1 ± 5[b]	186,4 ± 10,8[a]	-
70°C	1,47[a] ± 0	1,47[a] ± 0	16,9 ± 1,9 [a]	79,0 ± 0,7[a]	186,2 ± 4,7[a]	-

Parâmetros físico-químicos dos óleos seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.
[1] Índice de acidez expresso em % de ácido oleico.
[2] Índice de iodo expresso em g I_2/100g de óleo.
[3] Índice de saponificação expresso em mg KOH/ g de óleo.
[4] Índice de peróxido expresso em meq de O_2 ativo/ Kg de óleo.
Fonte: Própria autoria.

O índice de acidez dos óleos de fígado de beijupirá variou de 13, 63 a 16,84%, um aumento numérico não significativo na percentagem de ácido oleico encontrado quando se elevou a temperatura de extração (Tabela 10). Este percentual é elevado comparando-se com outros óleos de pescados (MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014; SELMI et al., 2011) e mesmo para valores estipulados pela Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (ESFA, 2010), que recomenda valores entre 1 a 7%. O índice de iodo, ao contrário, está bem abaixo do encontrado para outros óleos, como na pesquisa de Araújo et al. (2011) onde foram encontrados valores médios de 119,23 g I_2/100g de óleo, o que indica a boa qualidade físico-química do óleo de beijupirá obtido pela técnica de extração com fluido supercrítico.

O índice de saponificação variou de 186,19 a 196,57 mg KOH/ g de óleo e não houve diferença significativa entre as amostras. Estes valores estão similares aos encontrados em outros trabalhos (MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014), característicos de óleos recém-extraídos. A mensuração deste índice é importante porque, de acordo com Gonçalves (2011), é inversamente proporcional ao peso molecular dos ácidos graxos presentes nos triacilgliceróis. O índice de peróxido para os óleos de beijupirá determinados foram menores que 0,2 meq de O_2 ativo/ Kg de óleo, abaixo do valor indicado pela ESFA para óleos de peixe crus, que seria de 3 a 20 meq de O_2 ativo/ Kg de óleo (ESFA, 2010).

Analisando todos estes parâmetros de qualidade dos óleos de fígado de beijupirá, pode-se compreender que o índice de acidez, que está mais elevado que o observado para outras matrizes, pode ser característico deste óleo, pois todos os demais estão mais baixos e em concordância com a literatura. Como o índice de acidez se refere à quantidade de ácidos

graxos livres no meio lipídico disponível para reação de hidrólise, o fato deste óleo ter um teor elevado de ácidos graxos livres faz dele um sistema passível de oxidação mais rápido que outros óleos.

A composição dos ácidos graxos foi determinada para cada condição de extração do óleo de fígado de beijupirá (Tabela 11). Os cromatogramas referentes a cada condição pode ser visualizado no anexo B deste trabalho e pode-se identificar cada pico com base no tempo de retenção relativo a cada composto presente na Tabela 11.

Os principais ácidos graxos encontrados foram ácido oleico, palmítico e linoleico. Os ácidos graxos saturados (SFA) apresentaram somas de 26 a 31 g/100g de OFB e os monoinsaturados (MUFA) compõe a classe majoritária, com valores de 41 a 49 g/100g de OFB. Nota-se que entre os diferentes óleos obtidos, a temperatura influenciou nos teores absolutos das classes de compostos presentes no óleo final obtido. A temperatura de 60 °C propiciou os menores teores de todas as frações totais analisadas e a de 70 °C, os maiores teores. Nesta maior temperatura, temos a menor densidade do CO_2SC, 738,01 kg/m^3.

Na pesquisa de Kuvendziev e colaboradores (2014), com extração supercrítica de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) de vísceras de carpa comum, foi verificada a influência dos parâmetros operacionais na produção de PUFA. Os autores afirmam que o aumento da pressão de operação tem uma influência positiva sobre o rendimento de PUFA e a temperatura operacional, em condições de baixa pressão, resulta em uma diminuição da densidade do CO_2 supercrítico e no caso deste trabalho, em uma diminuição do rendimento de PUFA. Os resultados com fígado de beijupirá não exibiram este comportamento.

Trabalhos com óleo de fígado de beijupirá são escassos, mas na pesquisa de Trushenski et al. (2012) com beijupirá jovens foi realizado o perfil de ácidos graxos de amostras de fígado de animais alimentados com peixes e com ração a base de soja. Teores similares de ácidos graxos monoinsaturados foram encontrados para os dois tratamentos em relação ao fígado de beijupirá deste estudo. A grande diferença é visualizada nos valores de ácidos graxos monoinsaturados (MUFA) e poli-insaturados, que se invertem. Para MUFA no estudo citado anteriormente, os teores chegam a 27,0% (alimentados com peixe) e 22,4% (alimentados com ração à base de soja), todos mais baixos em relação aos encontrados nesta pesquisa. PUFA apresentaram valores bem maiores, próximos a 50% (46,9 para fígados de peixes alimentados com peixes e 56,6% para peixes alimentados com ração à base de soja).

Tabela 11 - Composição de ácidos graxos (g/ 100g OFB) e teor de esqualeno em óleo de fígado de beijupirá

TR (min)	AG	Nome	OFB (50°C)	OFB (60°C)	OFB (70°C)
20,81	14:0	Ácido mirístico	2,47	1,95	2,2
22,32	15:0	Ácido pentadecanóico	0	0	0,35
23,93	16:0	Ácido palmítico	18,85	16,9	19,83
25,40	17:0	Ácido margárico	0,48	0,38	0
27,07	18:0	Ácido esteárico	8,34	7,39	8,4
		∑ SFA[1]	30,14	26,62	30,78
24,85	16:1n-7	Ác. Metil hexadec-9-enoato	1,37	1,14	1,18
25,02	16:1n−7	Ácido palmitoléico	6,86	5,84	7,22
26,51	17:1n-9	Ácido margaroléico	0,76	0,66	0,67
28,23	18:1n−9	Ácido oleico	29,11	27,93	32,81
28,32	18:1n-9t	Ácido elaídico	4,27	3,95	5,3
31,54	20:1n−9	Ácido gondóico	1,94	1,7	1,8
		∑ MUFA[2]	44,31	41,22	48,98
29,42	18:2n-6t	Ác. 6,9(E,E)-octadecadienóico	1,11	0,94	1,02
29,84	18:2n−6	Ácido linoleico	10,93	10,25	12,71
31,10	18:3n−6	Ácido γ-linolênico	1,15	1,02	1,13
33,36	20:2n-6	Ácido eicosadienóico	1,08	1,01	1,00
35,89	20:4n−6	Ácido araquidônico	1,44	1,32	1,43
34,77	20:3n-6	Ác. 7,10,13-eicosatrienóico	0,61	0,56	0,52
		∑ ω-6 PUFA[3]	16,32	15,1	17,81
31,83	18:3n−3	Ácido α-linolênico	1,65	1,48	1,73
38,29	20:5n−3	EPA[4]	1,6	1,55	1,72
42,57	22:5n−3	DPA[5]	1,23	1,26	1,25
43,68	22:6n−3	DHA[6]	2,43	2,43	2,82
		∑ ω-3 PUFA[7]	6,91	6,72	7,52
		∑ PUFA[8]	23,23	21,82	25,33
Esqualeno* (mg/ 100g OFB)			354,2±2,2[C]	417,15±13,43[B]	461,7±11,5[A]

[1] total de ácidos graxos saturados (em inglês)
[2] total de ácidos graxos monoinsaturados (em inglês)
[3] total de ácidos graxos poli-insaturados ω-6 (em inglês)
[4] ácido eicosapentanóico (em inglês)
[5] ácido docosapentaenoico (em inglês)
[6] ácido docosahexaenóico (em inglês)
[7] total de ácidos graxos poli-insaturados ω-3 (em inglês)
[8] total de ácidos graxos poli-insaturados (em inglês)
*Os cromatogramas de íons totais estão presentes no anexo B deste documento.
Para os resultados de esqualeno, letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.
Fonte: Própria autoria.

Os teores encontrados neste estudo para ácidos graxos saturados são menores que os valores reportados para óleo de tilápia e óleo de surubim (MENEGAZZO; PETENUCI; FONSECA, 2014). Todavia, para os ácidos graxos monoinsaturados, os teores no óleo do

beijupirá são bem mais expressivos. A importância biológica de alguns dos ácidos graxos encontrados neste estudo é amplamente reconhecida. Os PUFA, especialmente o ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenóico (DHA) têm inúmeros efeitos bioquímicos e farmacológicos para a saúde humana, atuando no tratamento ou prevenção de algumas doenças (WANG et al., 2012).

Os ácidos graxos ω-3 são essenciais para o crescimento e desenvolvimento normais e podem desempenhar um papel importante na prevenção e tratamento de doenças da artéria coronária, hipertensão, artrite, outras doenças inflamatórias e autoimunes e câncer (CORRÊA et al., 2008).

O teor de esqualeno foi quantificado nos óleos de fígado de beijupirá (Tabela 11) e todos diferiram entre si pelo teste de Tukey ($p<0,05$). O maior valor foi encontrado no óleo cuja extração foi realizada a 70 °C, para o valor de temperatura mais elevada. Os cromatogramas apresentados no Anexo B indicam que o método de preparo da amostra para a análise de esqualeno (cristalização fracionada) não foi devidamente eficiente para as amostras de OFB, uma vez que, além de esqualeno presente nas análises, também foram recuperados resíduos de ácidos graxos, colesterol e tocoferol (vitamina E). O aparecimento de colesterol na análise era esperado, já que se trata de moléculas similares e a presença das demais não influenciou na análise, pois o tempo de retenção do esqualeno (32,5 min) difere das demais substâncias.

No trabalho de Wejnerowska, Heinrich e Gaca (2013), que estudou as condições operacionais de extração supercrítica de esqualeno a partir de sementes de amaranto, foi constatado que processos a altas temperaturas e baixas pressões podem levar a obtenção de maiores teores de esqualeno, quando comparado a outras condições.

O esqualeno é um composto cuja principal fonte animal é o tubarão (NAVARRO-GARCIA et al., 2000). Em animais da família Squalidae, o esqualeno chega a compor até 79% do óleo, como apresentado em estudo de Wetherbee e Nichols (2000). O beijupirá, um peixe que não é da família Squalidae apresenta teores de esqualeno bem significativos a 70 °C, de 473,80 mg/ 100 g de óleo, maior que outras fontes consideradas tradicionais, como por exemplo o óleo de cação obtido por métodos convencionais de extração, como Sohxlet e Bligh-Dyer com a faixa de 28 a 40mg/ 100g de óleo (SUNARYA et al., 1996).

5.2 Análises do fígado e do óleo de cação-azul obtido por SFE

5.2.1 Composição do fígado de cação-azul e rendimento da extração supercrítica do óleo

A composição centesimal do fígado de cação-azul (Tabela 12) destaca a grande quantidade de OFCA, chegando a quase 80% em base seca e este alto percentual pode ser atribuído à baixa umidade (apenas 2%), decorrente de uma eficiente liofilização da amostra. Depois dos lipídios, as proteínas compõe o grupo majoritário.

Tabela 12 - Composição centesimal dos fígados de Cação-azul

Umidade	2,1 ± 0,6
Cinzas	1,2 ± 0,1
Proteínas	20,2 ± 0,34
Fibras	0,29 ± 0,04
Lipídios	76,20 ± 3,80
Carboidratos	Nd

Todas as medidas estão expressas em g $\times$ 100^{-1} g amostra. Nd – não determinado.
Fonte: Própria autoria.

A matriz proteica de elevado valor biológico tal como é a proteína de fígado de tubarões, após ter sido submetida à extração do óleo usando CO_2 supercrítico pode ser empregada como fonte de proteína em diferentes processos. Dentre estas, pode-se exemplificar a hidrólise enzimática destas proteínas para recuperação de compostos com atividade bioativa. A hidrólise enzimática é considerada um método conveniente para a produção de compostos que podem ser utilizados nos campos farmacêutico e nutracêutico, no qual vários hidrolisados de proteínas de peixe têm mostrado efeitos antioxidante, anti-hipertensivo, antitrombótico, antimicrobiano, entre outros (GARCÍA-MORENO et al., 2014).

Os resultados das extrações do óleo de fígado de cação-azul foram calculados utilizando duas equações (eq.(2) e eq.(3), item 4.2.2 deste trabalho). A diferença entre os resultados tratados pelo rendimento global e pelo rendimento da extração (Tabela 13) resulta da fração de óleo perdida na linha do equipamento, que é recolhida durante a despressurização do sistema e para algumas condições verificou-se que certa quantidade de óleo ficou aderido às esferas de vidro que preenchiam o leito fixo, consequentemente, nestas condições de pressões mais baixas (100 e 150 bar), o rendimento da extração foi

baixo, como nos ensaios 1 e 2 por exemplo, indicando solubilização inferior do óleo pelo CO_2 supercrítico. Nota-se que para todos os ensaios, como esperado, o RG foi superior ao rendimento da extração (RE) (Tabela 13).

Tabela 13 - Rendimentos da extração supercrítica de óleo de fígado de cação-azul (*Prionace glauca*), sob diferentes condições de P e T

Ensaio	P (bar)	T (°C)	ρCO_2 (Kg/ m³)	RG (%)	RE (%)
1	100	50	390,97	13,95 ± 2,12^{de}	0,0070 ± 0,01^{d}
2	100	60	291,55	22,30 ± 4,12^{d}	0,02 ± 0,01^{d}
3	150	50	702,30	17,15 ± 2,47^{d}	6,88 ± 0,49^{d}
4	150	60	607,22	5,22 ± 5,08^{e}	1,32 ± 0,57^{d}
5	200	50	785,91	34,00 ± 0, 93 ^{c}	22,55 ± 0,82^{c}
6	200	60	725,32	24,44 ± 2,65^{cd}	15,29 ± 1,33^{c}
7	250	50	835,32	52,14 ± 3,48^{b}	44,07± 2,83^{b}
8	250	60	787,57	49,76 ± 3,81^{b}	36,59 ± 2,32^{b}
9	300	50	871,24	71,10 ± 1,33^{a}	60,02± 1,25^{a}
10	300	60	830,41	65,47 ± 5,17^{a}	52,34 ± 6,49^{a}

Percentagens de óleos seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.
Fonte: Própria autoria.

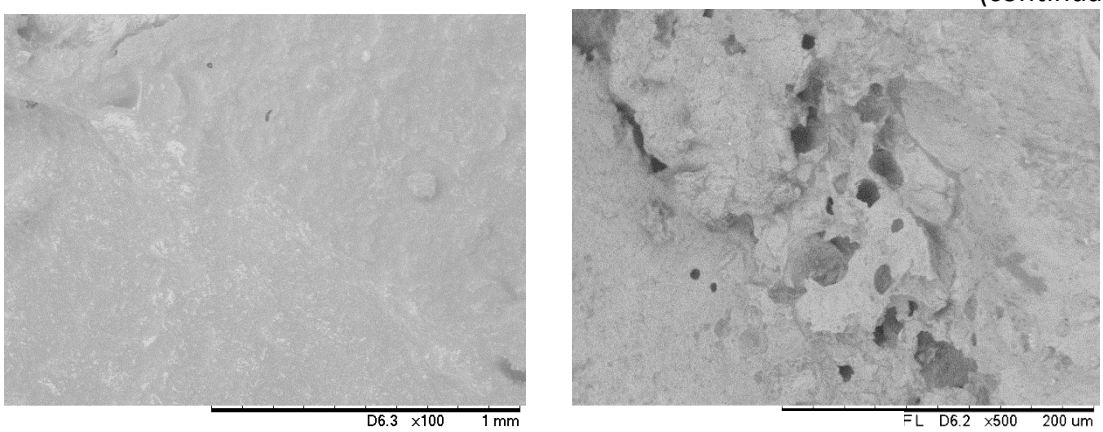
Para as diferentes condições de P e T aplicadas, tem-se valores de rendimento que variaram de 0 a 60,02% (Tabela 13). A análise estatística mostrou que rendimentos obtidos para T diferentes a uma mesma pressão foram estatisticamente iguais entre si, quando as pressões operacionais foram aumentadas os rendimentos também aumentaram. Elevadas pressões contribuem para uma maior densidade do CO_2, o que o propicia um maior poder de solvência, assim, a pressão do vapor do soluto tem influência menor na solubilização que a densidade do solvente para os dois valores de T estudados. Além disso, com o aumento da densidade, a distância entre as moléculas diminui e a interação entre o óleo e CO_2 se intensifica, levando a uma maior solubilidade do óleo no solvente supercrítico (SAHENA et al., 2010a). Adotando-se que o máximo de óleo contido nesta matéria-prima seja de 80% (Tabela 12), a SFE propiciou rendimento de 60% em sua melhor condição o que implica na extração de 75% do óleo.

A estrutura do fígado de cação-azul também foi analisada antes e após a extração supercrítica. Todas as amostras de fígado de cação-azul submetidas à SFE apresentaram modificações estruturais (Figura 17). Ainda que não se tenha correlação entre o aumento da pressão aplicada na extração com o grau de ruptura do tecido, estes fatores podem ser

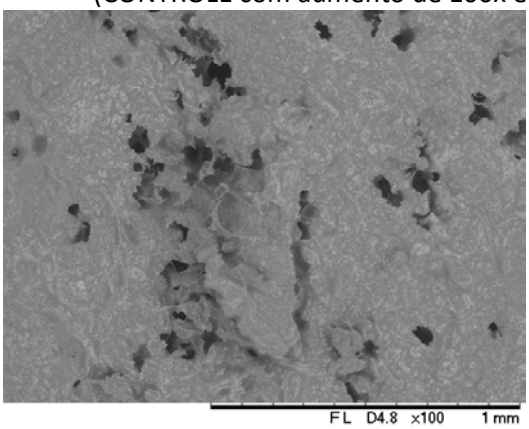
correlacionados por meio desta análise física, ou seja, quanto mais denso foi o fluido, maiores foram as modificações estruturais na matriz. No estudo de Taher et al. (2014), foi constatado que o processo de liofilização tornou a matriz (uma biomassa celular de microalgas) mais porosa e os autores afirmam que esta mudança estrutural aumenta a dissolução dos lipídios no fluido supercrítico, contribuindo para um maior rendimento na extração. Esta mesma explicação pode ser aplicada ao processo de extração do óleo de fígado de cação-azul, no qual também se verificou a formação de poros (Figura 17) com o processo de liofilização da matriz.

Figura 17 - Micrografias de amostras de fígado de cação-azul submetidas à SFE e amostra controle, sem extração

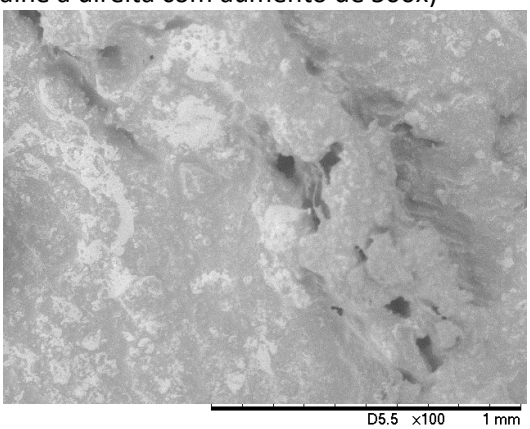
(continuação)



(CONTROLE com aumento de 100x e em detalhe à direita com aumento de 500x)



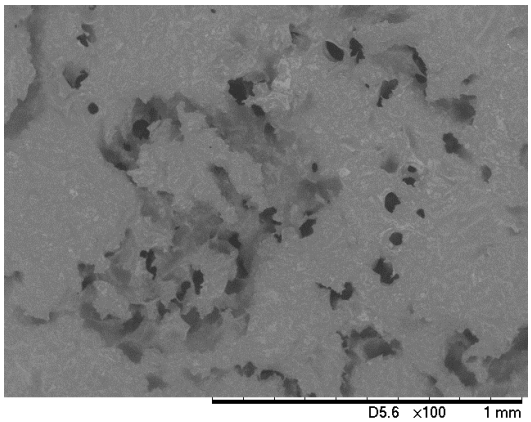
(150 bar/50°C)



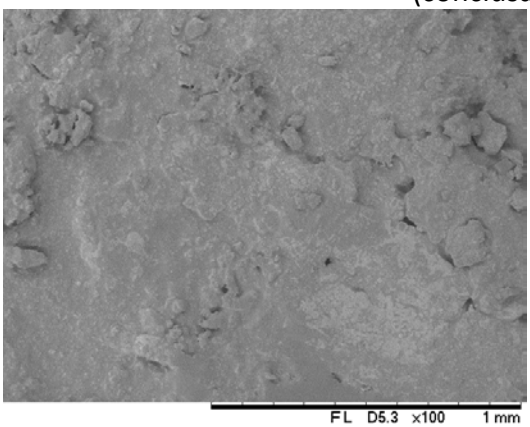
(150 bar/60°C)

Figura 17 - Micrografias de amostras de fígado de cação-azul submetidas à SFE e amostra controle, sem extração

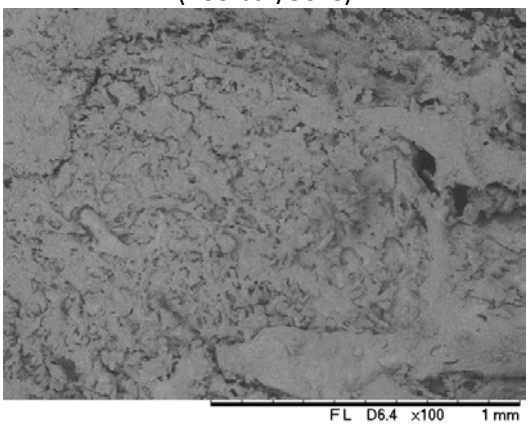
(conclusão)



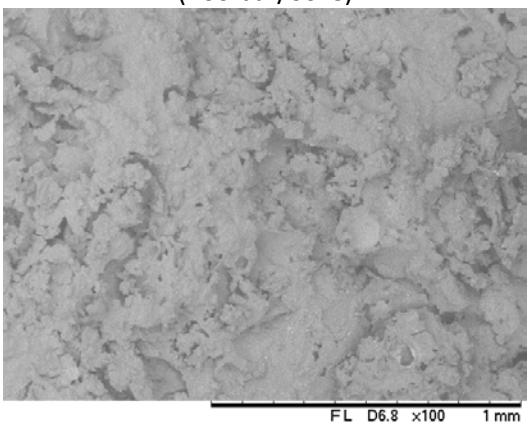
(200 bar/50°C)



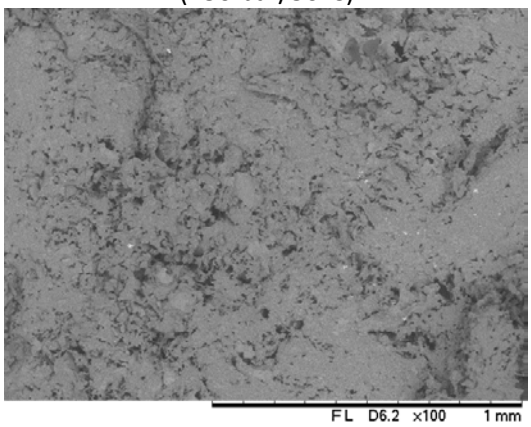
(200 bar/60°C)



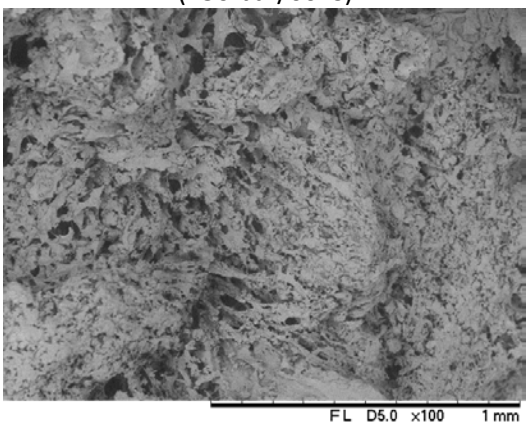
(250 bar/50°C)



(250 bar/60°C)



(300 bar/50°C)



(300 bar/60°C)

Fonte: Própria autoria.

5.2.2 Caracterização do óleo de fígado de cação-azul

A caracterização físico-química das amostras de OFCA está apresentada nas Tabelas 15 e 16. Os resultados para os diferentes óleos analisados se mostram estatisticamente próximos entre si, com exceção para os valores de índice de refração a 25 °C. Destaca-se também que a maioria dos parâmetros foi similar aos encontrados na amostra de óleo de

fígado de tubarão comercial, com exceção da viscosidade, a qual foi maior para o óleo refinado.

Mesmo assim, a extração supercrítica sem etapas posteriores de purificação gerou óleos com padrões físico-químicos semelhantes aos óleos processados industrialmente, o que torna esse processo de obtenção de óleos vantajoso, já que etapas de purificação subsequentes, ao que se indica na interpretação destes dados, talvez não sejam necessárias.

Valores de densidade e viscosidade dinâmica diminuem em relação ao aumento da temperatura, como é esperado (Tabela 14). O aumento da densidade com a temperatura ocorre devido à maior energia cinética das moléculas para maiores temperaturas, e consequentemente, ao aumento no volume da substância, resultando em uma diminuição da densidade (SCHASCHKE; FLETCHER; GLEN, 2013).

A viscosidade é uma propriedade resultante das forças de atração entre moléculas que estão relativamente próximas umas das outras. Assim, quando a energia cinética aumenta (devido ao aumento da temperatura), as moléculas tendem a permanecer menos tempo juntas, tornando as forças intermoleculares menos efetivas, diminuindo a viscosidade (CANCIAM, 2010). Além da temperatura, outros fatores alteram a viscosidade dos óleos, tais como o peso molecular dos componentes presentes, o ponto de fusão e grau de insaturação dos lipídios presentes na amostra (IGWE, 2004).

Os valores de densidade a 25 °C encontrados para o OFCA estão dentro da faixa determinada por Firestone (2006) para óleo de fígado de tubarão, entre 0,917 a 0,923 $g.mL^{-1}$ e também pela legislação brasileira que normatiza os padrões de identidade e qualidade para óleo de fígado de cação como complemento nutricional (BRASIL, 1995), a qual indica para este óleo um valor de densidade a 25 °C de 0,908 a 0,927 $g.\cdot mL^{-1}$.

Tabela 14 - Parâmetros físico-químicos do óleo de fígado de cação-azul obtidos via SFE

Ensaio	P (bar)	T (°C)	ρ^1 (25°C)	ρ^1 (40°C)	η^2 (25°C)	η^2 (40°C)	IR (25°C)	IR (40°C)
1	100	50	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
2	100	60	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
3	150	50	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
4	150	60	nd	nd	nd	Nd	nd	nd
5	200	50	0,920 ± 0,001[a]	0,910 ± 0,001[a]	56,47 ± 2,49[a]	32,25 ± 3,32[a]	1,4765 ± 0,0005[ab]	1,4715 ± 0,0005[a]
6	200	60	0,922 ± 0,003[a]	0,911 ± 0,002[a]	55,97 ± 1,25[a]	31,42 ± 0,82[a]	1,4760 ± 0[b]	1,4718 ± 0,0006[a]
7	250	50	0,921 ± 0[a]	0,910 ± 0[a]	53,47 ± 0,41[a]	29,89 ± 1,08[a]	1,4780 ± 0,0005 [ab]	1,4728 ± 0,001[a]
8	250	60	0,920 ± 0,001[a]	0,909 ± 0,001[a]	53,87 ± 0,88[a]	30,58 ± 0,44[a]	1,4775 ± 0,0013[ab]	1,4723 ± 0,0008[a]
9	300	50	0,920 ± 0,001[a]	0,910 ± 0,001[a]	52,55 ± 1,38[a]	29,17 ± 0,38[a]	1,4780 ± 0,0008[ab]	1,4728 ± 0,0013[a]
10	300	60	0,920 ± 0[a]	0,910 ± 0 [a]	52,82 ± 2,30[a]	30,21 ± 1,35[a]	1,4785 ± 0,0005[a]	1,4727 ± 0,0008[a]
	OFTC		0,908* ± 0	0,894 ± 0	91,21 ± 0	39,27 ± 0	1,4715 ± 0	1,4670 ± 0

Nd – não determinado.

[1] densidade, expressa em $g.mL^{-1}$.

[2] viscosidade, expressa em Pas.s

*Medidas de densidade e viscosidade do OFTC foram realizadas a 20°C e não a 25°C.

**IR – índice de refração, parâmetro adimensional.

Parâmetros físico-químicos de óleos seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.

Fonte: Própria autoria.

O óleo de fígado de muitos tubarões contém diversas classes de lipídios de baixa densidade, principalmente o esqualeno e os éteres de diacilgliceróis (DAGE) (MAGNUSSON; HARALDSSON, 2011). O esqualeno (densidade 0,86 g.·mL^{-1}) e DAGE (densidade 0,89 g.·mL^{-1}) fornecem substancialmente mais capacidade de flutuação do animal dentro da água por unidade de volume de triacilglicerol (TAG) (densidade 0,92 g.·mL^{-1}), que é a forma de armazenamento de lipídios mais comum na maioria dos animais (WETHERBEE, NICHOLS, 2000). Assim, se a presença destas substâncias está ligada à diminuição da densidade do óleo, esta análise física do óleo obtido por fluido supercrítico pode dar um indicativo da presença destes compostos. Esta propriedade também pode indicar adulterações físico-químicas, derivadas da mistura de óleos vegetais com óleos de origem animal, por exemplo, e assim, configura uma propriedade importante de caracterização da amostra.

Os valores experimentais do índice de refração dos óleos de fígados de cação-azul foram semelhantes aos valores encontrados na pesquisa de Batista e Nunes (1992), com exemplares de óleo de fígado de cação dente de faca (1,472), tubarão barriga de veludo (1,475) e cação português (1,472). Os índices de refração medidos para o óleo de fígado de cação-azul apresentaram um valor médio de 1,4723, semelhantes ao encontrado por Firestone (2006) para leituras a 40 °C. A Anvisa (BRASIL, 1995) estabelece uma faixa de índice de refração a 40 °C de 1,4704 a 1,4745, que também é atendida pelos OFCA obtidos via SFE.

Em relação aos índices de acidez, saponificação e peróxido, estes indicam de maneira geral qual o estado qualitativo do óleo (Tabela 15). O valor do índice de acidez mede a quantidade de ácidos graxos livres presentes na amostra. Embora estes estejam incluídos entre os compostos naturalmente presentes em pequenas quantidades nos óleos, uma vez que podem ser produtos da degradação hidrolítica de triacilgliceróis, seu valor é considerado um importante índice de qualidade para óleos (CHO; KIM; GIL, 2013).

Óleos de fígado de cação-azul obtidos via SFE apresentaram índices de acidez em ácido oleico entre 1,1 e 2,2%. Como a legislação brasileira limita o valor de acidez a 2,8% de ácido oleico para o óleo de fígado de cação (BRASIL, 1995), os diferentes óleos obtidos via SFE se encontram em acordo com a legislação vigente.

Tabela 15 - Índices de acidez, saponificação, peróxido e de iodo em amostras de óleo de fígado de cação-azul obtidos com SFE e do óleo de fígado de tubarão comercial

Ensaio	P (bar)	T (°C)	IA[1]	IS[2]	IP[3]	IO[4]
1	100	50	Nd	nd	nd	nd
2	100	60	Nd	nd	nd	nd
3	150	50	Nd	nd	nd	nd
4	150	60	Nd	nd	nd	nd
5	200	50	1,76 ± 0,00^{ab}	171,37 ± 7,72^{cd}	17,49 ± 8,11^{a}	135,47 ± 6,96^{ab}
6	200	60	2,22 ± 0,13^{a}	556,03 ± 12,09^{a}	24,04 ± 1,18^{a}	128,61 ± 2,76^{ab}
7	250	50	1,27 ± 0,15^{cd}	185,66 ± 6,33^{bc}	14,94 ± 2,89^{a}	149,21 ± 20,15^{a}
8	250	60	1,65 ± 0,25^{bc}	177,92 ± 7,33^{cd}	14,37 ± 2,16^{a}	120,05 ± 9,18^{b}
9	300	50	1,13 ± 0,08^{d}	206,54 ± 8,18^{b}	16,06 ± 2,57^{a}	128,48 ± 5,10^{ab}
10	300	60	1,60 ± 0,31^{bcd}	190,19 ± 9,07^{bc}	10,47 ± 1,15^{a}	126,89 ± 6,80^{ab}
	OFTC		0,42 ± 0,03^{e}	161,17 ± 2,16^{d}	23,97 ± 2,13^{a}	92,09 ± 1,41^{c}

Parâmetros físico-químicos de óleos seguidos de letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.
Nd – não determinado.
[1] Índice de acidez, expresso em % de ácido oleico.
[2] Índice de saponificação, expresso em mg KOH/ g de óleo.
[3] Índice de peróxido, expresso em meq de O_2 ativo/ Kg de óleo.
[4] Índice de iodo, expresso em g I_2/100g de óleo.
Fonte: Própria autoria.

Amostras de óleos de cação obtidos por outros métodos de extração (Bligh e Dyer, Soxhlet e cozimento) apresentaram índices de acidez de 4,8; 6,3 e 4,2%, respectivamente (SUNARYA et al., 1996), muito superior aos óleos de fígado de cação-azul obtidos nesta pesquisa. Mais um indicativo de que o emprego de tecnologia “clean”, como é conhecida a SFE, é vantajosa na obtenção de óleos com índices de qualidade superiores já que não emprega solventes orgânicos na extração nem elevadas temperaturas.

O índice de saponificação é definido como a quantidade de álcali necessária para saponificar os ácidos graxos em uma determinada massa de óleo (BORAN; KARAÇAM; BORAN, 2006). Firestone (2006) e a Anvisa (BRASIL, 1995) recomendam valores para índice de saponificação aceitáveis para amostras de óleo de fígado de cação entre 170 a 190 mg KOH/ g de óleo. Neste caso, além do óleo obtido na condição 6, o óleo proveniente da condição 9 (300 bar e 50 °C) também apresentou este parâmetro acima do permitido (Tabela 15).

A oxidação dos lipídios é a principal causa da sua deterioração, e os hidroperóxidos formados pela reação entre oxigênio e ácidos graxos insaturados são os produtos primários desta reação. Os hidroperóxidos não têm sabor ou odor, mas eles reagem rapidamente

formando os aldeídos, os quais têm um forte e desagradável sabor e odor (O'BRIEN, 2004). Sendo assim, como os peróxidos são instáveis, sua mensuração é limitada às fases iniciais da oxidação lipídica, já que as reações continuam a ocorrer até a fase de terminação, terceira etapa da do processo oxidativo (FERRARI, 1998).

O índice de peróxido em óleo de fígado de cação-azul variou de 10 a 24 meq O_2 ativo/kg de óleo. Como se trata de um parâmetro de qualidade envolvido no processo de oxidação lipídica, os limites aceitáveis são restritos. A Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos estipula um intervalo de 3 a 20 meq O_2 ativo/ kg de óleo cru, sem refino (ESFA, 2010). Tendo tal faixa como base, mais uma vez somente o óleo obtido na condição 6 seria considerado fora do padrão. O Codex Alimentarius é mais rigoroso, adotando um valor máximo de até 5 meq O_2 ativo/kg de óleo (FAO, 2013), considerando este limite, todos os óleos estariam em desacordo.

O índice de iodo dos óleos de cação-azul apresentou algumas diferenças significativas, todavia, todos são considerados baixos. Na pesquisa de Sunarya, Hole e Taylor (1996), os valores de índice de iodo encontrados para óleo de pescado foram de 118 a 133 g I_2/100g de óleo.

A estabilidade físico-química atribuída aos óleos obtidos via SFE frente à degradação lipídica pode ser explicada pelo próprio método. No processo de extração, a matéria-prima deve estar seca, ou seja, com baixo índice de umidade. A retirada da água, considerada uma simples etapa de preparação para a extração, decresce a velocidade das reações que acontecem dentro da matriz, inclusive aquelas relacionadas a processos oxidativos (GAVA, 2009).

A extração com fluido supercrítico (SFE) cada vez mais tem se tornado uma tecnologia interessante para a obtenção de óleo de peixe de alta qualidade a partir de sub-produtos, não só porque emprega-se temperaturas moderadas e fornece um meio livre de oxigênio, que visa reduzir a oxidação de ácidos graxos essenciais durante o processo de extração, mas também porque permite extrair compostos seletivamente, como lipídios de baixa polaridade, e ao mesmo tempo evita a co-extração de impurezas polares, tais como alguns derivados inorgânicos como metais pesados (RUBIO-RODRÍGUEZ et al., 2012). A associação da extração supercrítica a processos de separação enzimática e de membrana é considerada uma tecnologia adequada para o refino de óleo de peixe e muitos estudos seguem em busca da simplificação desse método, que se limita pelo alto custo (ESFA, 2010).

O perfil de ácidos graxos das amostras de óleo de fígado de cação-azul mostra a diversidade de metil ésteres de ácidos graxos presentes, notando-se grande diferença entre os teores de ácidos graxos quando diferentes condições operacionais de extração supercrítica foram empregadas (Tabela 16). As médias dos valores mostraram que os ácidos graxos majoritariamente presentes são ácido palmítico (C16:0) e ácido oleico (C18:1). Com amostras de cação-azul coletadas no Sudeste do Brasil, Pacheco e Barrera-Arellano (1994) também encontraram como ácidos graxos majoritários o C18:1, C16:0 e também o C22:6, o ácido docosahexaenóico, muito presente nos óleos de cação-azul neste trabalho.

O perfil de ácidos graxos do óleo de fígado de tubarão comercial, que neste trabalho serviu como referência, evidenciou menores quantidades para a maioria dos ácidos graxos quando comparado aos óleos obtidos via SFE. Vários fatores podem explicar esses reduzidos valores, a exemplo do próprio processo de refino que ao qual o óleo é submetido, que acaba por estender a *shelf life* do óleo, mas diminui a quantidade de ácidos graxos presentes. Fournier et al. (2007) relata que a etapa de desodorização do óleo de peixe, a qual envolve tratamento térmico, constitui a fase mais crítica do processo de refino. Ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa são moléculas lábeis que podem ser perdidas ao longo diferentes transformações químicas durante o tratamento térmico e estas perdas envolvem reações de ciclização, polimerização e isomerização geométrica.

Além disso, o óleo comercial adquirido para esta pesquisa tem uma grande quantidade de esqualeno presente (quase 1% de esqualeno presente no óleo, que será discutido no item 5.2.3) e também de alquilgliceróis ou éteres lipídicos (informações do fabricante), compostos cada vez mais pesquisados por seus efeitos benéficos, como efeitos antineoplásicos e estimulante do sistema imune (FERNÁNDEZ et al., 2013), os quais não são quantificados pelo método tradicional de determinação de ácidos graxos.

Na amostra de OFTC os ácidos graxos majoritários são ácido oleico e palmítico, tal como encontrado no trabalho de Firestone (2006). Mesmo com baixo índice para a maioria dos ácidos graxos analisados, observa-se também as grandes quantidades de MUFA ω-9, tais como ácido 8-eicosenóico, gondóico, erúcico e nervônico. Os cromatogramas de íons totais de cada óleo de fígado estão apresentados na Figura 18, que mostra a diversidade de ácidos graxos que estas matrizes apresentam.

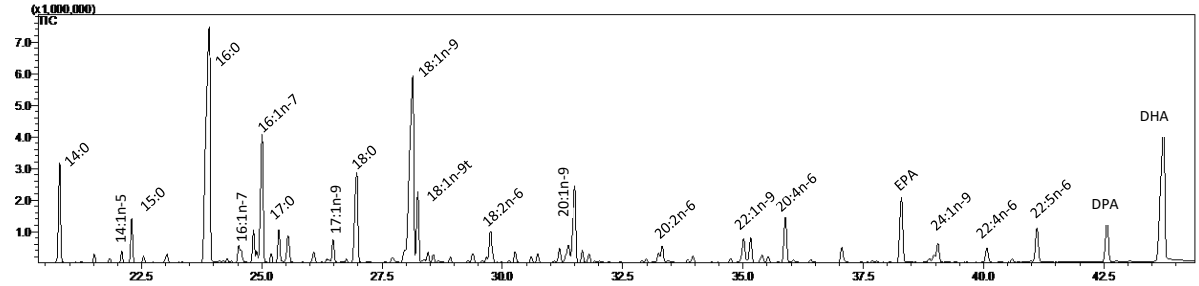
Para todos os óleos avaliados, o grupo de ácidos graxos em maior quantidade são os da classe monoinsaturados, com valores de 15,74 a 45,45 g/ 100 g de óleo. A obtenção de

óleos ricos em ácidos graxos insaturados era esperada, visto que na pesquisa de Corrêa et al (2008) com fracionamento de óleo de peixe com CO_2SC, foram determinados elevados fatores de separação para ácidos graxos de cadeia curta, que tendem a migrar para a fase mais leve, rica em CO_2 e para compostos com duplas ligações, evidenciando a afinidade do CO_2 por insaturações.

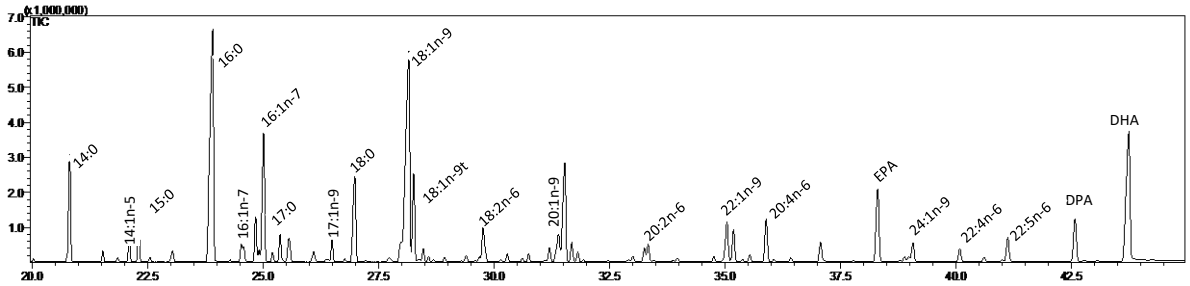
Figura 18 - Cromatogramas de íons totais do perfil de ácidos graxos dos óleos de fígado de cação-azul e óleo de tubarão comercial analisados em cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado

(continua)

TIC do OFCA obtidos por SFE a 200 bar e 50 °C.



TIC do OFCA obtidos por SFE a 200 bar e 60 °C.



TIC do OFCA obtidos por SFE a 250 bar e 50 °C.

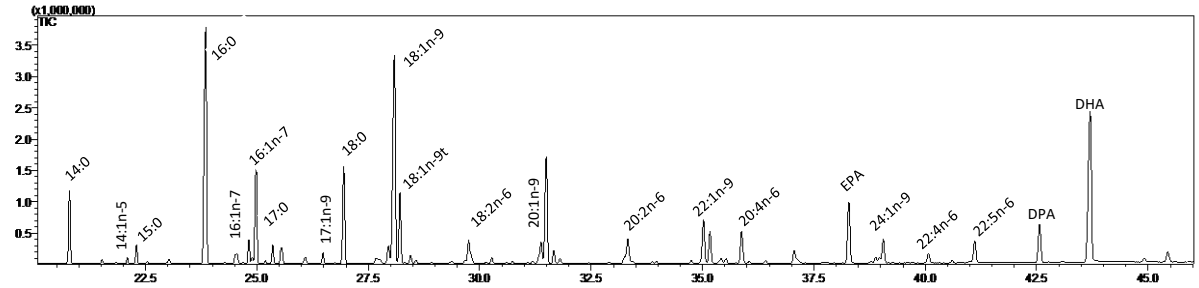
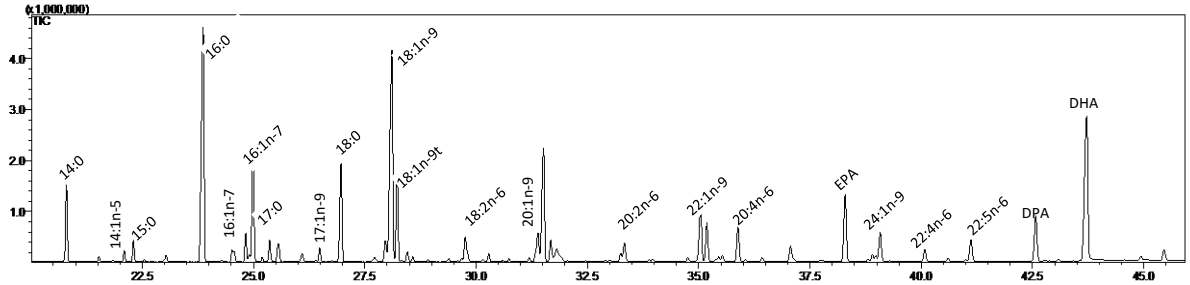


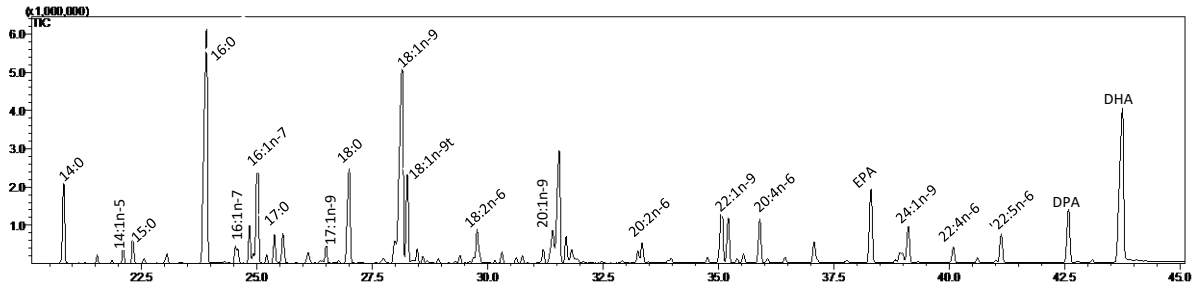
Figura 18 - Cromatogramas de íons totais do perfil de ácidos graxos dos óleos de fígado de cação-azul e óleo de tubarão comercial analisados em cromatografia gasosa com espectrômetro de massas acoplado

(conclusão)

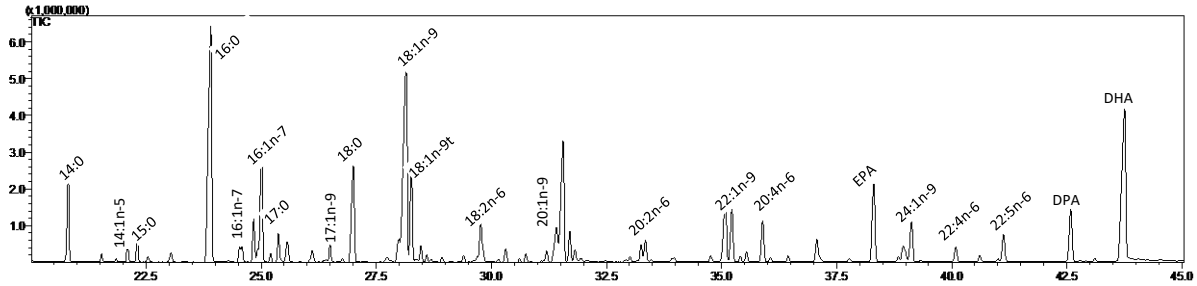
TIC do OFCA obtidos por SFE a 250 bar e 60 °C.



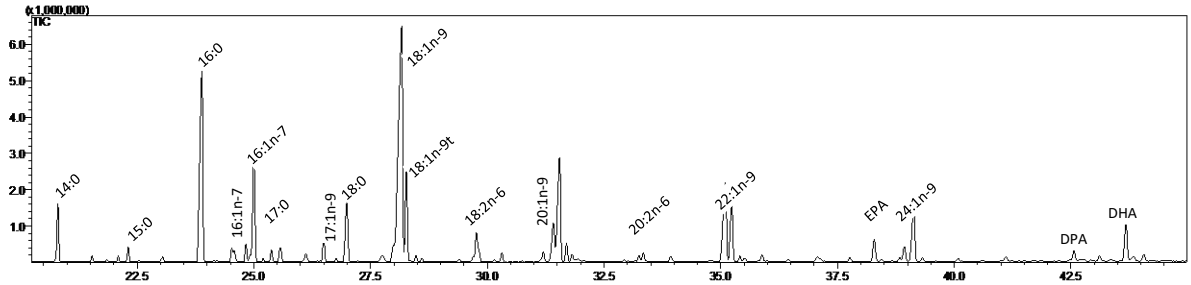
TIC do OFCA obtidos por SFE a 300 bar e 50 °C.



TIC do OFCA obtidos por SFE a 300 bar e 60 °C.



TIC do OFTC.



Fonte: Própria autoria.

Os ácidos graxos insaturados são componentes importantes de fosfolipídios da membrana celular com concentrações mais elevadas no sistema nervoso central e fisiologicamente, esses ácidos graxos são essenciais para o desenvolvimento saudável do

cérebro e são de grande importância para a manutenção da homeostase corporal (NEMETH et al., 2014).

Os ácidos graxos poli-insaturados ômegas 3 e 6 também apresentaram valores significativos para a maioria dos óleos de cação-azul. Ainda assim, destaca-se para todos os óleos os elevados índices de DHA (ácido docosahexaenóico), que juntamente com o EPA (ácido eicosapentaenoico) possuem reconhecida ação de prevenção à aterosclerose, redução da pressão e dos níveis de triglicérides (GARCÍA et al., 2006). Shapiro et al. (2013) ainda acrescenta efeitos como atenuação de diferentes tipos de dor, diminuição da mortalidade de pós infarto miocárdio, inibição de moléculas pro-inflamatórias, dentre outros.

Os níveis dos ácidos α-linolênico e γ-linolênico estão muito baixos nas amostras de óleos analisados (Tabela 16), menos de 0,5% da área total dos picos de todos os cromatogramas dos óleos (valores não apresentados). Na pesquisa de Jayasinghe, Gotoh e Wada (2012) com óleos de fígado cação-azul, os valores encontrados para estes ácidos graxos também foram muito baixos e com óleos de cação pescados no Atlântico e no Pacífico também foram encontrados estes níveis (KANG; TIMMINS; ACKMAN, 1998).

Tabela 16 - Perfil de ácidos graxos (g/ 100g óleo de fígado de peixe) de óleo de fígado de cação-azul e de tubarão comercial

(continua)

TR (min)	AG	Nome	200 bar/ 50 °C	200 bar/ 60 °C	250 bar/ 50 °C	250 bar/ 60 °C	300 bar/ 50 °C	300 bar/ 60 °C	OFTC
20,79	14:0	Ácido mirístico	5,18^{a} ±0,99	4,89^{a} ±0,25	1,34^{b} ±0,11	2,78^{b} ±0,04	2,93^{b} ±0,60	2,03^{b}± 0,10	1,56^{b} ±0,06
22,29	15:0	Ácido pentadecanóico	2,10^{a} ±0,42	1,58^{ab}±0,22	0,37^{c} ± 0	0,75^{bc} ±0,03	0,90^{bc} ±0,19	0,31^{c} ± 0,43	0,35^{c} ± 0,05
23,90	16:0	Ácido palmítico	25,67^{a}±4,09	19,42^{a}±1,10	6,70^{c} ± 0,25	13,31^{b}±0,21	13,78^{bc}±1,74	9,57^{c} ± 0,57	10,09^{c}±1,56
25,35	17:0	Ácido margárico	1,77^{a} ± 0,30	1,17^{b} ± 0,07	0,38^{cd} ± 0	0,76^{bcd} ± 0	0,91^{bc} ±0,12	0,56^{cd} ±0,14	0,31^{d} ± 0
26,97	18:0	Ácido esteárico	7,37^{a} ± 1,02	5,83^{ab} ±0,52	2,33^{e} ± 0,13	4,69^{bcd}±0,06	4,93^{bc}± 0,36	3,32^{cde}±0,17	2,79^{de} ±0,49
		∑ SFA[1]	42,09	32,88	11,12	22,29	23,43	15,78	15,09
22,09	14:1n-5	Ácido miristoléico	Nq	1,16 ± 0,06	Nq	Nq	Nq	Nq	Nq
24,51	16:1n-7	Ácido Metil hexadec-9-enoato	2,89^{ab} ±0,21	3,46^{a} ± 0,26	0,67^{c} ± 0,26	1,04^{b} ± 0,01	1,73^{abc}±1,02	1,10^{b} ± 0,87	0,80^{b} ± 0,24
25,00	16:1n-7	Ácido palmitoléico	8,96^{a} ± 1,17	7,60^{a} ± 0,44	2,39^{c} ± 0,25	5,07^{b} ± 0,16	5,20^{b} ± 0,66	3,70^{bc} ±0,28	4,57^{bc} ±0,49
26,47	17:1n-9	Ácido margaroléico	1,15^{a} ± 0,18	0,87^{ab} ±0,09	Nq	0,45^{ab} ±0,04	0,25^{b} ± 0,35	Nq	0,68^{ab} ±0,06
28,13	18:1n-9	Ácido oleico	19,99^{a}±3,06	18,94^{ab}±0,83	6,34^{d} ± 0,32	13,20^{bc}±0,24	13,32^{bc}±1,17	9,36^{cd} ±0,16	17,02^{ab}±2,76
28,24	18:1n-9t	Ácido elaídico	2,68^{a} ± 2,66	4,94^{a} ± 0,45	1,57^{a} ± 0,12	3,54^{a} ± 0,06	1,10^{a} ± 0,11	1,73^{a} ± 1,34	0,79^{a} ± 0,18
31,37	20:1n-9	Ácido 8-eicosenóico	Nq	Nq	0,31^{c} ± 0,03	0,79^{bc} ±0,06	0,97^{b} ± 0,08	0,64^{bc} ±0,14	1,84^{a} ± 0,28
31,49	20:1n-9	Ácido Gondóico	4,14^{a} ± 2,53	6,27^{a} ± 0,57	2,71^{a} ± 0,23	5,89^{a} ± 0,04	6,06^{a} ± 0,08	4,41^{a} ± 0,16	6,13^{a} ± 1,74
35,01	22:1n-9	Ácido erúcico	1,42^{b} ± 0,10	2,23^{b} ± 0,36	1,21^{b} ± 0,04	2,79^{ab} ±0,11	3,14^{ab} ±0,01	2,09^{b} ± 0,15	5,35^{a} ± 1,70
39,01	24:1n-9	Ácido nervônico	0,91^{b}± 0,08	Nq	0,57^{b}± 0,03	1,29^{b} ± 0,11	1,73^{ab} ±0,11	1,12^{b} ± 0,13	3,10^{a} ± 0,98
		∑ MUFA[2]	42,16	45,45	15,74	34,05	33,48	24,13	40,26
29,75	18:2n-6	Ácido linoleico	3,02^{a} ± 1,05	1,90^{ab} ±0,08	0,70^{b} ± 0,03	1,23^{b} ± 0,08	1,43^{ab} ±0,08	1,01^{b} ± 0,21	1,01^{b} ± 0,14
33,32	20:2n-6	Ácido eicosadienóico	3,05^{a} ± 2,98	Nq	0,57^{a} ± 0,07	0,61^{a} ± 0,07	0,30^{a} ± 0,42	0,31^{a} ± 0,44	Nq
35,89	20:4n-6	Ácido araquidônico	3,21^{a} ± 0,39	2,43^{ab} ±0,21	0,84^{d} ± 0,06	1,70^{bc} ±0,04	1,86^{bc} ±0,17	1,12^{cd} ±0,08	Nq
40,06	22:4n-6	Ácido adrênico	0,88 ± 0,17	Nq	Nq	Nq	Nq	Nq	Nq

Tabela 17 - Perfil de ácidos graxos (g/ 100g óleo de fígado de peixe) de óleo de fígado de cação-azul e de tubarão comercial

(conclusão)

41,11	22:5n-6	Ácido docosapentaenoico	2,48^{a} ± 0,36	1,25^{b} ± 0,13	0,86^{b}± 0,37	0,97^{b} ± 0,09	1,23^{b} ± 0,10	0,72^{b}± 0,08	Nq
	∑ ω-6 PUFA[3]		12,63	5,57	2,97	4,51	4,82	3,15	1,01
38,29	20:5n-3	EPA[4]	5,22^{a} ± 0,56	4,71^{ab} ±0,25	1,22^{de} ±0,83	3,44^{bc} ±0,15	3,62^{abc}±0,49	2,77^{cd} ±0,01	0,86^{e} ± 0,05
42,56	22:5n-3	DPA[5]	3,06^{a} ± 0,45	2,69^{a} ± 0,23	2,97^{a} ± 2,54	2,43^{a} ± 0,02	2,73^{a} ± 0,22	1,73^{a} ± 0,06	0,35^{a} ± 0,06
43,74	22:6n-3	DHA[6]	14,76^{a}±1,62	11,21^{ab}±0,80	3,05^{c} ± 3,75	9,90^{ab} ±0,26	10,88^{ab}±0,79	7,48^{bc} ±0,20	1,72^{c} ± 0,24
	∑ ω-3 PUFA[7]		23,04	18,60	7,23	15,76	17,22	11,98	2,93
	∑ PUFA[8]		35,66	24,17	10,20	20,26	22,04	15,13	3,94

Quantidades encontradas de ácidos graxos para os diferentes óleos analisados na mesma linha não diferem estatisticamente ao nível de 95% de significância pelo teste de Tukey.

[1] total de ácidos graxos saturados (em inglês).

[2] total de ácidos graxos monoinsaturados (em inglês).

[3] total de ácidos graxos poli-insaturados ω-6 (em inglês).

[4] ácido eicosapentanóico (em inglês).

[5] ácido docosapentaenóico (em inglês).

[6] ácido docosahexaenóico (em inglês).

[7] total de ácidos graxos poli-insaturados ω-3 (em inglês).

[8] total de ácidos graxos poli-insaturados (em inglês).

Nq – não quantificado. Devido à diversidade de ácidos graxos presentes nas amostras analisadas, padronizou-se quantificar apenas os que continham mais de 0,5% em área, em relação ao cromatograma de íons totais.

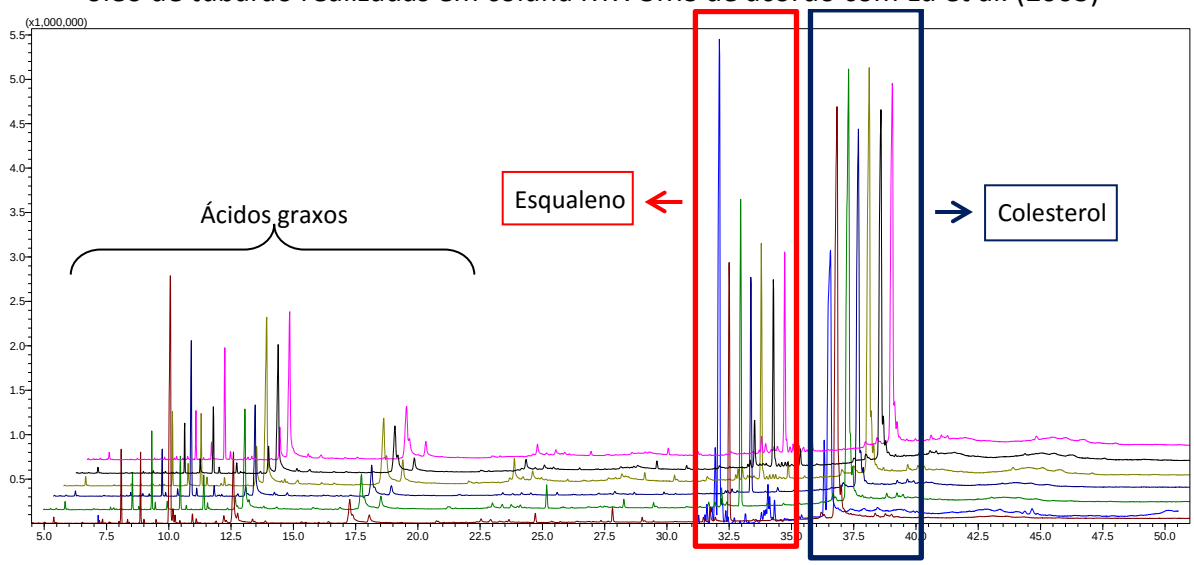
Fonte: Própria autoria.

5.2.3 Teores de esqualeno e vitamina A no óleo de fígado de cação-azul

O óleo de fígado de cação-azul contém esqualeno. O cromatograma de íons totais (Figura 19) apresenta vários picos, sendo os primeiros identificados como ácidos graxos (até 20 min de corrida) e em 32 min tem-se o pico de esqualeno. Logo após, inclusive o maior pico, é reconhecido nas bibliotecas NIST e NIST 08S como sendo o colesterol, uma molécula que apresenta similaridade estrutural com o esqualeno. A metodologia de extração do esqualeno é a cristalização fracionada, método no qual a amostra de óleo é colocada em contato com uma proporção definida de metanol: acetona.

Na análise de esqualeno, houve a cristalização dos triacilgliceróis e outros componentes lipossolúveis e saponificáveis, restando o esqualeno e compostos similares que foram solubilizados na fração solvente e constituíram a fração analítica. Como se trata de substâncias com tempos de retenção bem distintos, elas não prejudicaram a análise.

Figura 19 - Cromatogramas de íons totais da determinação de esqualeno nas amostras de óleo de tubarão realizadas em coluna RTX-5MS de acordo com Lu et al. (2003)



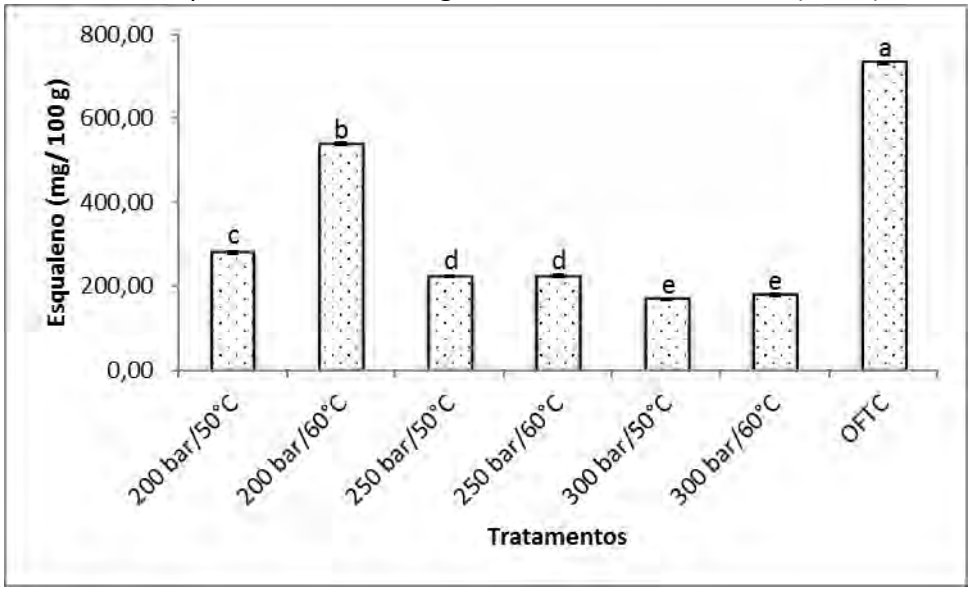
OFTC ( ), 200 bar/ 50 °C ( ), 200 bar/ 60 °C ( ), 250 bar/ 50 °C ( ), 250 bar/ 60 °C ( ), 300 bar/ 50 °C ( ), 300 bar/ 60°C ( )

Fonte: Própria autoria.

Os teores de esqualeno variaram significativamente ente si, quando condições operacionais distintas foram aplicadas na extração supercrítica do óleo de fígado de cação-azul (Figura 20). O óleo de fígado de tubarão comercial apresentou o maior teor de esqualeno, 730,91 mg/100 g de óleo. Entre os óleos de fígado de cação-azul obtidos com

CO_2SC, os melhores resultados foram para as condições de menor pressão aplicadas, sendo o maior resultado encontrado na condição 200 bar/ 60 °C, de 536,99 mg/100 g de óleo. Esta condição de extração foi escolhida para a obtenção do óleo utilizado no processo de microencapsulação.

Figura 20 - Teores de esqualeno (mg/ 100g de amostra) em óleos de fígado de cação-azul obtidos por SFE e óleo de fígado de tubarão comercial (OFTC)

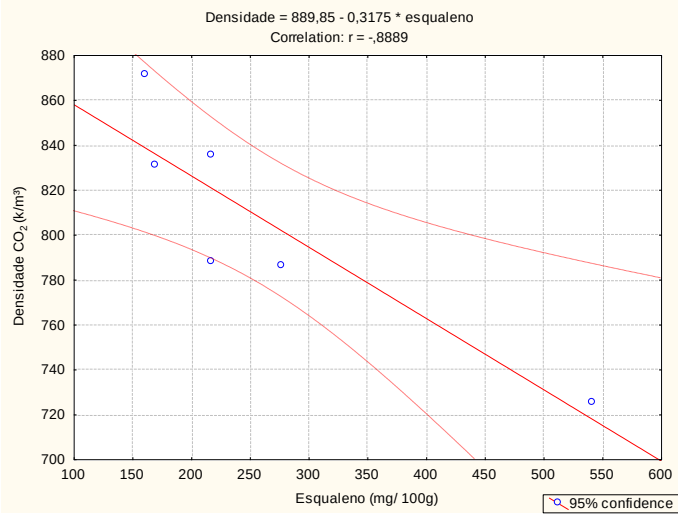


Colunas dos valores de esqualeno com mesmas letras são iguais ao nível de 0,05% do limite de confiança (teste Tukey).
Fonte: Própria autoria.

A correlação realizada entre o teor de esqualeno e a densidade de CO_2 aplicada ao processo de extração com um coeficiente -0,88 ($p<0,05$, Figura 21) indica que os maiores teores de esqualeno foram encontrados quando densidades mais baixas foram aplicadas na extração supercrítica do óleo. Esta relação também foi visualizada no óleo de fígado de beijupirá (Tabela 12, item 5.1.3).

O comportamento contrário foi obtido na pesquisa de Martinez-Correa et al. (2010), no estudo da solubilidade de esqualeno puro em CO_2SC. Vale lembrar que, enquanto estes autores estudaram a solubilidade de um composto puro, nesta pesquisa obteve-se esqualeno a partir de uma amostra complexa, com triacilgliceróis, vitaminas lipossolúveis e demais componentes que competem pela solubilização e, portanto, podem interferir na forma como este único composto é solubilizado pelo CO_2SC.

Figura 21 - Correlação entre teor de esqualeno e densidade do CO_2 aplicado na SFE dos óleos de fígado de cação-azul



Fonte: Própria autoria.

As maiores fontes de esqualeno são os tubarões da família *Squalidae*, nos quais a presença do composto é considerável, que os resultados expressos nos trabalhos acadêmicos são apresentados em percentagem em relação ao óleo total. A exemplo da pesquisa de Hernández-Pérez, Gallego e Carlos (2002), com amostras de fígados de tubarões de alto mar, onde foram verificados valores de até 50,5% de esqualeno no óleo. Na pesquisa de Bakes e Nichols (1995), a presença de esqualeno nos óleos de diversos tubarões analisados chegou a cerca de 82% (para a espécie *Centrophorus scalpratus*). Já para uma pesquisa utilizando a mesma espécie deste estudo, *Prionace glauca*, não foi encontrado esqualeno em seu óleo (BALLANTYNE, 1997).

Atualmente a maioria destas espécies detentoras de grande quantidade de esqualeno está ameaçada de extinção. Mais uma vez esta pesquisa se mostra relevante, pois apresenta dados de uma espécie de cação cuja população não está ameaçada e sua carne está sendo intensamente beneficiada. Os resíduos deste beneficiamento, até onde se sabe, não são aproveitados e nota-se pelo valor nutricional e de componentes bioativos, a grande perda de uma fonte de óleo de pescado que é desperdiçada.

A presença de esqualeno em óleos de fígados de tubarão é muito variada, podendo não estar presente em algumas espécies ou sob determinadas condições, ou podem atingir níveis de até 95% no óleo. Tubarões de águas profundas usam o alto teor de esqualeno em seus fígados para fins de flutuabilidade. O coeficiente de expansão térmica do esqualeno

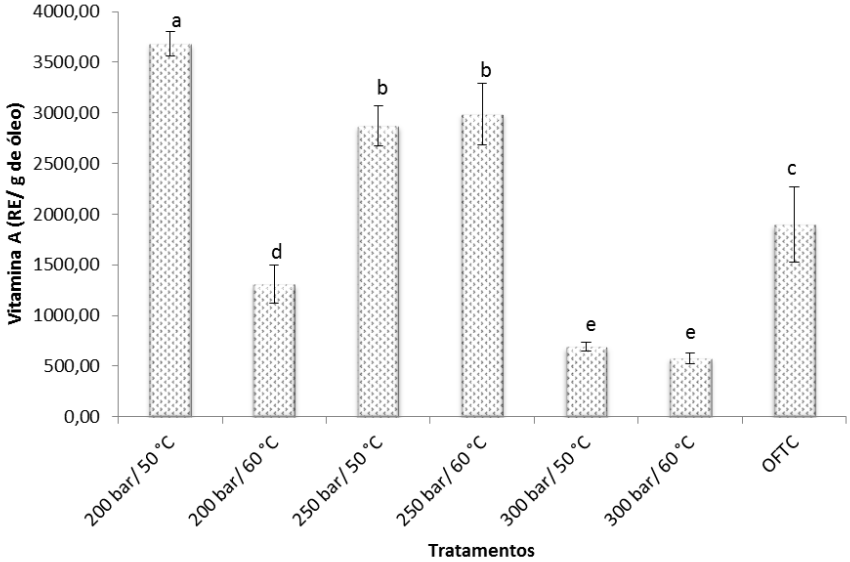
permite um fácil ajuste do peso específico do tubarão com a temperatura real da água associada à profundidade em que o animal se encontra (PIETSCH, JAEGER, 2007).

A análise de vitamina A mostrou que as diversas condições operacionais de extração propiciaram quantidades significativamente diferentes de vitamina A, expressos em retinol equivalente (RE), que corresponde a 1 micrograma de retinol equivalente por mL de amostra (Figura 22). Os índices de RE entre os diversos óleos variaram de 578,98 a 3.682,01 RE/g óleo, valores considerados muito elevados. Na amostra de óleo de fígado de tubarão comercial o teor encontrado foi de 1.899,35 RE/g óleo. Neste caso, pode-se atribuir estes resultados ao processo de refino ao qual o óleo comercial é submetido.

No óleo de fígado de cação-azul extraído a frio, foi encontrado um valor de 489 RE/g óleo, bem abaixo dos resultados desta pesquisa (PACHECO; BARRERA-ARELLANO, 1994). A correlação entre a densidade de CO_2 e a quantidade de vitamina A nos óleos foi não significativa (95% do limite de confiança), apontando que outros fatores mais relevantes influenciam o rendimento de retinol.

FAO estipula que o valor mínimo de vitamina A que óleos de pescados devem conter é de 40 RE/ mL de óleo, dessa forma, pode-se analisar que mesmo os OFCA obtidos via SFE com os mais baixos valores possuem grandes quantidades de vitamina A. De acordo com a resolução RDC n° 269/2005, que trata sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteínas, vitaminas e minerais da ANVISA, a IDR de vitamina A para adultos é de 600 RE (BRASIL, 2005). Sendo assim, 1g de OFCA ou supre a demanda diária (condições 300 bar/ 50 °C e 300 bar/ 60 °C) ou causa hipervitaminose no indivíduo que a consumir (demais condições de extração).

Figura 22 - Vitamina A (expressa em retinol equivalente) no óleo de fígado de cação-azul obtidos por SFE sob diferentes condições e no OFTC



Colunas dos valores de vitamina A com mesmas letras são iguais ao nível de 0,05% do limite de confiança (teste Tukey).
Fonte: Própria autoria.

Estudos de solubilidade de vitaminas em CO_2SC foram realizados por Johannsen e Brunner (1997) com as vitaminas A, D, E e K. Neste trabalho, foi verificada a influência da temperatura e da densidade sobre a solubilidade destes componentes, de modo que a temperatura constante, as solubilidades de todas as substâncias aumentaram com o aumento da densidade. Este comportamento não foi observado na extração de vitamina A a partir do óleo de fígado de cação-azul.

No entanto, Turner, King e Mathiasson (2001) afirmam que a solubilidade de compostos puros algumas vezes não pode ser integralmente aplicada para amostras complexas, como é o caso do óleo de cação-azul. Em produtos alimentares, vitaminas lipossolúveis são encontradas no mesmo sistema que triacilgliceróis e esteróis, que podem, em alguns casos, funcionarem como modificadores da polaridade do CO_2SC e levarem a condições diferenciadas de extração. Outro fato importante é que os triacilgliceróis são facilmente solubilizados pelo CO_2SC e por isso competem com outros componentes presentes na matriz.

5.3 Caracterização das micropartículas de óleo de fígado de cação-azul obtidas pela técnica PGSS

Este trabalho estudou a formação de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul utilizando amidos modificados como materiais poliméricos de impregnação, HI CAP® 100 e a Purity Gum Ultra®. O amido modificado é considerado um bom material para microencapsulação por ser abundante, barato, possuir sabor agradável e oferecer uma boa proteção contra a oxidação dos agentes de sabor (SPADA et al, 2013). Tanto o Hi Cap® 100 quanto a Purity Gum Ultra® são amidos modificados por meio da esterificação entre amido e ácido octenil succínico anidro sob condições alcalinas, sendo chamado de amido OSA. Esta modificação é aprovada pela FDA e este ingrediente tem sido usado com sucesso para encapsulação e para emulsões aplicadas em bebidas (XIE et al., 2010). A diferença entre os polímeros usados neste trabalho refere-se ao grau de hidrofobicidade, que é maior para a Purity Gum Ultra®.

Os amidos nativos têm, geralmente, solubilidade limitada em água e por isso têm aplicações industriais restritas, o que motivam os processos de modificação destes, a exemplo da adição de grupos quimicamente substituídos, tais como o acetato ou anidrido octenil succínico (grupo OSA). Estes substituintes covalentemente ligados geralmente reagem com qualquer fração hidroxila de glicose acessível e dessa forma, o amido, normalmente hidrofílico, ganha um elemento hidrofóbico, resultando em moléculas com um carácter anfifílico. Polímeros anfifílicos têm uma ampla variedade de aplicações, particularmente em emulsificação, encapsulação, películas e revestimentos e na produção de géis (SWEEDMAN et al., 2013).

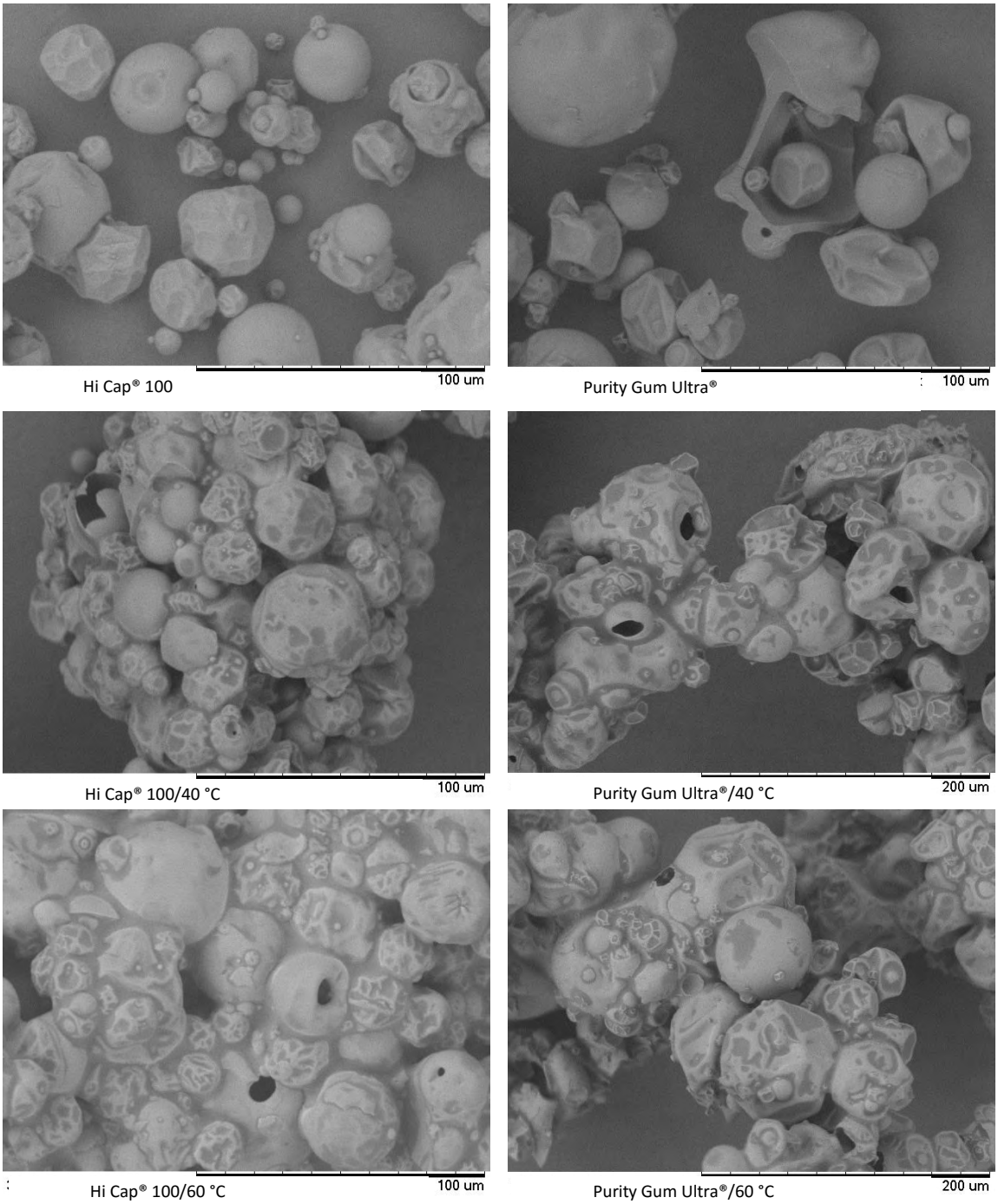
5.3.1 Parâmetros morfológicos e dimensionais

As micrografias das micropartículas (Figura 23) realizadas por microscopia eletrônica de varredura mostram que estas possuem uma superfície irregular e similar aos polímeros sem tratamento, com algumas partículas rompidas. O processo de mistura dos materiais com o CO_2 durante 40 min ocorre sobre intensa rotação, o que pode justificar o rompimento de algumas micropartículas. Na pesquisa realizada por Krishnan, Kshirsagar e Singhal (2005), no qual foram encapsuladas oleoresina de cardamomo utilizando a técnica spray drying, foi

observado que as partículas com amidos modificados apresentaram as mesmas fissuras. O aspecto enrugado é o mesmo verificado no trabalho de Drusch et al. (2007).

Figura 23 - Micrografias de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul em obtidas com a técnica PGSS, em diferentes tratamentos

Hi Cap® 100 | Purity Gum Ultra®



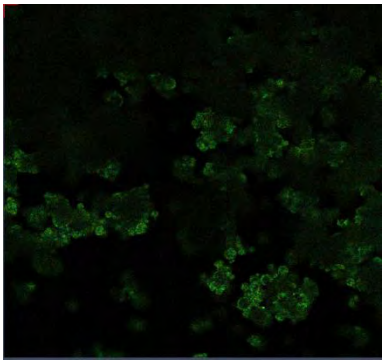
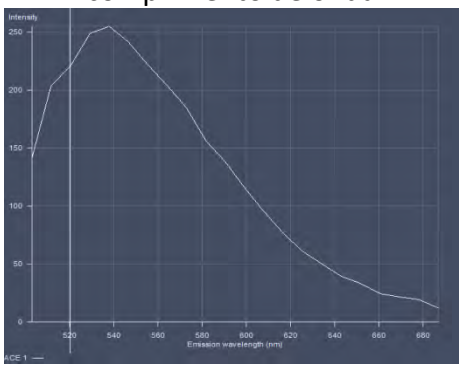
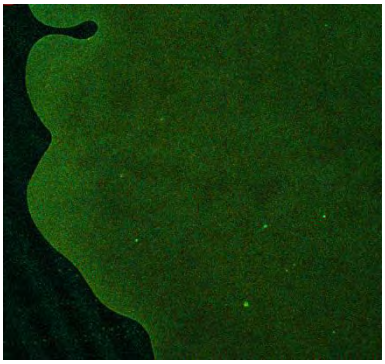
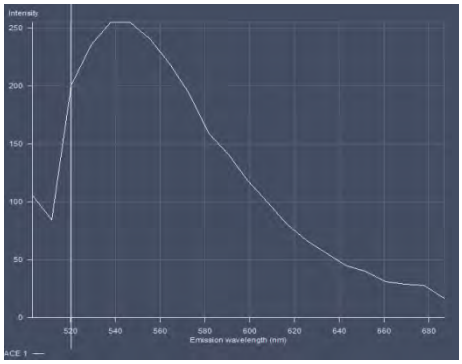
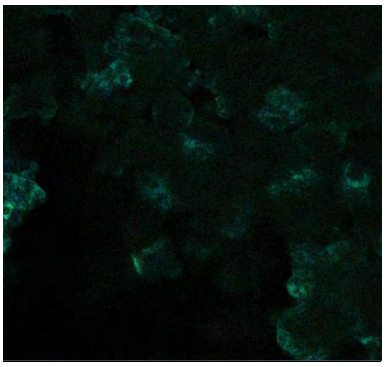
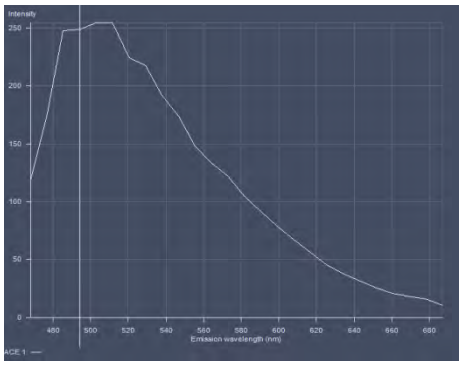
Fonte: Própria autoria.

Outro ponto que pode ser observado é a aglomeração de grânulos de amido nas micrografias após tratamento com CO_2 supercrítico, tal como ocorreu na impregnação de óleo de lavandin estudada por Varona et al. (2011) e limoneno por este grupo de pesquisa (MACHADO et al., 2016).

A microscopia confocal de varredura a laser permite ter uma visualização não-destrutiva através da parede das microcápsulas e ao utilizar diferentes marcadores fluorescentes, compostos marcados podem ser identificados sem ambiguidades (LAMPRECHT; SCHÄFER; LEHR, 2000). Todavia, para isso, é necessário fazer um estudo prévio dos materiais individualmente. Os materiais, separadamente, foram testados quanto à sua capacidade de emissão do comprimento de onda a partir de determinado comprimento de onda emitido na amostra. Os gráficos de emissão do laser a 488 nm (Figura 24) mostram que os polímeros utilizados na formação das partículas, Hi Cap 100® e Purity Gum Ultra® emitem comprimentos de onda do laser no mesmo espectro que o material de núcleo deste trabalho, o óleo de fígado de cação-azul, o qual se apresenta levemente mais intenso e com outros comprimentos de onda do lasers foram observados comportamento semelhante (a 405, 514 e 561 nm, dados não mostrados).

Estes resultados preliminares mostram a necessidade de uso de um fluoróforo, substância que quando adicionada a outra, a torna fluorescente. Desse modo, micropartículas de óleo de fígado de cação-azul foram processadas com corante lipofílico Nile red e analisadas em microscopia confocal (Figura 25).

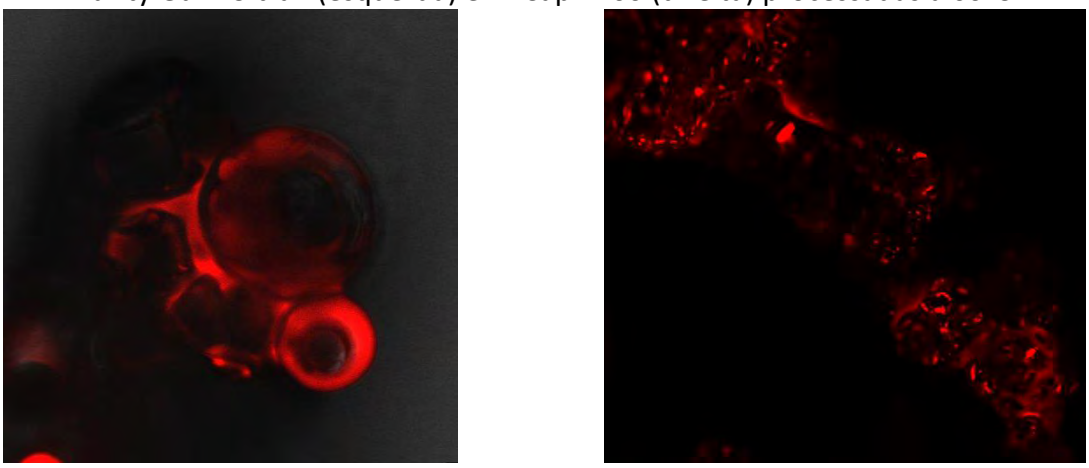
Figura 24 - Estudo dos componentes individuais utilizando a microscopia confocal. Imagem dos polímeros e OFCA (esquerda) e gráfico de emissão de comprimento de onda (direita)

	Imagem do componente	Gráfico de emissão do comprimento de onda
Hi Cap® 100		
OFCA		
Purity Gum Ultra		

Emissão do laser para a resposta do gráfico: 488 nm.
Fonte: Própria autoria.

Nas imagens, a mesma agregação do polímero visualizada nas micrografias via MEV são vistas, porém o óleo corado em vermelho apresenta-se aparentemente fora das micropartículas, no espaço interfacial circundando os grânulos de amido, similar às imagens apresentadas na pesquisa de Comin, Temelli e Saldaña (2012), com a impregnação de óleo de linhaça em amido de milho pré-gelatinizado em meio supercrítico.

Figura 25 - Micrografia confocal da micropartícula de óleo de fígado de cação-azul com Purity Gum Ultra® (esquerda) e Hi Cap® 100 (direita) processadas a 60°C



Fonte: Própria autoria.

O diâmetro médio de partículas foi determinado para as micropartículas de óleo de fígado de cação-azul (Tabela 17). De maneira geral, as micropartículas tiveram seu diâmetro diminuído após o processo PGSS. A redução do diâmetro foi em torno de 94% para o Hi Cap® 100/60 °C e em relação ao Hi Cap® 100/40 °C, houve uma diminuição do diâmetro das partículas em 95% em relação ao polímero puro. Nos processos nos quais se empregou Purity Gum Ultra®, também foram verificadas diminuições do diâmetro médio, de 96% para o tratamento Purity Gum Ultra®/40 °C e de 89% para o Purity Gum Ultra®/60 °C. Os valores dimensionais destas partículas são bem menores que os encontrados na literatura. Varona e colaboradores (2011) produziram micropartículas impregnadas de óleo essencial de lavandin em amido modificado por meio da técnica PGSS apresentaram diâmetro médio de 50 µm.

Tabela 17 - Diâmetro médio das micropartículas de óleo de fígado de cação-azul e seus respectivos polímeros

Tratamento	Diâmetro Médio de Partícula (µm)
Hi Cap® 100/40 °C	1,92 ± 0,17
Hi Cap® 100/60 °C	2,75 ± 0,23
Hi Cap® 100	44,51 ± 0,14
Purity Gum Ultra®/40 °C	2,94 ± 0,17
Purity Gum Ultra®/60 °C	8,45 ± 0,23
Purity Gum Ultra®	76,50 ± 0,09

Fonte: Própria autoria.

Analisando os valores de diâmetro médio de partícula com as micrografias realizadas por microscopia eletrônica de varredura, basicamente observa-se que as micropartículas

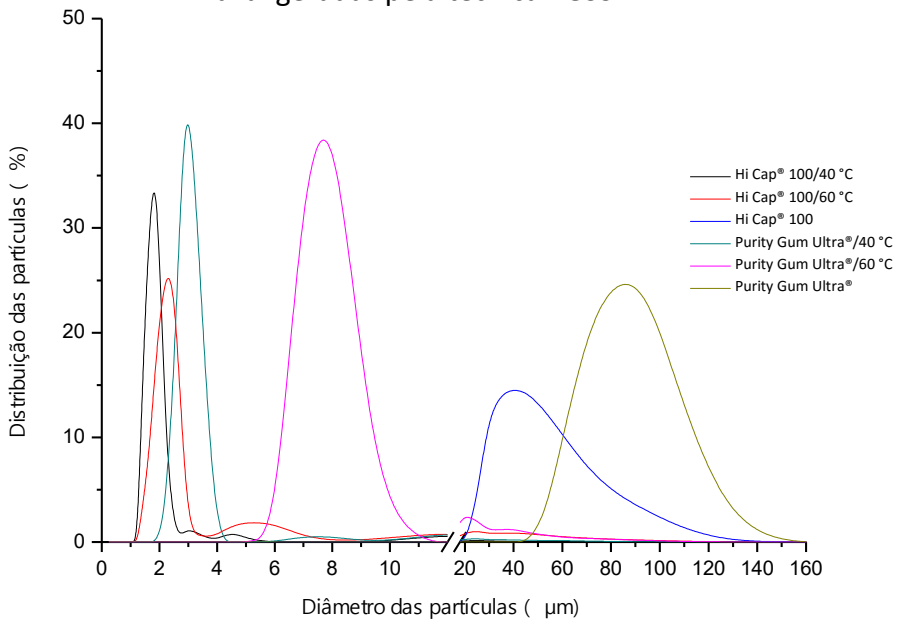
diminuíram drasticamente de tamanho sem perder a sua conformação inicial, um grânulo com inúmeros sulcos na sua superfície. Isto pode ser explicado pela utilização do etanol na formação de aerogel[5] com amido, pois segundo García-González, Alnaief e Smirnova (2011), o etanol é aplicado no sistema para evitar o colapso da estrutura de poros após a secagem mas também leva a um encolhimento mais extenso do polímero. Dessa forma, sugere-se que a presença do etanol, que compõe 44% da mistura, pode ser o responsável pela diminuição do tamanho da partícula.

A relação entre a concentração de CO_2 saturado na solução supercrítica e o tamanho da partícula já foi estudada. No trabalho de Paz, Martín e Cocero (2012), a análise dos resultados experimentais de micronização de polietileno glicol por PGSS-*drying* indicou que quando a concentração de dióxido de carbono na solução de gás saturada é elevada, a atomização é mais eficaz, o que leva à produção de partículas menores. As condições operacionais de produção de micropartículas foram 120 bar e 40 e 60°C e para estes parâmetros utilizou-se uma massa média de CO_2 de 141,5 g (Hi Cap® 100/40 °C); 120,4 g (Hi Cap® 100/60 °C); 150 g (Purity Gum Ultra®/40 °C) e 125,3 g (Purity Gum Ultra®/60 °C). Nota-se que para o tratamento Purity Gum Ultra®/40 °C, que possui uma massa de CO_2 na reação superior ao Purity Gum Ultra®/60 °C, as partículas formadas apresentavam diâmetro médio menor que o Purity Gum Ultra®/60 °C, em acordo com o explicado anteriormente.

A análise da distribuição do diâmetro médio das partículas (Figura 26) apresenta amostras pouco dispersas. Este tipo de distribuição do tamanho de partículas já era esperado, pois, de acordo com Sanli, Bozbag e Erkey (2012), dentre as várias vantagens do processo PGSS, semelhante ao RESS e outros processos supercríticos em relação aos processos convencionais, seria uma restrita distribuição de partículas.

[5] Os aerogéis podem ser definidos como produtos obtidos a partir da secagem supercrítica de géis. A aplicação da tecnologia supercrítica evitar o colapso dos poros e mantem intacta a textura porosa do material, sendo aplicado na liberação controlada de fármacos e demais produtos (GARCÍA-GONZÁLEZ; ALNAIEF; SMIRNOVA, 2011).

Figura 26 - Distribuição do diâmetro médio de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul geradas pela técnica PGSS



Distribuição em volume de partículas.
Fonte: Própria autoria.

5.3.2 FTIR

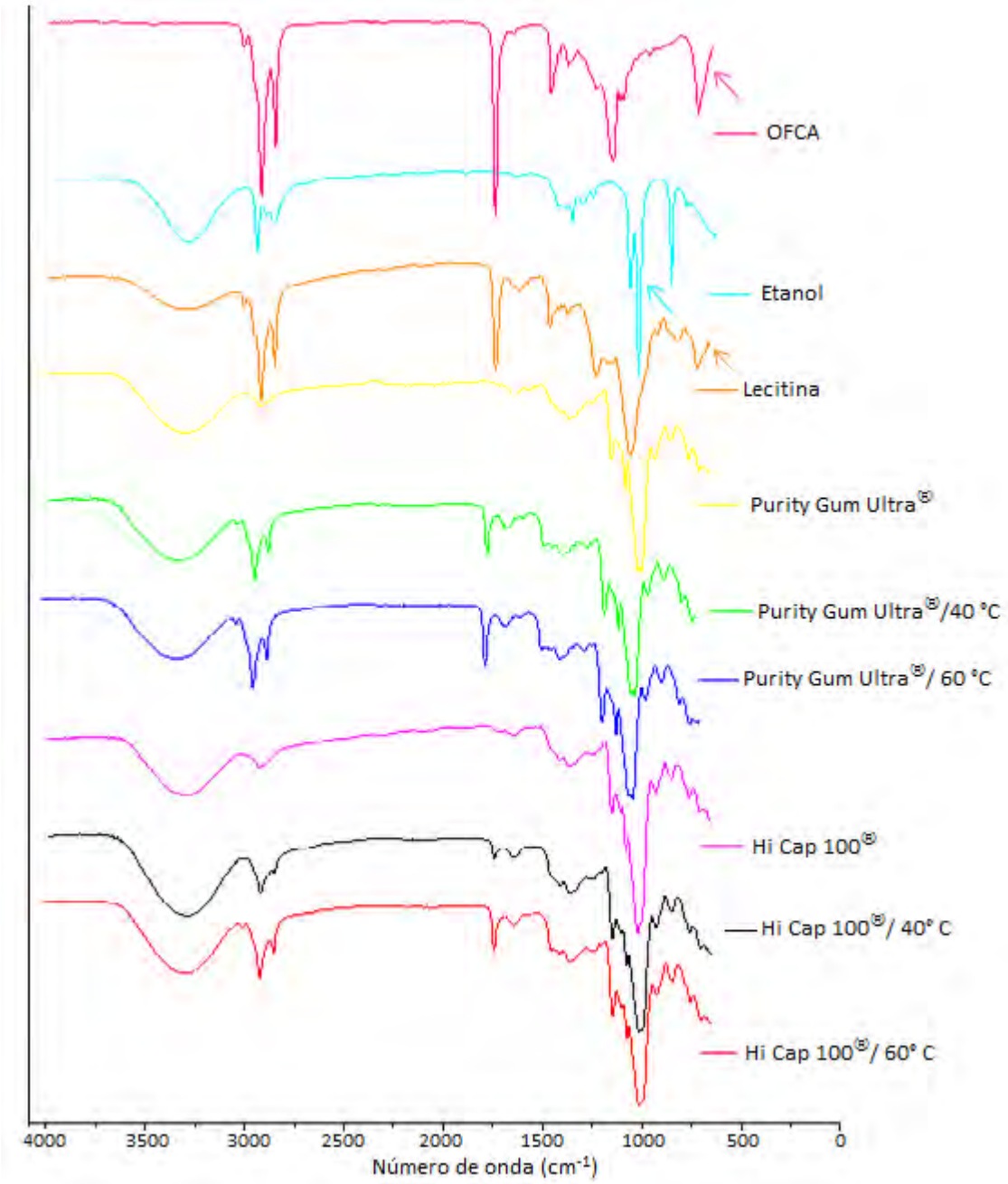
Poucas considerações podem ser feitas quanto aos espectros FTIR gerados para os componentes individuais e para as respectivas micropartículas de óleo de fígado de cação-azul obtidas com a técnica PGSS (Figura 27), no que se refere às possíveis ligações químicas formadas com o processo aplicado, o que diferenciariam os espectros. Na molécula de etanol, a banda de absorção mais intensa, característica deste composto, é a 1.050 cm^{-1} (biblioteca online NIST, 2011; database SDBS (2015), destacado pela seta azul claro na Figura 27. Nota-se que esta banda não está presente nos pós analisados, legitimando que o etanol foi eliminado no processo sendo carreado pelo CO_2 no momento da despressurização.

De maneira geral, os espectros das micropartículas se assemelham aos componentes usados na mistura. Nos espectros da lecitina e do OFCA, uma banda que aparece em torno de 750 cm^{-1} não está presente nas micropartículas (setas rosa e laranja, Figura 27). Esta análise elucidaria um ponto importante do processo de impregnação do óleo de cação-azul em meio supercrítico, indicando que o OFCA e a lecitina não se encontram ligados quimicamente aos polímeros utilizados. No entanto, essa afirmação seria evasiva, já que

maiores bandas tanto para a lecitina quanto para a o OFCA, por volta de 1.750 cm^{-1}, estão presentes em todas as partículas formadas, excedendo o polímero puro e etanol.

Como esta técnica se limita ao estudo de ligações químicas e não explora a presença de interações entre as moléculas, pode-se atribuir a estas interações moleculares como um dos fatores que contribuem para a permanência do óleo de fígado de cação-azul na matriz polimérica. Dentro do estudo da microencapsulação de óleo de fígado de tubarões, a pesquisa de Díaz-Rojas e colaboradores (2004) aplicou a técnica de espectroscopia de FTIR para comparar o óleo *in natura* com o óleo microcapsulado com pectina de linhaça. Os resultados apontaram que o processo de microencapsulação não afetou as características do óleo.

Figura 27 - Espectros de FTIR dos componentes individuais da mistura e de cada pó produzido via técnica PGSS



Fonte: Própria autoria.

5.3.3 Umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade e retenção de óleo

A Tabela 18 apresenta a caracterização das micropartículas de OFCA produzidas com a técnica PGSS. O processo de microencapsulação diminuiu significativamente ($p<0,05$) a

umidade das micropartículas produzidas a 60 °C em relação aos controles, sugerindo a influência da temperatura aplicada nesta característica das micropartículas. A umidade encontrada nas micropartículas de óleo de fígado de cação-azul é semelhante a outros estudos (SILVA et al., 2013; FERNANDES; BORGES, BOTREL, 2014), destacando-se a micropartícula com Hi Cap® 100 produzida a 60°C, com a menor umidade apresentada.

A a_w das micropartículas de cação-azul aumentou em relação aos controles. Para o Hi Cap® 100, a a_w apresentou variações apenas em relação ao controle com base no teste de Tukey. Com a Purity Gum Ultra®, houve diferenças entre os tratamentos e entre estes e o controle (para o tratamento Purity Gum Ultra®/40 °C). A temperatura de operação de 60°C produziu micropartículas de Purity Gum Ultra® com a_w significativamente menor, em comparação com o tratamento realizado a 40°C. A análise da atividade de água e conteúdo de umidade em microcápsulas é importante para predizer a estabilidade destas, uma vez que a presença de água pode levar a um crescimento microbiano, oxidação de lipídios e reações químicas enzimáticas e não-enzimáticas (ANWAR; KUNZ, 2011).

Estes mesmos polímeros na produção de partículas por outros métodos originaram micropartículas com a_w menores, como na pesquisa de Silva et al. (2013), no qual obtiveram partículas por meio da técnica de *spray drying* com a_w de 0,25 a 0,39, justificado pelas características do método aplicado, que envolvem temperaturas bem mais elevadas e que por sua vez, consegue eliminar mais água disponível no sistema. Ainda assim, vale ressaltar que a a_w adequada para o crescimento de microrganismos varia de 0,7 a 1 (VERDIER et al., 2014) e portanto, infere-se que as micropartículas de óleo de cação-azul não propiciam o desenvolvimento microbiano ainda que estejam com uma a_w maior que outros sistemas particulados.

Tabela 18 - Valores médios de umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade e retenção de óleo de micropartículas de óleo de fígado de cação-azul geradas com a técnica PGSS

	Umidade (%)	a_w	Retenção de óleo (%)	Higroscopicidade (%)	Solubilidade (%)
Hi Cap® 100/40 °C	5,36 ± 0,64[c]	0,45 ± 0,01[bc]	79,07 ± 1,52[a]	9,00 ± 0,01[b]	84,86 ± 0,98[abc]
Hi Cap® 100/60 °C	3,24 ± 0,38[d]	0,44 ± 0[c]	81,43 ± 1,72 [a]	5,40 ± 0,07[d]	86,04 ± 6,72[abc]
Hi Cap® 100	6,34 ± 0,12[c]	0,40 ± 0 [d]	-	12,81 ± 0,04[a]	95,35 ± 0,38[a]
Purity Gum Ultra®/40 °C	8,73 ± 0,45[ab]	0,53 ± 0,01[a]	74,15 ± 4,95[a]	4,17 ± 0,07[e]	83,38 ± 0,50[b]
Purity Gum Ultra®/60 °C	8,04 ± 0,40[b]	0,48 ± 0[b]	81,84 ± 1,01[a]	4,27 ± 0,02[e]	78,17 ± 1,15[c]
Purity Gum Ultra®	9,85 ± 0,02[a]	0,44 ± 0,01[bc]	-	6,84 ± 0,13[c]	93,50 ± 2,27[ab]

Diferentes letras na mesma coluna significam diferença estatística ($p<0,05$) para o teste de Tukey.
a_w – atividade de água.
Fonte: Própria autoria.

O índice de retenção de óleo é um dos principais parâmetros de eficiência do processo de microencapsulação, pois mostra o percentual de material de núcleo aderido à superfície da micropartícula. As micropartículas de óleo de fígado de cação-azul não apresentaram diferenças significativas na retenção de óleo, com valores variando de 74% a 82%. Em pesquisa com microencapsulação de agentes flavorizantes utilizando amido succinato, de Murúa-Pagola, Beristain-Guevara e Martínez-Bustos (2009), foi encontrado índices de retenção de óleo maiores que neste estudo, em torno de 94%.

Os valores retenção de óleo confirmam outros resultados das micropartículas de óleo de fígado de cação-azul, a exemplo da microscopia confocal, no qual o óleo devidamente corado na mistura se apresentou predominantemente na superfície da micropartícula. Analisando conjuntamente estes resultados, pode-se afirmar que o óleo foi impregnado, mas não foi microencapsulado.

De acordo com Comin, Temelli e Saldaña (2012), para que haja encapsulação, o material de núcleo tem de permanecer no interior do grânulo de amido. Lipídios podem depositar-se nos grânulos e permanecer lá devido a uma maior afinidade com o amido do que com o CO_2SC. Durante a manutenção da pressão, o lipídio pode formar um complexo com os componentes do amido, como amilose, permanecendo assim nos grânulos. Entre os lipídios estudados por Comin, Temelli e Saldaña (2012), eles inferem que isto pode ter acontecido com o ácido oleico utilizado como material de núcleo, mas é pouco provável que óleo de linhaça, outro material estudado, tenha seguido o mesmo comportamento.

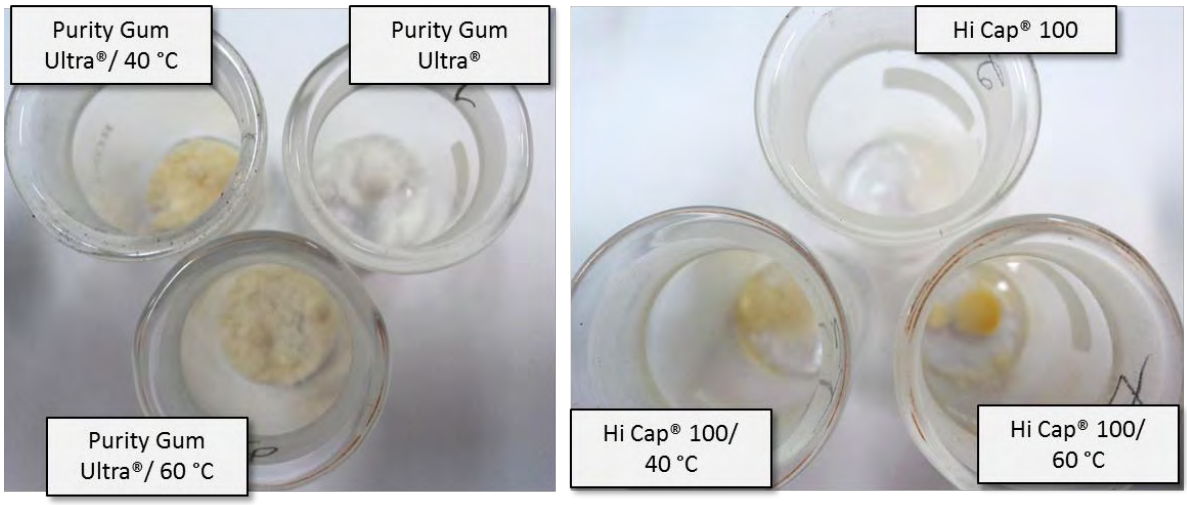
A adsorção de água é um fator crítico em óleos microencapsulados, uma vez que a presença de água pode influenciar a oxidação de lipídios e a fluidez dos pós (FRASCARELI et al., 2012). Spada e colaboradores (2013) afirmam que a superfície das micropartículas pode influenciar na adsorção de água, quando esta apresenta imperfeições como fendas e poros, tal como encontrado neste trabalho.

A higroscopicidade dos pós apresentou valores baixos para todos os ensaios (Tabela 18) e os resultados mostram que o processo supercrítico de formação de partículas diminuiu a capacidade de adsorção de água dos pós significativamente em relação aos controles. Isso pode ser explicado pela impregnação do óleo na micropartícula e consequentemente, pela diminuição da miscibilidade deste sistema em água. Para o Hi Cap® 100, o processo realizado a 60°C diminuiu mais ainda a capacidade de adsorção de água em relação ao PGSS realizado a 40 °C. Para Purity Gum Ultra®, os dois tratamentos foram similares entre si. Para muitos

pós alimentícios, este é considerado um parâmetro crítico; uma vez que a umidade de sorção resulta em uma estrutura pegajosa e em um pó mais aglomerado.

No estudo de Sahin-Nadeem e Özen (2014) no qual óleo de semente de romã foi microencapsulado com blendas de amido modificado e maltodextrina, observou-se que nas misturas com mais amido modificado houve um decréscimo da higroscopicidade, atribuída a sua maior capacidade emulsificante. Embora os valores deste estudo tenham sido baixos, as imagens das micropartículas após 7 dias (Figura 28) mostram que os pós sofreram alterações drásticas na cor, apresentando uma tonalidade amarelada, a qual não é visualizada em pós recém-processados, em todos os tratamentos. Para os tratamentos com Hi Cap® 100, observou-se inclusive início de crescimento de micro-organismos.

Figura 28 - Imagens dos pós e polímeros puros ao final do ensaio de higroscopicidade



Fonte: Própria autoria.

A análise de superfície do óleo mostrou que mais de 70% do óleo adicionado na mistura está fora da micropartícula. Valores de higroscopicidade foram significativamente diferentes entre os tratamentos e diminuiu em relação aos controles. A camada de óleo existente na superfície exterior das micropartículas pode ter contribuído para a diminuição significativa de adsorção de água.

Os polímeros utilizados neste estudo são amidos modificados e a solubilidade dos controles (Hi Cap® 100 e Purity Gum Ultra®) é elevada (Tabela 18). Nota-se que após o processo PGSS, a solubilidade das micropartículas decresceu significativamente em relação aos controles e entre os tratamentos, o teste de Tukey mostrou que os diferentes pós

gerados são igualmente solúveis entre si. Esta queda na solubilidade pode ser explicada pela forma como os lipídios estão distribuídos na micropartícula, já mostrada anteriormente nas imagens de microscopia confocal. Os lipídios dispersos na superfície das micropartículas não têm afinidade pela água, no momento da dissolução, impedem que uma parte do polímero interaja com a mesma.

5.4 O comportamento dos polímeros em meio supercrítico

Como resultados complementares ao estudo do processo de formação de partículas em meio supercrítico, avaliou-se a solubilidade dos polímeros utilizados neste estudo, Hi Cap 100® e Purity Gum Ultra®. De acordo com Jeong e Byun (2014), dados de comportamento de fase dos polímeros e monômeros em fluidos supercríticos desempenham um papel importante no desenvolvimento do processo para a maioria dos polímeros, condições de polimerização e aplicações industriais relacionadas.

Os amidos modificados foram acondicionados na cela do monitor de fases nas mesmas condições de pressão e temperatura aplicadas no processo de microencapsulação e foram monitorados por 60 min. As imagens apresentadas na Figura 29 mostram que não houve sensível variação no volume dos polímeros estudados durante o tempo de monitoramento.

Estes resultados são muito importantes para auxiliar a compreensão do comportamento do amido modificado em meio supercrítico e auxiliar no entendimento do não encapsulamento do OFCA (item 5.3.3 deste trabalho). Vários autores descrevem ou citam como o CO_2 supercrítico interage com o polímero durante o processo de microencapsulação e a partir desta interação, o polímero tem a sua morfologia alterada, normalmente aumentando de volume devido à entrada de CO_2 contendo o material de núcleo dissolvido, que por sua vez, no momento da despressurização, permanece na cápsula enquanto o CO_2 é eliminado na redução da pressão (CHAMPEAU et al., 2015).

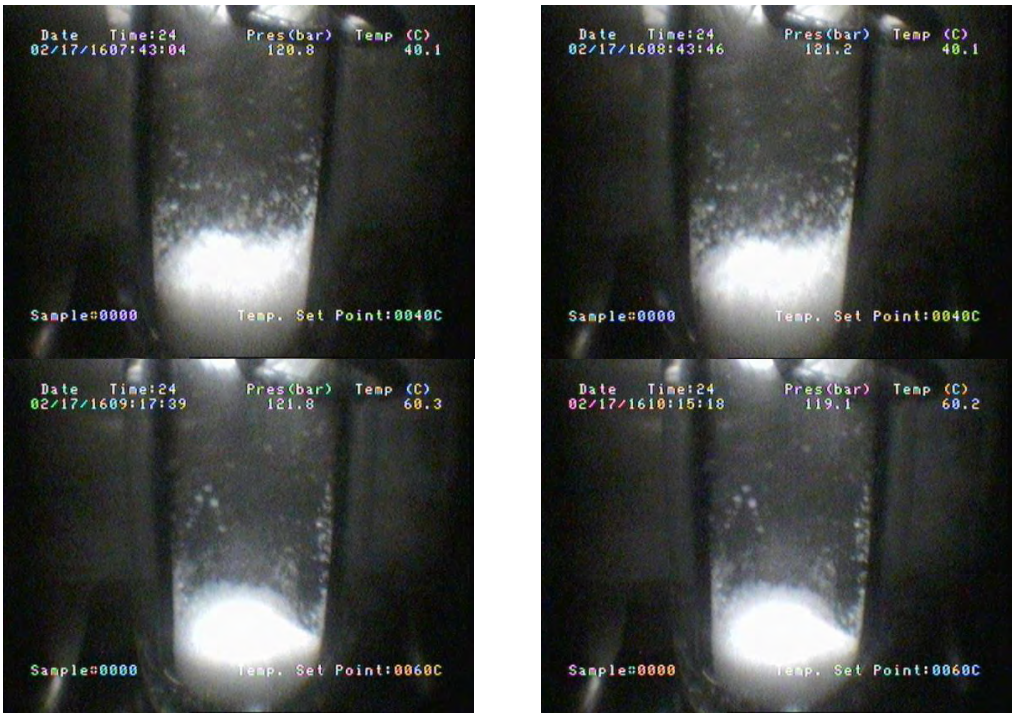
Figura 29 - Ensaio de expansão volumétrica com Hi Cap® 100 e Purity Gum Ultra® em meio supercrítico

Hi Cap 100®

Início | Fim

40 °C

60 °C

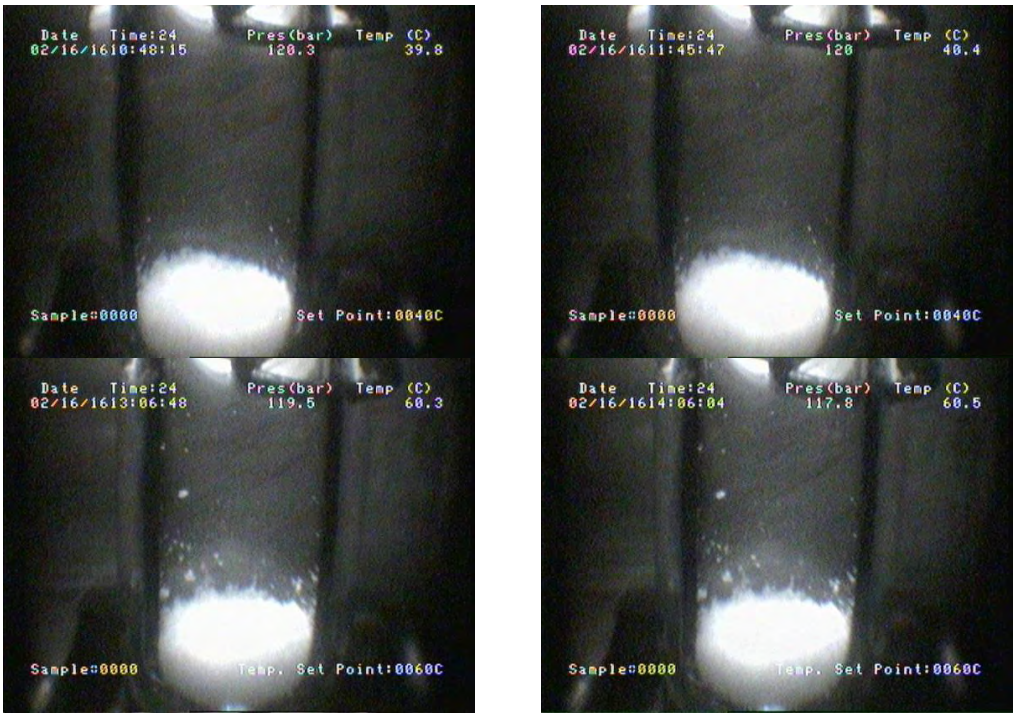


Purity Gum Ultra®

Inicio | Fim

40 °C

60 °C



Fonte: Própria autoria.

Varona e colaboradores (2011) abrangem esta teoria de comportamento dos materiais poliméricos utilizados nos processos de microencapsulação supercrítica afirmando que o

CO_2SC pode ser dissolvido na maior parte dos polímeros atingindo uma concentração entre 10 a 30% em peso, resultando numa expansão considerável do polímero. O aumento do volume livre no polímero inchado com CO_2 aumenta a velocidade de difusão e penetração de moléculas de soluto para o interior da matriz polimérica. Os autores ainda dizem que a impregnação das moléculas de bioativo no material de parede ocorre como consequência do equilíbrio de interações entre o material de núcleo, o polímero e o CO_2SC, resultando em uma adsorção ou uma ligação química dos materiais de núcleo na matriz polimérica.

De maneira geral, esta hipótese sobre o comportamento é relatada também para polímeros como PLGA (DELLA-PORTA; FALCO; REVERCHON, 2010), amido pré-gelatinizado (COMIN; TEMELLI; SALDAÑA, 2012) e etilcelulose (AHMAD et al., 2011). Todavia, faltam estudos de solubilidade destes e de outros materiais em meio supercrítico para validar esta teoria, pois são materiais diferentes entre si.

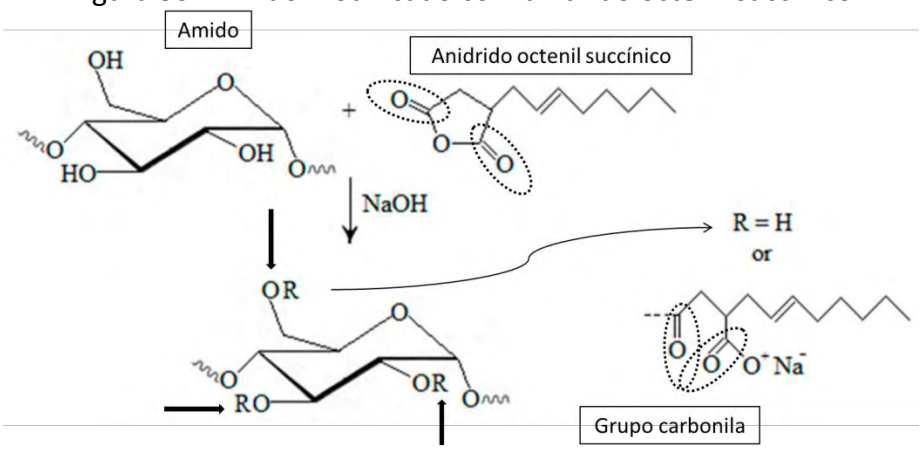
Comin, Temelli e Saldaña (2012) também estudaram a expansão volumétrica em amostras de amido pré-gelatinizado aplicando condições similares às do presente trabalho e a exemplo do que ocorreu com os amidos modificados, não foi verificado inchaço significativo do amido dentro das limitações do sistema. Os autores afirmaram que pode ser que a presença de poros na superfície dos grânulos de amido dificulte a visualização do inchaço e que este polímero, pelas suas características, o amido é indicado para impregnação de materiais.

Como já foi relatado, o CO_2 pode interagir ativamente com o polímero, desde que existam grupos de afinidade com o CO_2. No estudo de Labuschagne, Naicker e Kalombo (2016) com a formação de micropartículas de goma-laca via PGSS, os autores afirmam que o inchaço sofrido pelo material de impregnação é resultado de interações específicas entre moléculas de CO_2 e grupos carbonila doadores de elétrons e ésteres funcionais. Os autores acreditam que após a interação inicial entre o CO_2 e estes grupos funcionais, a presença de moléculas de CO_2 em contato com a goma-laca auxilia a entrada de novas moléculas de CO_2 na matriz polimérica. Como a pressão do sistema aumenta, mais moléculas de CO_2 penetram no polímero.

Com base no raciocínio anterior, este mesmo efeito pode acontecer com os polímeros aplicados neste trabalho, Purity Gum Ultra® e Hi Cap 100®. A molécula de anidrido octenil succínico contém em sua estrutura os mesmos grupos carbonila doadores de elétrons, os quais são responsáveis por interagir com CO_2SC e levar ao inchaço do polímero. Após a

reação com a cadeia de amido, em meio alcalino, os grupos carbonilas tornam-se parte da estrutura do amido, como é possível ver na Figura 30.

Figura 30 - Amido modificado com anidrido octenil succínico



Adaptado de: AČKAR, Đ. et al. Starch Modification by Organic Acids and Their Derivatives: A Review. **Molecules,** v. 20, p. 19554-19570, 2015.

O fato de não se ter visualizado a expansão volumétrica pode ser explicado pelo tempo de observação de 60 min, período recomendado pelos autores da área para se proceder ao experimento, mas que pode ter sido curto para se notar alguma modificação visual no volume desta amostra. Como não existem dados relacionados ao estudo do comportamento de fase de amidos modificados em meio supercrítico, pode ser importante estender esse período de contato com o CO_2 na cela do monitor de fase.

Outro motivo é a quantidade de grupos carbonila presentes no amido. Por mais que a substituição seja eficaz, de acordo com a FDA a presença do grupo octenil succinato no amido não pode exceder 3% sobre o amido total. Se a existência de grupos carbonila dentro deste limite implicar em baixas taxas de interação com o CO_2, é possível que mesmo que estes grupos estejam presentes na molécula de amido, a interação com o CO_2 ocorra a um nível reduzido e não detectável. Comim, Temelli e Saldaña (2012) também apresentaram como justificativa para o não inchaço de amidos pré-gelatinizados a presença dos poros nos grânulos, que seria por onde o CO_2 permearia mais facilmente.

Na despressurização dos experimentos de expansão volumétrica, atentou-se para detectar visualmente alguma modificação na opacidade do sistema, que significasse a ocorrência do ponto de névoa. Os ensaios de visualização do ponto de névoa também foram

realizados separadamente. Em ambos os casos, não houve modificação na opacidade na cela do monitor de fases.

5.5 Estudo da estabilidade oxidativa e do teor de esqualeno presente nas micropartículas de óleo de fígado de cação-azul obtidas pela técnica PGSS ao longo de 60 dias

Quando se pretende avaliar a estabilidade oxidativa de produtos microencapsulados faz-se o acondicionamento em temperatura constante e condições constantes. Esta análise com as micropartículas de OFCA possui vários pontos a se destacar. O primeiro se refere ao próprio óleo de cação-azul, que possui certa quantidade de ácidos graxos livres, muitos ácidos graxos poli-insaturados e foi utilizado para este teste sem refino. Outro ponto se refere à temperatura de armazenamento, 25 °C, a qual foi escolhida para que fossem visualizadas, de maneira drástica, todas as mudanças possíveis neste sistema dentro do tempo estipulado para esta análise.

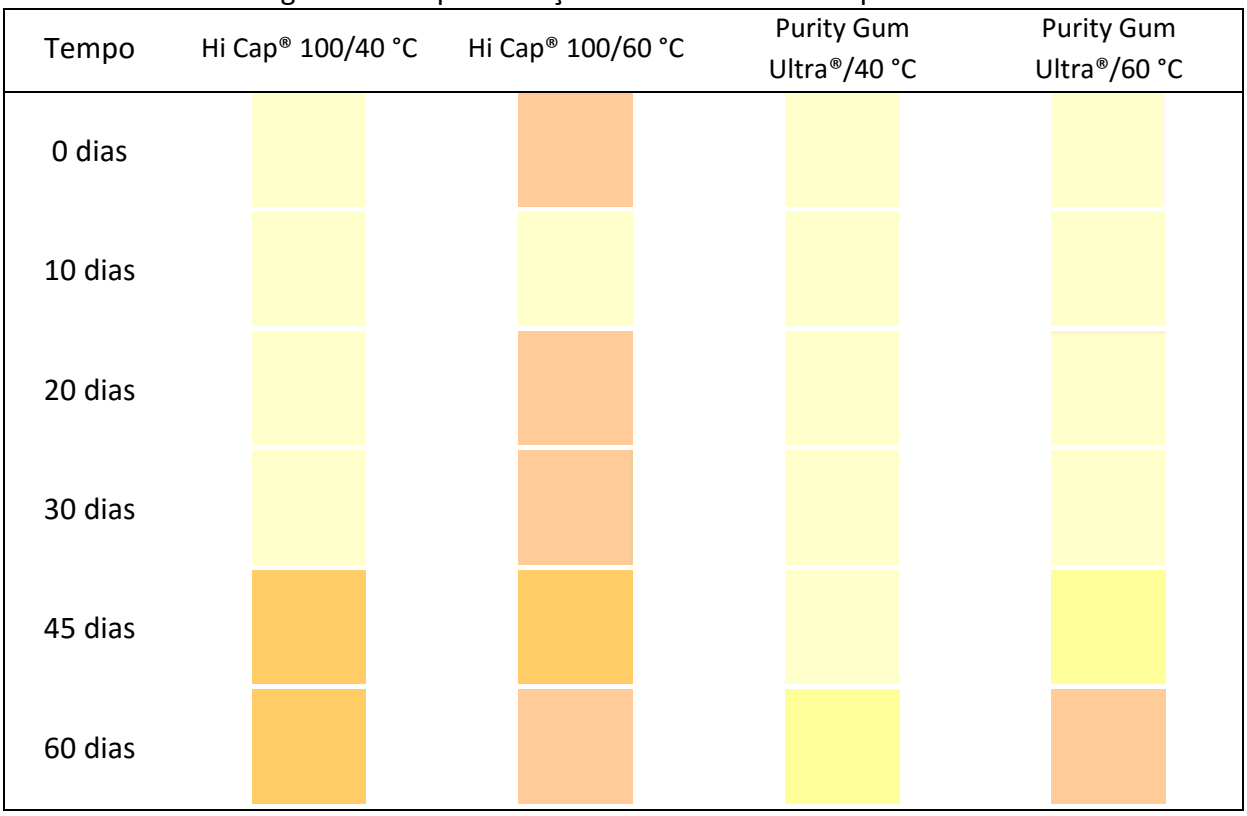
A cor das micropartículas variou entre os tratamentos e entre os dias de acondicionamento. De maneira geral, o parâmetro luminosidade dos pós diminuíram significativamente com o tempo, mas ainda se apresentaram muito claros (Tabela 19 e Figura 31). Em relação ao croma a*, este aumentou significativamente entre os diferentes tratamentos em função dos dias, dando às micropartículas aspecto alaranjado. O croma b*, que vai do azul ao amarelo, foi o que mais aumentou numericamente (e também estatisticamente), e foi o que atribuiu a cor majoritária às partículas, amarelo.

Tabela 19 - Medidas dos parâmetros L*, a* e b* para as micropartículas de óleo de fígado de cação-azul analisados em diferentes d

L*						
Dias (d)	0 d	10 d	20 d	30 d	45 d	60 d
Hi Cap® 100/40 °C	93,22 ± 0,06^{aB}	97,55 ± 0,05^{aA}	94,01 ± 0,03^{aAB}	96,79 ± 0,38^{aAB}	79,03 ± 0,35^{aC}	79,42 ± 3,74^{cC}
Hi Cap® 100/60 °C	88,26^{b} ± 0,05^{bB}	92,86 ± 0,34^{cA}	81,51 ± 0,14^{bD}	83,94 ± 0,26^{cC}	80,92 ± 0,78^{bD}	87,44 ± 0,23^{b}
Purity Gum Ultra®/40 °C	95,72 ± 0,02^{cB}	96,70 ± 0,06^{bA}	94,88 ± 0,06^{cD}	95,77 ± 0,26^{bB}	94,17 ± 0,01^{cD}	92,99 ± 0,07^{aC}
Purity Gum Ultra®/60 °C	99,26 ± 0,01^{dA}	97,51 ± 0,02^{aB}	96,11 ± 0,03^{dD}	96,41 ± 0,23^{abC}	93,03 ± 0,01^{dE}	90,04 ± 0,01^{abF}
a*						
Dias (d)	Dia 0	Dia 10	Dia 20	Dia 30	Dia 45	Dia 60
Hi Cap® 100/40 °C	-0,24 ± 0,01^{bB}	0,05 ± 0^{dB}	0,08 ± 0,02^{dB}	-0,54 ± 0,04^{dB}	7,04 ± 0,10^{aA}	7,89 ± 0,77^{aA}
Hi Cap® 100/60 °C	0,33 ± 0,01^{aB}	0,84 ± 0,03^{aB}	5,01 ± 0,04^{aA}	4,75 ± 0,03^{aA}	5,36 ± 1,06^{bA}	4,32 ± 1,65^{bA}
Purity Gum Ultra®/40 °C	-0,95 ± 0,01^{dF}	0,29 ± 0,01^{bE}	0,52 ± 0,01^{cD}	0,87 ± 0,06^{cB}	0,69 ± 0,01^{dC}	1,02 ± 0,02^{cA}
Purity Gum Ultra®/60 °C	-0,28 ± 0,01^{cF}	0,22 ± 0^{cE}	0,98 ± 0^{bD}	1,59 ± 0,08^{bB}	1,26 ± 0,01^{cC}	2,28 ± 0,02^{bcA}
b*						
Dias (d)	Dia 0	Dia 10	Dia 20	Dia 30	Dia 45	Dia 60
Hi Cap® 100/40 °C	19,51 ± 0,03^{bBC}	18,43 ± 0,01^{cC}	27,06 ± 0,12^{bB}	26,78 ± 0,47^{bBC}	40,74 ± 0,13^{bA}	42,83 ± 7,55^{aA}
Hi Cap® 100/60 °C	26,53 ± 0,02^{a}	21,50 ± 0,13^{a}	44,86 ± 0,19^{a}	32,07 ± 0,22^{a}	43,17 ± 1,06^{a}	42,23 ± 0,23^{a}
Purity Gum Ultra®/40 °C	13,85 ± 0,04^{cE}	19,86 ± 0,01^{bD}	24,27 ± 0,04^{cB}	21,85 ± 0,35^{dC}	29,70 ± 0,05^{cA}	29,95 ± 0,14^{bA}
Purity Gum Ultra®/60 °C	13,58 ± 0,01^{dF}	16,87 ± 0,01^{dE}	21,94 ± 0,02^{dD}	23, 23 ± 0,22^{cC}	29,26 ± 0,16^{cB}	34,68 ± 0,02^{abA}

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p<0,05$) para o teste de Tukey.
L*: luminosidade
a*: cromaticidade do verde ao vermelho
b*: cromaticidade do azul ao amarelo.

Figura 31 - Representação das cores das micropartículas



Cores geradas pela inserção dos valores de L*, a* e b* no site http://www.easyrgb.com/index.php?X=CALC

Fonte: própria autoria.

A variação de cor total (Tabela 20), representado pelo ΔE, foi maior para o tratamento Hi Cap® 100/ 40 °C, o que também pode ser verificado pela diferença entre as cores representadas na Figura 31. A pigmentação amarelada que as micropartículas adquiriram com o tempo está relacionada à presença de compostos secundários da oxidação lipídica.

Tabela 20 - Diferença total de cor entre as micropartículas em função do acondicionamento por 60 dias

Micropartículas	Diferença total de cor (ΔE)
Hi Cap® 100/40 °C	400,1019
Hi Cap® 100/60 °C	131,5991
Purity Gum Ultra®/40 °C	135,1935
Purity Gum Ultra®/60 °C	268,3464

Fonte: própria autoria.

A quantificação de hidroperóxidos é uma das análises mais importantes quando se estuda a estabilidade de sistemas lipídicos, pois a oxidação lipídica é o principal fenômeno e um dos parâmetros que determina a *shelf life* do material processado. Os teores

mensurados nas micropartículas em diferentes períodos foram distintos entre si e durante os períodos de armazenagem (Tabela 21). Os valores dos hidroperóxidos em função do tempo apresentou um comportamento diferenciado. De maneira geral, todos os tratamentos tiveram seus valores de hidroperóxidos aumentando de 0 a 20 dias, decaíram de 20 a 30 dias, se elevaram mais uma vez de 30 a 45 dias e diminuíram de 45 a 60 dias.

Rahman et al .(2009) afirma que a formação de hidroperóxidos se dá em uma alta taxa quando submetidos a temperaturas mais elevadas durante as fases iniciais da oxidação de lipídios e, em seguida, estes são rapidamente decompostos em compostos secundários, como aldeídos e cetona, ou podem interagir com outros componentes durante o armazenamento.

Na análise de índice de peróxido, comportamento semelhante foi visualizado no trabalho de Anwar e Kunz (2011), com óleo de peixe microencapsulado pela técnica f*reeze drying*. Drusch et al. (2007) também microencapsulou óleo de peixe refinado e acompanhou a estabilidade oxidativa das microcápsulas por 40 dias, estocadas a 20 °C. Na pesquisa, foram mensurados índice de hidroperóxidos, produtos intermediários da oxidação lipídica e no 40° dia, estes alcançaram valores de mais de 300 mmol/kg de óleo. A encapsulação de óleo de peixe em nanofibras também não foi protegeu o óleo contra a oxidação lipídica, atingindo em 4 dias valores de 393,7 meq O_2/kg óleo (GARCÍA-MORENO et al., 2016).

A oxidação lipídica tem consequências negativas tanto nutricionais quanto sensoriais, tais como alterações no valor nutritivo dos produtos, a redução dos níveis de ácidos graxos essenciais e das vitaminas solúveis em lipídios (A, D, E e K), diminuição do teor calórico, produção de off-flavor pronunciados e mudanças de cor. A oxidação de PUFA produz uma mistura complexa de produtos secundários de oxidação voláteis, e isto impacta em aromas particularmente desagradáveis (LIAO et al., 2012)

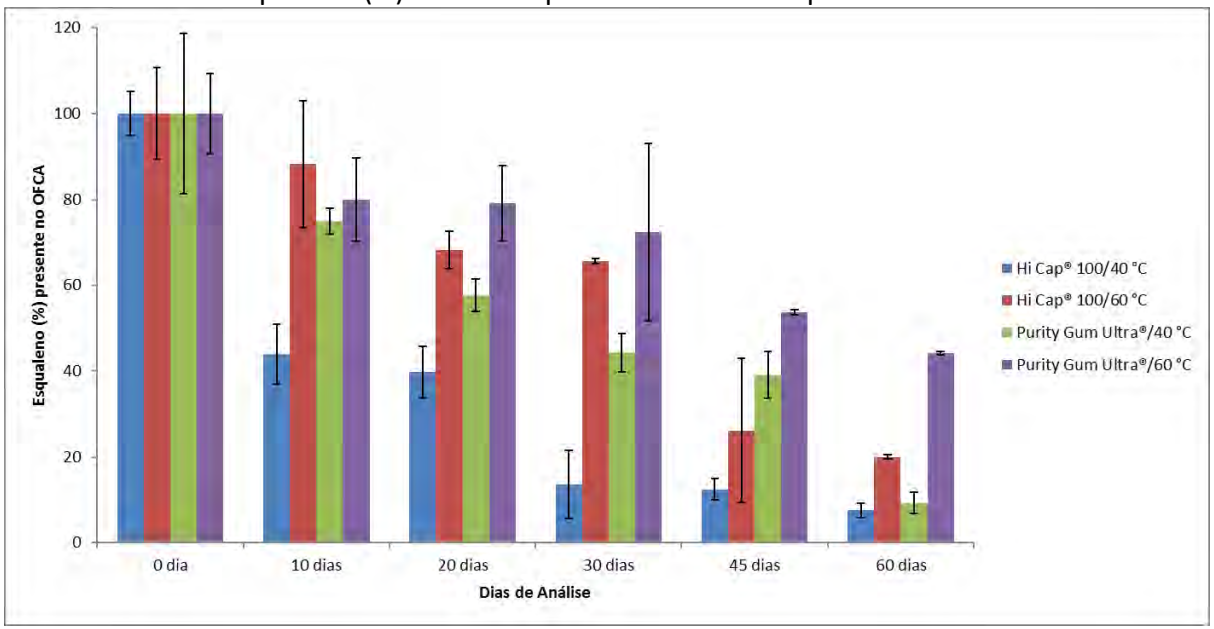
Embora os óleos de fígado de cação-azul utilizados neste ensaio de estabilidade sejam não-refinados, os índices físico-químicos iniciais mostravam parâmetros em conformidade com legislações nacional e internacionais (ver item 5.2.2 deste trabalho). Todavia, fatores como a temperatura de acondicionamento relativamente elevada (25 °C) associada à presença de ácidos graxos livres no sistema, podem ter desencadeado o processo oxidativo nas amostras (DAMODARAN; PARKIN, FENNEMA, 2010).

Tabela 21 - Índices de peróxido (meq de O_2 ativo/ Kg de óleo) dos óleos de fígados de cação-azul presentes em micropartículas acondicionadas em dias diferentes

	Dia 0	Dia 10	Dia 20	Dia 30	Dia 45	Dia 60
Hi Cap® 100/40 °C	$43,85 \pm 10,65^{bD}$	$62,52 \pm 1,66^{bCD}$	$419,33 \pm 5,21^{aB}$	$230,22 \pm 23,80^{aBCD}$	$649,01 \pm 108,61^{aA}$	$277,11 \pm 81,08^{aBC}$
Hi Cap® 100/60 °C	$49,27 \pm 2,47^{bC}$	$61,46 \pm 0,53^{bC}$	$448,48 \pm 11,85^{aB}$	$144,82 \pm 52,08^{abC}$	$571,29 \pm 50,29^{aA}$	$126,06 \pm 12,32^{aC}$
Purity Gum Ultra®/40 °C	$193,69 \pm 6,82^{aB}$	$312,57 \pm 42,41^{aA}$	$246,76 \pm 12,93^{bAB}$	$107,35 \pm 5,75^{bC}$	$241,33 \pm 17,43^{bAB}$	$226,15 \pm 17,76^{aB}$
Purity Gum Ultra®/60 °C	$36,76 \pm 2,08^{bC}$	$110,05 \pm 11,01^{bB}$	$118,4 \pm 1,06^{cB}$	$137,30 \pm 3,21^{abB}$	$271,61 \pm 17,43^{bA}$	$152,62 \pm 32,97^{aB}$

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p<0,05$) para o teste de Tukey.
Fonte: própria autoria.

Figura 32 – Decaimento do índice de esqualeno (%) dos OFCA presentes nas micropartículas acondicionadas em dias diferentes.



Valores ajustados considerando a quantidade inicial de esqualeno 100% do composto.
Fonte: Própria autoria.

O decaimento dos teores de esqualeno apresentados na Figura 32 mostra que este se encontra nas micropartículas em todos os tratamentos e em todos os períodos analisados, diminuindo com o tempo. O percentual de esqualeno remanescente ao final do processo também variou, destacando o tratamento Purity Gum Ultra®/60 °C que manteve ao final dos 60 dias 44,17% de esqualeno, enquanto tratamentos com Hi Cap® 100 mantiveram apenas 7,54% (a 40 °C) e 19,93% (a 60 °C). As micropartículas de Purity Gum Ultra®/40 °C continham apenas 9,26% de esqualeno. Os resultados não normalizados estão apresentados no Apêndice A desta tese.

Estes resultados que apontam a degradação do esqualeno em relação ao tempo de armazenagem na temperatura de trabalho de 25 °C já eram esperados, visto que se trata de uma molécula com inúmeras insaturações e, a exemplo dos ácidos graxos poli-insaturados, passível de sofrer processo oxidativo. Na pesquisa de Wang et al. (2011), analisando a estabilidade de esqualeno puro a 60 °C e com a adição de antioxidantes naturais (ácido carnósico) e sintéticos (BHT e α-tocoferol), foi identificado como produto de oxidação o composto 1,6,10,14,18,22-tetracosahexaen-3-ol, 2,6,10,15,19,23-hexametil ($C_{30}H_{50}O$), um composto decorrente da oxidação primária. Neste mesmo estudo também foi observado que se formam hidroperóxidos a partir da oxidação do esqualeno puro, que aumentam em quantidade com o tempo.

Analisando as alterações de cor, do índice de peróxido e de esqualeno em função do tempo, considera-se que, para manter o esqualeno e os ácidos graxos essenciais presentes no óleo de fígado de cação-azul é necessário realizar o refino deste. O refino de óleos compõe-se das etapas de degomagem, neutralização, branqueamento e desodorização, segundo Gunstone (2008) e Della Porta (2006). Se realizado com amostras como o óleo de fígado de cação-azul, com índices comparáveis a óleos refinados por conta do processo de extração, o processo poderia ser mais brando, com menor tempo sob altas temperaturas e com menor uso de produtos no processo, como NaOH ou argilas neutras, carvão ativado, dentre outros.

VI CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Esta pesquisa, que na sua ideia original abordou o estudo de apenas uma espécie de pescado, acabou por investigar os processos de extração supercrítica e características de qualidade e presença de ativos de duas espécies, os peixes cação-azul e beijupirá. Com o beijupirá, resultados inéditos e de grande valia foram encontrados, como os altos rendimentos de extração (até 58% de óleo), a presença de ácidos graxos essenciais e ainda de esqualeno (até 462 mg/ 100 g de óleo) na sua composição.

Com o fígado de cação-azul também se gerou dados de grande importância em relação aos rendimentos de extração supercrítica do óleo (até 60%), com a vantagem de não utilizar solventes orgânicos ou aquecimento. Os resultados das análises físico-químicas indicam que estes óleos obtidos, embora não refinados, tem características de óleos processados industrialmente e ainda atendem a normativas brasileiras e internacionais que regem o consumo seguro destes produtos. A análise dos compostos ativos mostrou que esta matriz é rica em ácidos graxos essenciais, além de conter esqualeno (537 mg/ 100 de óleo) e vitamina A (máximo de 3.682 retinol equivalente/ g de óleo).

As micropartículas formadas a partir do óleo de fígado de cação-azul apresentaram uma elevada taxa de índice de retenção do óleo (até 82%). Características como baixo diâmetro médio de partícula, elevada solubilidade e baixa higroscopicidade também foram observadas. A análise dos polímeros em CO_2 supercrítico evidenciou que os amidos modificados utilizados neste trabalho não tiveram expansão volumétrica nas condições aplicadas na etapa de formação de partículas. O acondicionamento das micropartículas por 60 dias a 25 °C mostrou significativas diferenças na cor das amostras e um sistema muito passível de oxidação, com grande quantidade de hidroperóxidos formados durante o acondicionamento. Os teores de esqualeno decaíram entre os períodos avaliados, mas este foi encontrado em todos os tratamentos analisados.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Durante a execução de um projeto tal como um projeto de Doutorado, grande na sua dimensão e com diversos objetivos a se cumprir, muitas perguntas são respondidas, porém, muitos outros questionamentos são fundamentados e outros aspectos relacionados à pesquisa são vislumbrados. Assim, como sugestões para trabalhos futuros têm-se:

- Realizar experimentos de extração supercrítica com mudança de pressão em uma mesma extração em determinado intervalo de tempo e estudar a composição destas frações obtidas a diferentes pressões;
- Medir outros compostos de interesse que possam estar presentes nos óleos de beijupirá e cação-azul, a exemplo dos alquilgliceróis e vitamina E;
- Estudar outros possíveis agentes de encapsulação em meio supercrítico;
- Estudar a solubilidade dos polímeros deste trabalho e outros de uso corrente em alimentos em meio supercrítico, ampliando os parâmetros de análise, como pressão, temperatura e tempo de contato. Avaliar se a presença de cossolvente interfere na solubilidade dos polímeros em CO_2 supercrítico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, D. A. P. et al. Natural antioxidant active packaging film and its effect on lipid damage in frozen blue shark (*Prionace glauca*). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, p. 50–55, 2011.

AČKAR, Đ. et al. Starch modification by organic acids and their derivatives: a review. **Molecules,** v. 20, p. 19554-19570, 2015.

ADEOTI, I. A.; HAWBOLDT, K. A review of lipid extraction from fish processing by-product for use as a biofuel. **Biomass and bioenergy**, v. 63, p. 330-340, 2014.

AGHBASHLO, M. et al. The correlation of wall material composition with flow characteristics and encapsulation behavior of fish oil emulsion. **Food Research International**, v. 49, p. 379–388, 2012.

AGUILERA, J. M.; LILLFORD, P. J. (Ed). **Food Materials Science: Principles and Practice**. New York: Springer, 2008. 616p.

AGUILERA, Y. et al. The protective role of squalene in alcohol damage in the chick embryo retina. **Experimental Eye Research**, v. 80, p. 535–543, 2005.

AHMAD, M. et al. Pharmaceutical microencapsulation technology for development of controlled release drug delivery systems**. World Academy of Science, Engineering and Technology**, v. 75, p. 384-387, 2011.

ALISSON, A. C. Squalene and Squalane Emulsions as Adjuvants. **Methods**, v. 19, p. 87-93, 1999.

ALMEIDA, A. P. et al. Microencapsulation of oregano essential oil in starch-based materials using supercritical fluid technology. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 20, p. 140–145, 2013.

AMIGUET, V. T. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of polyunsaturated fatty acids from Northern shrimp (*Pandalus borealis* Kreyer) processing by-products. **Food Chemistry**, v. 130, p. 853–858, 2012.

ANWAR, S. H.; KUNZ, B. The influence of drying methods on the stabilization of fish oil microcapsules: Comparison of spray granulation, spray drying, and freeze drying. **Journal of Food Engineering**, v. 105, p. 367-378, 2011.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, **Official Method 991.39**. 2005.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC INTERNATIONAL. 18th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, USA, **Official Method 996.05**. 2005.

ARAÚJO, K. L. G. V. et al. Influence of thermal degradation in the physicochemical properties of fish oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 106, p. 557–561, 2011.

AVERINA, E. S.; KUTYREV, I. A. Perspectives on the use of marine and freshwater hydrobiont oils for development of drug delivery systems. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 548–557, 2011.

BABIREKERE-IRISO, E. et al. Essential fatty acid composition and correlates in children with severe acute malnutrition. **Clinical Nutrition ESPEN**, 2015. Disponivel em http://dx.doi.org/10.1016/j.clnesp.2015.12.001.

BAHRAMI, M.; RANJBARIAN, S. Production of micro- and nano-composite particles by supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 263–283, 2007.

BAKES, M. J.; NICHOLS, P. D. Lipid fatty acid and squalene composition of liver oil from six species of deep-sea sharks collected in southern Australian waters. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part C**, v. 110, p. 267–275, 1995.

BALLANTYNE, J. S. Jaws: The Inside Story. The Metabolism of Elasmobranch Fishes**.** **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 118B, n. 4, p. 703–742, 1997.

BARTFAI, E. et al. Etude de l'effet genotoxique des huiles hépatiques brutes de trois espèces de requins méditerranéens par application du test de numération des micronoyaux dans les lymphocytes T humains. **Annales de Biologie Clinique**, v. 58, n. 5, p. 595-600, 2000.

BATISTA, I.; NUNES, M. L. Characterization of shark liver oils. **Fisheries Research**, v. 14, p. 329-334, 1992.

BERTHOMIEU, C.; HIENERWADEL, R. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. **Photosynthesis Research**, v. 101, p. 157–170, 2009.

BHILWADE, H. N. et al. Squalene as Novel Food Factor. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 11, p. 875-880, 2010.

BIMBO, A. P. **Edible Oil Processing: The production and processing of marine oils.** AOCS Lipid Library: Urbana. Disponível em: <http://lipidlibrary.aocs.org/processing/marine/index.htm>. Acessado em Julho de 2013.

BLANCO, M. et al. Towards sustainable and efficient use of fishery resources: present and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 29-36, 2007.

BONAFINI, S. et al. Beneficial effects of -3 PUFA in children on cardiovascular risk factors during childhood and adolescence. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 120, p. 72–79, 2015.

BORAN, G.; KARAÇAM, H.; BORAN, M. Changes in the quality of fish oils due to storage temperature and time. **Food Chemistry,** v. 98, p. 693–698, 2006.

BORNATOWSKI, H.; SCHWINGEL, P. A. Alimentação e reprodução do tubarão-azul, *Prionace glauca* (LINNAEUS, 1758), capturado na costa Sudeste e Sul do Brasil. **Arquivos de Ciências do Mar**, Fortaleza, v. 41, n. 1, p. 98-103, 2008.

BORRELLI, S. et al. New class of squalene-based releasable nanoassemblies of paclitaxel, podophyllotoxin, camptothecin and epothilone A. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 179-190, 2014.

BORRMANN, D. et al. Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*) juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 23–27, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria n° 19, de 15 de março de 1995. Norma técnica para complemento nutricional. **Diário Oficial de União**, 16 de março de 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 269, de 22 de setembro de 2005. O regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da União,** 23 de setembro de 2005.

BRASIL. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura – Brasil 2010**. Ministério da Pesca e Aquicultura*,* Brasília, 129 p, 2012a.

BRASIL. **Instrução normativa nº 25, de 12 de Abril de 2012.** Disciplina os procedimentos para a elaboração, aprovação, implementação, monitoria, avaliação e revisão de planos de ação nacionais para conservação de espécies ameaçadas de extinção ou do patrimônio espeológico. Instituto Chico Mendes de Conservação e Biodiversidade. 2012b.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v. 67, p. 21-33, 2005.

BRUNNER, G.; SAURE, C.; BUSS, D. Phase equilibrium of hydrogen, carbon dioxide, squalene, and squalane. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 54, p. 1598–1609, 2009.

BUCIO, S. L. et al. Study of the influence of process parameters on liquid and supercritical CO_2 extraction of oil from rendered materials: Fish meal and oil characterization. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 270–277, 2016.

BYRAPPA, K.; OHARA, S.; ADSCHIRI, T. Nanoparticles synthesis using supercritical fluid technology – towards biomedical applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 299–327, 2008.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science,** v. 65, n. 6, p. 1248-1252, 2000.

CANCIAM, C. A. Efeito da temperatura na viscosidade de óleos vegetais refinados. **Publicatio UEPG: Ciências Exatas e da Terra**, v. 16, n.1, p. 07-12, 2010.

CÁRDENO, A. et al. Squalene targets pro- and anti-inflammatory mediators and pathways to modulate over-activation of neutrophils, monocytes and macrophages. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p. 779–790, 2015.

CARDOSO. H. T. Estudos sobre óleos de fígado de cação: Desmobrânquios da família Sphyrnidae, Mir Rib., gêneros *Carcharias*, Raf., *Galeocerdo*, Rnz., e *Odontaspis*, Shau. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 39, n. 3, p. 361-383, 1943.

CAVALLI, R. O.; DOMINGUES, E. C.; HAMILTON, S. Desenvolvimento da produção de peixes em mar aberto no Brasil: possibilidades e desafios. **R. Bras. Zootec.**, v. 40, p. 155-164, 2011.

CHALAMAIAH, M. et al. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. **Food Chemistry**, v. 135, n. 4, p. 3020–3038, 2012.

CHAMPEAU, M. et al. Drug loading of polymer implants by supercritical CO_2 assisted impregnation: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 209, p. 248–259, 2015.

CHAVES, G. V. et al. Vitamin A and retinol-binding protein deficiency among chronic liver disease patients. **Nutrition**, v. 31, p. 664–668, 2015.

CHEN, A.-Z. et al. A continuous RESS process to prepare PLA-PEG-PLA microparticles**. The Journal of Supercritical Fluids**, v. 59, p. 92-97, 2011.

CHIOU, A. H.-J.; CHENG, H.-C.; WANG, D.-P. Micronization and microencapsulation of felodipine by supercritical carbon dioxide. **Journal of Microencapsulation**, v. 23, n.3, p. 265–276, 2006.

CHO, Y.; KIM, T.; GIL, B. Correlation between refractive index of vegetable oils measured with surface plasmon resonance and acid values determined with the AOCS official method. **Food Science and Technology**, v. 53, p. 517-521, 2013.

CHUANG, W.-H. et al. Purification, characterization and molecular cloning of alpha-2-macroglobulin in cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, p. 346-355, 2014.

COCERO, M. J. et al. Encapsulation and co-precipitation processes with supercritical fluids: Fundamentals and applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 546–555, 2009.

COMIN, L. M.; TEMELLI, F.; SALDAÑA, M. S. A. Impregnation of flax oil in pregelatinized corn starch using supercritical CO_2. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 221–228, 2012.

CORRÊA, A. P. A. et al. Fractionation of fish oil with supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 88, p. 381–387, 2008.

CREPALDI, D. V. et al. A situação da aquacultura e da pesca no Brasil e no mundo. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3/4, p.81-85, 2006.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4° ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DASILVA, G. et al. Healthy effect of different proportions of marine ω-3 PUFAs EPA and DHA supplementation in Wistar rats: Lipidomic biomarkers of oxidative stress and inflammation. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 26, p. 1385–1392, 2015.

DAVARNEJAD, R. et al. Extraction of fish oil by fractionation through supercritical carbon dioxide. **Journal of Chemical & Engineering Data,** n. 53, v.9, p. 2128–2132, 2008.

DELLA-PORTA, G.; FALCO, N.; REVERCHON, E. NSAID drugs release from injectable microspheres produced by supercritical fluid emulsion extraction**. Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 3, p. 1484-1499, 2010.

DELLA PORTA, R. A. **Edible oils Manual**. 2° ed. AOCS Press:Urbana,2006. 69p.

DÍAZ-ROJAS, E. I. et al. Linseed pectin: gelling properties and performance as an encapsulation matrix for shark liver oil. **Food Hydrocolloids**, v. 18, p. 293–304, 2004.

DRUSCH, S.; MANNINO, S. Patent-based review on industrial approaches for the microencapsulation of oils rich in polyunsaturated fatty acids. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 237-244, 2009.

DRUSCH, S. et al. Impact of Physicochemical Characteristics on the Oxidative Stability of Fish Oil Microencapsulated by Spray-Drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry,** v. 55, p. 11044–11051, 2007.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (ESFA). Scientific Opinion on Fish Oil for Human Comsumption. Food Hygiene, including Rancididy. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). **EFSA Journal**, v. 8, n. 10, p. 1874-1922, 2010.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. **Cod-liver oil (type A).** 5.ed. 2004. Disponível em: <http://lib.njutcm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_a-c/Cod-liver%20oil%20%28type%20A%29.pdf> Acesso em: 10 dez. 2014.

FAO. Food and Agriculture Organization. Codex Alimentarius Comission. In: JOINT FAO/WHO FOOD STANDARDS PROGRAMME CODEX COMMITTEE ON FATS AND OILS, 23., 2013, Langkawi, Malaysia. **Proceedings...** Rome, Italy, 2013. 12 p.

FAO. Food and Agriculture Organization. **The state of world fisheries aquiculture. Opportunities and challenges.** Rome, 2014. 243 p.

FARIAS, J. O. Artes de pesca e tecnologia da captura. In: **Manual sobre manejo de reservatórios para a produção de peixes.** Organização das nações unidas para a agricultura e alimentação. Departamento nacional de obras contra as secas. Brasília, Brasil, 1988. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/field/003/ab486p/AB486P00.htm#TOC.

FARVIN, K. H. S. et al. Supplementation of squalene attenuates experimentally induced myocardial infarction in rats. **Food Chemistry,** v. 105, p.1390–1395, 2007.

FELTES, M. M. C. et al. Alternativas para a agregação de valor aos resíduos da industrialização de peixe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.14, n.6, p.669–677, 2010.

FENNEMA, O. R. ed. **Food Chemistry.** Marcel Dekker: New York, 1996. 1262p.

FERNÁNDEZ, Ó. et al. Discrimination against diacylglycerol ethers in lipase-catalysed ethanolysis of shark liver oil. **Food Chemistry**, v. 36, p. 464–471, 2013.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 524– 532, 2014.

FERRARI, C. K. B. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicas. **Revista de Nutrição**, v. 11, n.1, p. 3-14, 1998.

FERRARO, V. et al. Extraction of high added value biological compounds from sardine, sardine-type fish and mackerel canning residues — A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, p. 3111–3120, 2013.

FIRESTONE, D. ed. **Physical and Chemical Characteristics of Oils, Fats, and Waxes**. 2nd Ed. Washington: AOCS Press. 2006. 237p.

FOURNIER, V. et al. Quantification of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid geometrical isomers formed during fish oil deodorization by gas–liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 353–359, 2007.

FRAILE, M. et al. Production of new hybrid systems for drug delivery by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions) process. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 81, p. 226–235, 2013.

FRASCARELI, E. C. et al. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 413–424, 2012.

GARAY, I.; POCHEVILLE, A.; MADARIAGA, L. Polymeric microparticles prepared by supercritical antisolvent precipitation. **Powder Technology**, v. 197, p. 211–217, 2010.

GARCÍA-GONZÁLEZ , C.A.; ALNAIEF, M.; SMIRNOVA, I. Polysaccharide-based aerogels—Promising biodegradable carriers for drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v. 86, p. 1425–1438, 2011.

GARCÍA-MORENO, P. J. et al. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. **Food Research International,** v. 65, p. 469–476, 2014.

GARCÍA-MORENO, P. J. et al. Encapsulation of fish oil in nanofibers by emulsion electrospinning: Physical characterization and oxidative stability. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 39-49, 2016.

GARCÍA, E. et al. Lipid composition of shark liver oil: effects of emulsifying and microencapsulation processes. **European Food Research and Technology**, v. 222, p. 697–701, 2006.

GAVA, A. J. **Princípios da Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel. 2009, 512p.

GEDI, M. A.; BAKAR, J.; MARIOD, A. A. Optimization of supercritical carbon dioxide (CO_2) extraction of sardine (*Sardinella lemuru* Bleeker) oil using response surface methodology (RSM). **Grasas y Aceites**, v. 66, n. 2, e074, 2015,

GENG, X. et al. Effects of dietary chitosan and Bacillus subtilis on the growth performance, non-specific immunity and disease resistance of cobia, *Rachycentron canadum*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 31, p. 400-406, 2011.

GIRI, S. S. et al. Dietary micronutrients and in vivo n−3 LC-PUFA biosynthesis in Atlantic salmon. **Aquaculture**, v. 452, p. 416–425, 2016.

GONÇALVES, A. A. Editor. **Tecnologia do Pescado: Ciência, Tecnologia, Inovação e Legislação**. Ed. Atheneu, 2011. 608p.

GONNET, J.-F. Colour effects of co-pigmentation of anthocyanins revisited-l. A calorimetric definition using the CIELAB scale. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 409-415, 1998

GRILO, E. C. et al. Effect of maternal vitamin A supplementation on retinol concentration in colostrum. **Journal of Pediatrics.**, v. 91, n. 1, p. 81-86, 2015.

GUIL-GUERRERO, J. L. et al. Occurrence and characterization of oils rich in g-linolenic acid Part II: fatty acids and squalene from *Macaronesian Echium* leaves. **Phytochemistry**, v. 54, p. 525-529, 2000.

GUNSTONE, F. D. **Oils and Fats in the Food Industry**. Wiley- Blackwell: Chichester, 2008. 146p.

HAJIMORADI, M. et al. The effect of shark liver oil on the tumor infiltrating lymphocytes and cytokine pattern in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 565–570, 2009.

HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; GALLEGO, R. M. R.; CARLOS, M. L. G. Sex difference in liver-oil concentration in the deep-sea shark, *Centroscymnus coelolepis*. **Marine and Freshwater Research**, v. 53, p. 883-886, 2002.

HERRERO, M. et al. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2495–2511, 2010.

HEINZELMANN, K.; FRANKE, K. Using freezing and drying techniques of emulsions for the microencapsulation of fish oil to improve oxidation stability. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 12, p. 223–229, 1999.

HIGASHIDATE, S.; YAMAUCHI, Y.; SAITO, M. Enrichment of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid esters from esterified fish oil by programmed extraction-elution with supercritical carbon dioxide. **Journal of Chromatography**, v. 515, p.295-303, 1990.

HUANG, C.-H. et al. A soybean and fish oil mixture with different n-6/n-3 PUFA ratios modulates the inflammatory reaction in mice with dextran sulphate sodium-induced acute colitis. **Clinical Nutrition,** v. 34, p. 1018-1024, 2015.

IGWE, I. O. The effects of temperature on the viscosity of vegetable oils in solution. **Industrial Crops and Products**, v. 19, p. 185–190, 2004.

IMMANUEL, G. et al. Processing and characterisation of low cost Balistid fish *Sufflamen capistratus* liver oil for edible purpose. **Food Chemistry**, v. 115, p. 430–435, 2009.

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2015-4. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 20 January 2016.

JAYASINGHE, C.; GOTOH, N.; WADA, S. Regiospecific Analysis of Shark Liver Triacylglycerols. **Journal of the American Oil Chemists' Society,** v. 89, p. 1873–1884, 2012.

JAYASINGHE, P.; HAWBOLDT, K. A review of bio-oils from waste biomass: Focus on fish processing waste. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 16, p. 798-821, 2012.

JEONG, H. –H.; BYUN, H.-S. Experimental measurement of cloud-point and bubble-point for the {poly(isobornyl methacrylate) + supercritical solvents + co-solvent} system at high pressure. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 75, p. 25–32, 2014.

JOHANNSEN, M.; BRUNNER, G. Solubilities of the Fat-Soluble Vitamins A, D, E, and K in Supercritical Carbon Dioxide. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 42, p. 106-111, 1997.

JUNG, J.; PERRUT, M. Particle design using supercritical fluids: Literature and patent survey. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 20, n. 3, p. 179–219, 2001.

JYOTHI, N. V. N. et al. Microencapsulation techniques, factors influencing encapsulation efficiency, **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 3, p. 187–197, 2010.

KALOGIANNIS, C. G. et al. Microencapsulation of amoxicillin in poly(l-lactic acid) by supercritical antisolvent precipitation. **Industrial & Engineering Chemistry Research,** v. 45, p. 8738-8743, 2006.

KANAKDANDE, D.; BHOSALE, R.; SINGHAL, R. S. Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum arabic, maltodextrin and modified starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, p. 536–541, 2007.

KANG, S. J.; TIMMINS, M. C. A.; ACKMAN R. G. Similarities in the Lipid Class Profiles of Oils from Atlantic and Pacific Dogfish Livers. **JAOCS**, v. 75, n. 11, p. 1667-1672, 1998.

KATABAMI, A. et al. Production of squalene by squalene synthases and their truncated mutants in *Escherichia coli*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, n. 2, p. 165-171, 2015.

KERČ, J. et al. Micronization of drugs using supercritical carbon dioxide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 182, p. 33–39, 1999.

KIM, E. H. J. et al. Melting characteristics of fat present on the surface of industrial spray-dried dairy powders. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 42, p. 1–8, 2005.

KNEZ, Ž. et al. Industrial applications of supercritical fluids: A review. **Energy**, v. 77, p. 235-243, 2014.

KRISHNAN, S.; KSHIRSAGAR, A. C.; SINGHAL, R. S. The use of gum arabic and modified starch in the microencapsulation of a food flavoring agent. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 309–315, 2005.

KRUKONIS.V. J. Supercritical fluid processing of fish oils: extraction of polychlorinated biphenyls. **JAOCS**, v. 66, n. 6, p. 818-821, 1989.

KUVENDZIEV, S. et al. Artificial neural network modelling of supercritical fluid CO_2 extraction of polyunsaturated fatty acids from common carp (*Cyprinus carpio* L.) viscera. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 92, p. 242–248, 2014.

LABUSCHAGNE, P. W.; NAICKER, B.; KALOMBO, L. Micronization, characterization and in-vitro dissolution of shellac from PGSS supercritical CO_2 technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 499, p. 205–216, 2016.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C.-M. Visualization and quantification of polymer distribution in microcapsules by confocal laser scanning microscopy (CLSM). **International Journal of Pharmaceutics**, v. 196, p. 223–226, 2000.

LA ROVERE, M. T.; CHRISTENSEN, J. H. The autonomic nervous system and cardiovascular disease: role of n-3 PUFAs. **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 1–10, 2015.

LÉTISSE, M. et al. Enrichment of EPA and DHA from sardine by supercritical fluid extraction without organic modifier I. Optimization of extraction conditions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 27–36, 2006.

LIAO, L. et al. Preparation and characterization of succinic acid deamidated wheat gluten microspheres for encapsulation of fish oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 92, p. 305–314, 2012.

LIPPI, G.; TARGHER, G.; FRANCHINI, M. Vaccination, squalene and anti-squalene antibodies: Facts or fiction? **European Journal of Internal Medicine**, v. 21, p. 70–73, 2010.

LISICHKOV, K. et al. Influence of operating parameters on the supercritical carbon dioxide extraction of bioactive components from common carp (*Cyprinus carpio* L.) viscera. **Separation and Purification Technology**, v. 138, p. 191–197, 2014.

LIU, H.; FINN, N.; YATES, M. Z. Encapsulation and Sustained Release of a Model Drug, Indomethacin, Using CO_2-Based Microencapsulation. **Langmuir**, v. 21, p. 379-385, 2005.

LOPES, B. L. F. et al. Selectivity of supercritical carbon dioxide in the fractionation of fish oil with a lower content of EPA + DHA. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, p. 78– 85, 2012.

LU, H.-T.; JIANG, Y.; CHEN, F. Preparative separation and purification of squalene from the microalga *Thraustochytrium* ATCC 26185 by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 994, p. 37–43, 2003.

MACEDO, L. F. L. **Remoção de mercúrio e arsênio em cação-azul, *Prionace glauca*.** 2010. 92p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MACHADO, L. C.; PELEGATI, V.; OLIVEIRA, A. L. Study of simple microparticles formation of limonene in modified starch using PGSS – Particles from gas-saturated suspensions. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 107, p. 260–269, 2016.

MAGNUSSON, C. D.; HARALDSSON, G .G. Ether lipids. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 164, p. 315– 340, 2011.

MAIER, M. et al. Process and storage stability of anthocyanins and non-anthocyanins phenolics in pectin and gelatin gels enriched with grape pomace extracts. **European Food Research, and Technology**, v. 229, p. 949-960, 2009.

MALLAH, M. A. et al. A rapid Fourier-transform infrared (FTIR) spectroscopic method for direct quantification of paracetamol content in solid pharmaceutical formulations. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 141, p. 64–70, 2015.

MARTINEZ-CORREA, H. A. et al. A. Measurements and thermodynamic modeling of the solubility of squalene in supercritical carbon dioxide. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 43–50, 2010.

MARTINS, G. I. et al. Physical and chemical properties of fish oil biodiesel produced in Brazil. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 42, p. 154–157, 2015.

MATTEA, F. et al. Supercritical antisolvent precipitation from an emulsion: β-Carotene nanoparticle formation. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 51, p. 238–247, 2009.

MEDEIROS, M. C. et al. Buriti oil (*Mauritia flexuosa* L.) negatively impacts somatic growth and reflex maturation and increases retinol deposition in young rats. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v. 46, p. 7–13, 2015.

MENEGAZZO, M. L.; PETENUCI, M. E.; FONSECA, G. G. Production and characterization of crude and refined oils obtained from the co-products of Nile tilapia and hybrid sorubim processing. **Food Chemistry**, v. 157, p. 100–104, 2014.

MISHIMA, K. Biodegradable particle formation for drug and gene delivery using supercritical fluid and dense gas. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 411–432, 2008.

MISHRA, V. K.; TEMELLI, F.; OORAIKUL, B. Extraction and purification of ω-3 fatty acids with an emphasis on supercritical fluid extraction-A review. **Food Research lnternational**, v.26, p. 217 -226, 1993.

MOURA, P. M. et al. Supercritical fluid extraction from guava (*Psidium guajava*) leaves: Global yield composition and kinetic data. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.62, p.116-122, 2012.

MONTEALEGRE-QUIJANO, S. et al. Sexual development, size at maturity, size at maternity and fecundity of the blue shark *Prionace glauca* (Linnaeus, 1758) in the Southwest Atlantic. **Fisheries Research**, v. 160, p. 18–32, 2014.

MURÚA-PAGOLA, B.; BERISTAIN-GUEVARA, C. I.; MARTÍNEZ-BUSTOS, F. Preparation of starch derivatives using reactive extrusion and evaluation of modified starches as shell materials for encapsulation of flavoring agents by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 91, p. 380–386, 2009.

MUZIO, E. D. et al. All-trans-retinoic acid and retinol binding to the FA1 site of human serum albumin competitively inhibits heme-Fe(III) association. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 590, p. 56-63, 2016.

NAVARRO-GARCIA, G. et al. lipid composition of the liver oil of shark species from the Caribbean and gulf of California waters. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 13, p. 791-798, 2000.

NEMETH, M. et al. Effects of Diets High in Unsaturated Fatty Acids on Socially Induced Stress Responses in Guinea Pigs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 36-40, 2014.

NGUYEN, T. T. et al. significant enrichment of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) in the lipids extracted by supercritical CO_2 from the livers of australian rock lobsters (*Jasus edwardsii*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 4621−4628, 2015.

NILSSON, W. B. et al. Fractionation of menhaden oil ethyl esters using supercritical fluid CO_2. **JAOCS**, v. 65, n. 1, p. 109-117, 1988.

O'BRIEN, R. D. **Fats and oils: formulating and processing for applications**. CRC Press: Boca Raton, 2004. 574 p.

OGAWA, M.; MAIA, E. L. **Manual de pesca: ciência e tecnologia do pescado**. Vol. 1 São Paulo: Editora Varela. 1999. 430p.

O'SULLIVAN, L.; WOODS, J. A.; O'BRIEN, N. M. Squalene but not n-3 fatty acids protect against hydrogen peroxide-induced sister chromatid exchanges in Chinese hamster V79 cells. **Nutrition Research**, v. 22, p. 847–857, 2002.

PACHECO, M. T. B.; BARRERA-ARELLANO, D. Fracionamiento del aceite de hígado de tiburón azul (*Prionace glauca*) y su estabilización com antioxidantes. **Grasas y Aceites**, v. 45, p. 155-160, 1994.

PASQUALI, I.; BETTINI, R. Are pharmaceutics really going supercritical? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, p. 176–187, 2008.

PAZ, E.; MARTÍN, A.; COCERO, M. J. Formulation of β-carotene with soybean lecithin by PGSS (Particles from Gas Saturated Solutions)-drying. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 125–133, 2012.

PEREIRA, J. A. et al. Concentrações de retinol e de beta-caroteno séricos e perfil nutricional de crianças em Teresina, Piauí, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, n. 2, p. 287-296, 2008.

PEREDA, J. A. O. (organizador). **Tecnologia de Alimentos: Alimentos de origem animal**. v. 2 Porto Alegre: Artmed, 2005. 279p.

PEREZ, J. A. A. Biodiversidade marinha: uma herança ameaçada? **Ciência e Cultura**, v. 62, n. 3, p. 42-44, 2010.

PERINELLI, D. R. et al. Evaluation of P(L)LA-PEG-P(L)LA as processing aid for biodegradable particles from gas saturated solutions (PGSS) process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 468, p. 250–257, 2014.

PERRUT, M.; JUNG, J.; LEBOEUF, F. Enhancement of dissolution rate of poorly soluble active ingredients by supercritical fluid processes Part II: Preparation of composite particles. **International Journal of Pharmaceutics,** v. 288, p. 11–16, 2005.

PIETSCH, A.; JAEGER, P. Concentration of squalene from shark liver oil by . short-path distillation. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 109, p. 1077–1082, 2007.

POMPONI, S. A. The bioprocess–technological potential of the sea. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 5–13, 1999.

RAHMAN, M. S. et al. Fat oxidation in freeze-dried grouper during storage at different temperatures and moisture contents. **Food Chemistry**, v. 114, p. 1257–1264, 2009.

RAI, A.et al. Evaluation of models for supercritical fluid extraction. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v.72, p.274-287, 2014.

RAO, C. V.; NEWMARK, H. L.; REDDY, B. S. Chemopreventive effect of squalene on colon cancer. **Carcinogenesis,** v.19, n.2, p.287–290, 1998.

REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 1412–1426, 2009.

RODRIGUES, M. et al. Microcomposites theophylline/hydrogenated palm oil from a PGSS process for controlled drug delivery systems. **The Journal of Supercritical Fluids,** v. 29, p. 175–184, 2004.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Supercritical fluid extraction of fish oil from fish by-products: A comparison with other extraction methods. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 238–248, 2012.

RUBIO-RODRÍGUEZ, N. et al. Supercritical fluid extraction of the omega-3 rich oil contained in hake (*Merluccius capensis–Merluccius paradoxus*) by-products: Study of the influence of process parameters on the extraction yield and oil quality. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 215–226, 2008.

SAHENA, F. et al. Extraction of fish oil from the skin of Indian mackerel using supercritical fluids. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 63–69, 2010a.

SAHENA, F. et al. Fatty acid compositions of fish oil extracted from different parts of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) using various techniques of supercritical CO_2 extraction. **Food Chemistry**, v. 120, p. 879–885, 2010b.

SAHENA, F. et al. Supercritical carbon dioxide extraction of oil from *Thunnus tonggol* head by optimization of process parameters using response surface methodology. **Korean Journal of Chemical Engineering.**, v. 30, n. 7, p. 1466-1472, 2013.

SAHIN-NADEEM, H.; ÖZEN, M. A. Physical properties and fatty acid composition of pomegranate seed oil microcapsules prepared by using starch derivatives/whey protein blends. **European Journal of Lipid Science and Technology.** v. 116, p. 847–856, 2014.

SAMPAIO, L. A.; TESSER, M. B.; WASIELESKY JÚNIOR, W. Avanços da maricultura na primeira década do século XXI: piscicultura e carcinocultura marinha. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 102-111, 2010.

SANLI, D.; BOZBAG, S. E.; ERKEY, C. Synthesis of nanostructured materials using supercritical CO_2: Part I. Physical transformations. **Journal of Materials Science**, v. 47, p. 2995–3025, 2012.

SANTOS, A. B.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização**. Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, n. 2, p. 322-326, 2005.

SANTOS, D. T. et al. Stabilization of anthocyanin extract from jabuticaba skins by encapsulation using supercritical CO_2 as solvent. **Food Research International**, v. 50, p. 617-624, 2013.

SANTOS, I. R. et al. Microencapsulation of protein particles within lipids using a novel supercritical fluid process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 69–78, 2002.

SANTOS, M. G. et al. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex Coacervation, **Food Chemistry**, v. 17, p. 32–39, 2015.

SARKER, M. Z. I. et al. Optimization of Supercritical CO_2 Extraction of Fish Oil from Viscera of African Catfish (*Clarias gariepinus*). **International Journal of Molecular Sciences** v. 13, n. 9, p. 11312-11322, 2012.

SAUVANT, P. et al. Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. **Food Research International**, v. 46, p. 469–479, 2012.

SAYGIN, H.; ŞIŞMAN, A. Joule–Thomson coefficients of quantum ideal-gases. **Applied Energy**, v. 70, p. 49–57, 2001.

SCHASCHKE, C.; FLETCHER, I.; GLEN, N. Density and viscosity measurement of diesel fuels at combined high pressure and elevated temperature. **Processes**, v. 1, p. 30-48, 2013.

SDBS. Spectral Database for Organic Compounds. **National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)**, Japan. http://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi. Acessado em Fevereiro de 2015.

SEIBEL, N. F.; SOUZA-SOARES, L. A. produção de silagem química com resíduos de pescado marinho. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.2, p. 333-337, 2003.

SELMI, S. et al. Effects of storage temperature and α-tocopherol on oil recovered from sardine mince. **International Journal of Refrigeration**, v. 34, p. 1315-1322, 2011.

SETHOM, M. M. et al. Polyunsaturated fatty acids deficits are associated with psychotic state and negative symptoms in patients with schizophrenia. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 83, p. 131–136, 2010.

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction – A review. **Journal of Food Engineering**, v. 124, p. 105–116, 2014.

SHAPIRO, H. Could n-3 polyunsaturated fatty acids reduce pathological pain by direct actions on the nervous system? Prostaglandins, **Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 68, p. 219–224, 2003.

SILVA, F. C. et al. Assessment of production efficiency, physicochemical properties and storage stability of spray-dried propolis, a natural food additive, using gum Arabic and OSA starch-based carrier systems. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 28-36, 2013.

SILVA, F. L. C. **Novos tensoativos oxigenados para fluidos supercríticos**. 2011. 223p. Tese (Doutorado). Instituto de Química, Universidade de São Paulo. 2011.

SILVA-JUNIOR, R. F. et al. Substituição do óleo de peixe por óleo de soja em dietas para beijupirá (*Rachycentron canadum*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.,** v. 63, n. 4, p. 980-987, 2011.

SILVA, R. P.F.F.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.

SILVA, V. M.; VIEIRA, G. S.; HUBINGER, M. D. Influence of different combinations of wall materials and homogenisation pressure on the microencapsulation of green coffee oil by spray drying. **Food Research International**, v. 61, p. 132–143, 2014.

SIMOPOULOS, A. P. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in U cardiovascular disease and other chronic diseases. **Experimental Biology and Medicine,** v. 233, n. 6, p. 74-88, 2008.

SOLANA, M.; RIZZA, C. S.; BERTUCCO, A. Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus*

obliquus, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina.* **The Journal of Supercritical Fluids,** v. 92, p. 311–318, 2014.

SPADA, J. C. et al. Water adsorption isotherms of microcapsules with hydrolyzed pinhão (*Araucaria angustifolia* seeds) starch as wall material. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 1, p. 64–69, 2013.

STABY, A.; MOLLERUP, J. Separation of constituents of fish oil using supercritical fluids: a review of experimental solubility, extraction, and chromatographic data. **Fluid Phase Equilibria**, v. 91, p. 349-386, 1993.

SUN, L.; CHEN, H. Effects of water temperature and fish size on growth and bioenergetics of cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, v. 426–427, p. 172–180, 2014.

SUNARYA; HOLE, M.; TAYLOR, K. D. A. Methods of extraction composition and stability of vitamin A and other components in dogfish (*Squalus acanthias*) liver oil. **Food Chemistry**, v. 55, p. 215-220, 1996.

SWEEDMAN, M. C. et al. Structure and physicochemical properties of octenyl succinic anhydride modified starches: A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 905–920, 2013.

TABERNERO, A.; DEL VALLE, A. M. M.; GALÁN, M. A. Supercritical fluids for pharmaceutical particle engineering: Methods, basic fundamentals and modeling. **Chemical Engineering and Processing**, v. 60, p. 9– 25, 2012.

TAHER, H. et al. S. Supercritical carbox dioxide extraction of microalgae lipid: Process optimization and laboratory scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 57-66, 2014.

TANDYA, A. et al. Dense gas processing of polymeric controlled release formulations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 328, p. 1–11, 2007.

TAPIERO, H. et al. Polyunsaturated fatty acids (PUFA) and eicosanoids in human health and pathologies. **Biomed Pharmacother**, v. 56, p. 215–222, 2002.

TAVARES, R.; ORTIZ, M.; ROCHA, F. A. Population structure, distribution and relative abundance of the blue shark (*Prionace glauca*) in the Caribbean Sea and adjacent waters of the North Atlantic. **Fisheries Research**, v. 129 – 130, p. 137– 152, 2012.

TEMELLI, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 583–590, 2009.

TENLLADO, D.; REGLERO, G.; TORRES, C. F. A combined procedure of supercritical fluid extraction and molecular distillation for the purification of alkylglycerols from shark liver oil. **Separation and Purification Technology**, v. 83, p. 74–81, 2011.

TRUSHENSKI, J. et al. DHA is essential, EPA appears largely expendable, in meeting the n−3 long-chain polyunsaturated fatty acid requirements of juvenile cobia *Rachycentron canadum*. **Aquaculture**, v. 326–329, p. 81–89, 2012.

TURNER, C.; KING, J. W.; MATHIASSON, L. Supercritical fluid extraction and chromatography for fat-soluble vitamin analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 936, p. 215–237, 2001.

VAN DER WIELEN, L. A. M.; CABATINGAN, L. K. Fishing products from the sea—rational downstream processing of marine bioproducts. **Journal of Biotechnology**, v. 70, p. 363–371, 1999.

VARONA, S. et al. Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 54, p. 369–377, 2010.

VARONA, S. et al. Supercritical impregnation of lavandin (*Lavandula hybrida*) essential oil in modified starch. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 58, p. 313-319, 2011.

VÁZQUEZ, J. A. et al. Optimisation of the extraction and purification of chondroitin sulphate from head by-products of *Prionace glauca* by environmental friendly processes. **Food Chemistry**, v. 198, p. 28–35, 2016.

VÁZQUEZ, L. et al. Recovery of squalene from vegetable oil sources using countercurrent supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 40, p. 59–66, 2007.

VERDIER, T. et al. A review of indoor microbial growth across building materials and sampling and analysis methods. **Building and Environment**, v. 80, p. 136–149, 2014.

VIDAL, J. M. A. et al. Concentrado protéico de resíduos da filetagem de tilápia-do-nilo (*Oreochromis niloticus)*: caracterização físico-química e aceitação sensorial. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 1, p. 92-99, 2011.

VÖGLER, R. et al. Ecological patterns, distribution and population structure of *Prionace glauca* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) in the tropical-subtropical transition zone of the north-eastern Pacific. **Marine Environmental Research**, v. 73, p. 37-52, 2012.

WANG, H. et al. Comparative effect of carnosic acid, BHT and α-tocopherol on the stability of squalene under heating and UV irradiation**. Food Research International**, v. 44, p. 2730–2734, 2011.

WANG, W. et al. A process for the synthesis of PUFA-enriched triglycerides from high-acid crude fish oil. **Journal of Food Engineering**, v. 109, p. 366–371, 2012.

WANG, Z. et al. Dietary methionine level influences growth and lipid metabolism via GCN2 pathway in cobia (*Rachycentron canadum*). **Aquaculture**, n. 454, p. 148–156, 2016.

WEBER, D.; GRUNE, T. The contribution of b-carotene to vitamin A supply of humans. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 56, p. 251–258, 2012.

WEIDNER, E. High pressure micronization for food applications. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, n. 556–565, 2009.

WEIDNER, E.; STEINER, R.; KNEZ, Z. **Powder generation from polyethyleneglycol with compressible fluids**. In: High Pressure Chemical Engineering, Elsevier, Amsterdam. p. 223–228, 1996.

WEJNEROWSKA, G.; HEINRICH, P.; GACA, J. Separation of squalene and oil from *Amaranthus* seeds by supercritical carbon dioxide. **Separation and Purification Technology**, v. 110, p. 39–43, 2013.

WETHERBEE, B. M.; NICHOLS, P. D. Lipid composition of the liver oil of deep-sea sharks from the Chatham Rise, New Zealand. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 125, p. 511–521, 2000.

WU, J. et al. Association between vitamin A, retinol intake and blood retinol level and gastric cancer risk: A meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 34, p. 620-626, 2015.

XIE, Y.-L. et al. Study on the Morphology, Particle Size and Thermal Properties of Vitamin A Microencapsulated by Starch Octenyl succiniate. **Agricultural Sciences in China**, v. 7, p. 1058-1064, 2010.

XU, W. L. et al. Separation and purification of stigmasterol and β-sitosterol from phytosterol mixtures by solvent crystallization method. **Separation and Purification Technology**, v. 41, p. 173–178, 2005.

YEO, S.; KIRAN, E. Formation of polymer particles with supercritical fluids: A review. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 34, n. 3, p. 287–308, 2005.

YOON, S.-D.; KIM, A.-J.; BYUN, H.-S. Phase behavior for the poly[2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate] and 2-(2-ethoxyethoxy)ethyl acrylate in supercritical solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 86, p. 41– 48, 2014.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. coord. Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4 ed, 1ed digital. São Paulo, 2008. 1020p.

ZUIDAM, N. J.; NEDOVIĆ, V. A. (Ed.) **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing.** New York: Springer, 2009. 400p.

9 APÊNDICES E ANEXOS

ANEXO A – Autorização de atividades com finalidade científica expedida pelo IBAMA/ IMCBio.

ANEXO B - Cromatogramas de íons totais da análise de esqualeno dos óleos de fígado de beijupirá.

APÊNDICE A – Valores do índice de esqualeno (mg/ 100g de óleo) presentes nas micropartículas presentes em micropartículas acondicionadas em dias diferentes

APÊNDICE B - Análise de variância ANOVA de todos os resultados tratados estatisticamente.

APÊNDICE B – Produção científica associada a esta tese de Doutorado

ANEXO A - Autorização de atividades com finalidade científica expedida pelo IBAMA/ IMCBio.

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39707-2	Data da Emissão: 30/06/2014 16:15	Data para Revalidação*: 30/07/2015

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS	CPF: 026.109.393-29
Título do Projeto: MICROENCAPSULAÇÃO DE ESQUALENO PROVENIENTE DO ÓLEO DO FÍGADO DE TUBARÃO ATRAVÉS DA PRECIPITAÇÃO COM CO2 SUPERCRÍTICO UTILIZANDO A TÉCNICA RESS	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

SISBIO

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Possível coleta das amostras de tubarões	06/2013	06/2013
2	Composição centesimal e extração supercrítica do óleo de fígado de tubarão	07/2013	12/2013
3	Análise da quantidade de esqualeno e vitamina A presentes no óleo de tubarão e no óleo comercial	01/2014	02/2014
4	Obtenção e estudo das microcápsulas de óleo de fígado de tubarão pela técnica RESS	03/2014	11/2014

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen.
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	ALESSANDRA LOPES DE OLIVEIRA	COORDENADORA DO PROJETO	145.398.818-17	19605707 SSP-SP	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		PE	Recife	Fora de UC Federal

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 18576278

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39707-2	Data da Emissão: 30/06/2014 16:15	Data para Revalidação*: 30/07/2015

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS	CPF: 026.109.393-29
Título do Projeto: MICROENCAPSULAÇÃO DE ESQUALENO PROVENIENTE DO ÓLEO DO FÍGADO DE TUBARÃO ATRAVÉS DA PRECIPITAÇÃO COM CO2 SUPERCRÍTICO UTILIZANDO A TÉCNICA RESS	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

SISBIO

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Elasmobranchii
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Elasmobranchii
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Elasmobranchii (*Qtde: 10)

* Quantidade de indivíduos por espécie, por localidade ou unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Peixes)	Fragmento de tecido/órgão, Outras amostras biológicas(FIGADO)
2	Método de captura/coleta (Peixes)	Espinhel de fundo, Outros métodos de captura/coleta(Caso o espinhel de fundo nao de certo, serao utilizados outros metodos igualmente adequados.)

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 18576278

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39707-2	Data da Emissão: 30/06/2014 16:15	Data para Revalidação*: 30/07/2015

* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.

Dados do titular

Nome: DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS	CPF: 026.109.393-29
Título do Projeto: MICROENCAPSULAÇÃO DE ESQUALENO PROVENIENTE DO ÓLEO DO FÍGADO DE TUBARÃO ATRAVÉS DA PRECIPITAÇÃO COM CO2 SUPERCRÍTICO UTILIZANDO A TÉCNICA RESS	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

SISBIO

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

Código de autenticação: 18576278

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 39707-2	Data da Emissão: 30/06/2014 16:15	Data para Revalidação*: 30/07/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: DÉBORA NASCIMENTO E SANTOS	CPF: 026.109.393-29
Título do Projeto: MICROENCAPSULAÇÃO DE ESQUALENO PROVENIENTE DO ÓLEO DO FÍGADO DE TUBARÃO ATRAVÉS DA PRECIPITAÇÃO COM CO2 SUPERCRÍTICO UTILIZANDO A TÉCNICA RESS	
Nome da Instituição : Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos	CNPJ: 63.025.530/0097-56

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

SISBIO

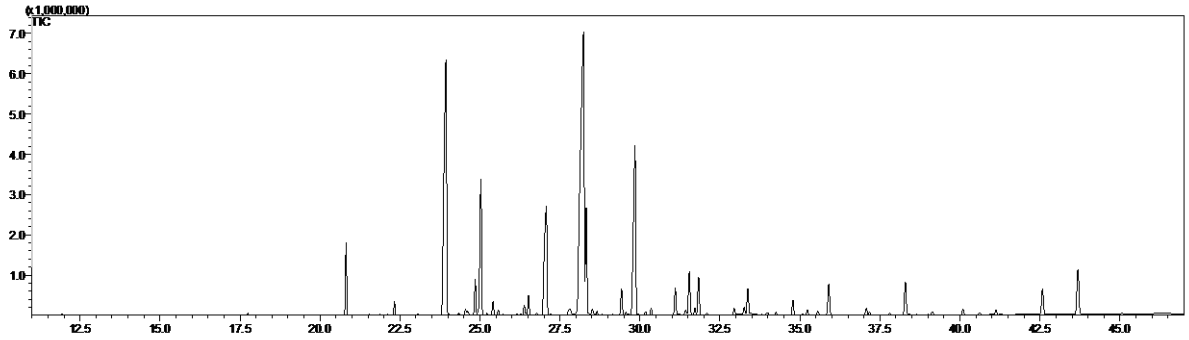
Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

SISBIO

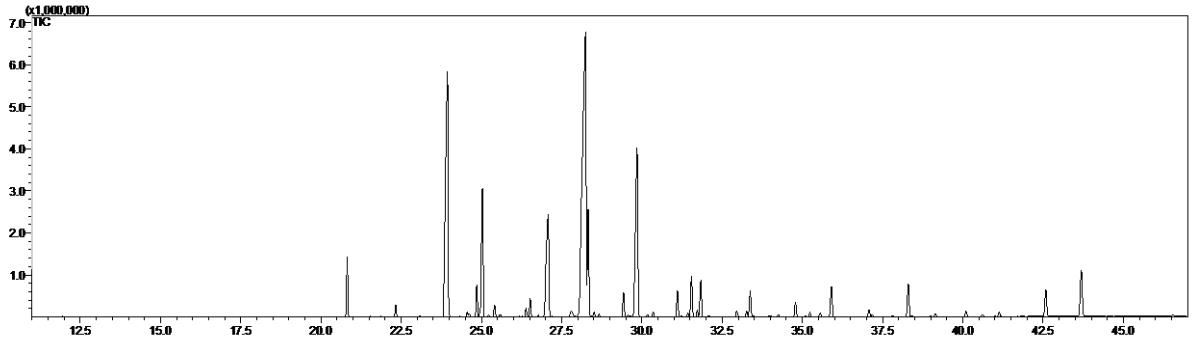
Código de autenticação: 18576278

ANEXO B - Cromatograma de íons totais (TIC, em inglês) referentes às análises do perfil de ácidos graxos e de esqualeno em óleo de fígado de beijupirá.

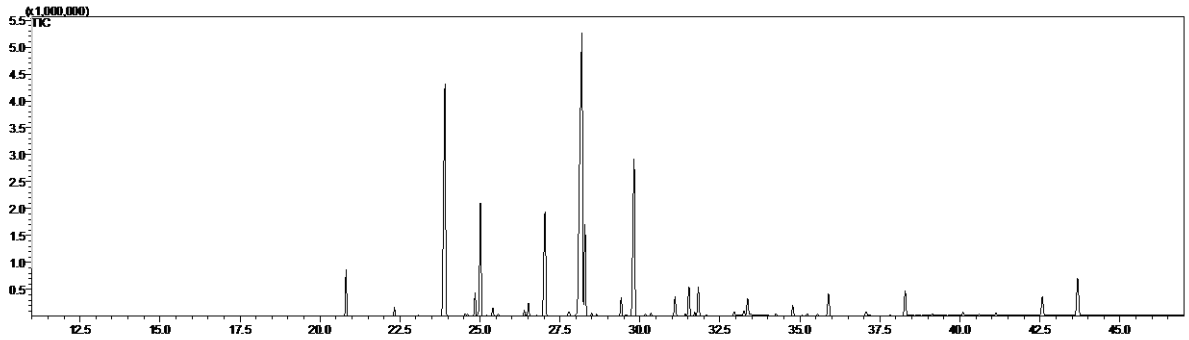
TIC do perfil de ácidos graxos do OFB obtidos por SFE a 50 °C.



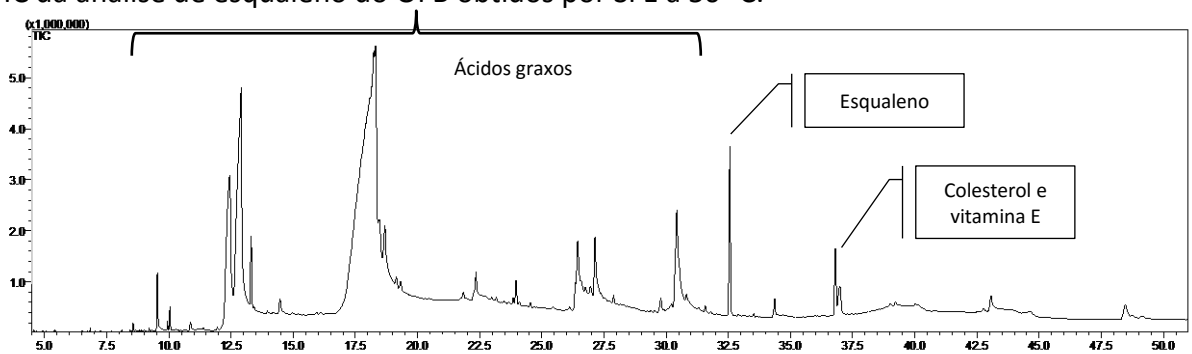
TIC do perfil de ácidos graxos do OFB obtidos por SFE a 60 °C.



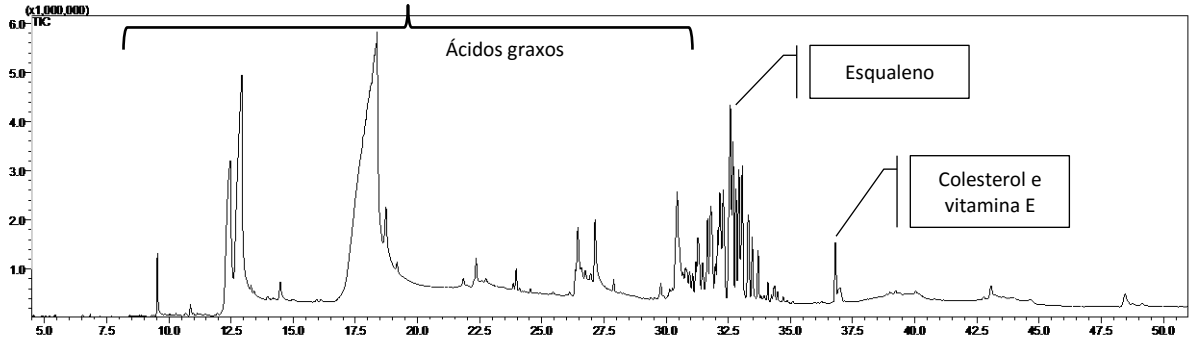
TIC do perfil de ácidos graxos do OFB obtidos por SFE a 70 °C.



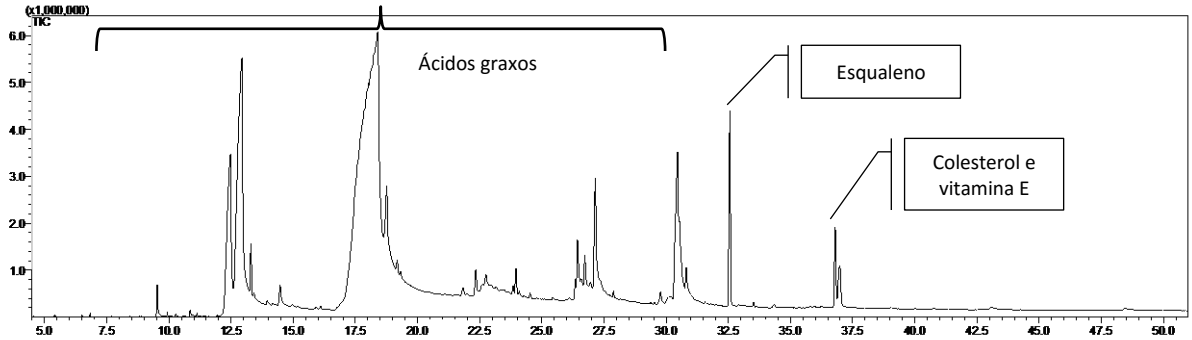
TIC da análise de esqualeno do OFB obtidos por SFE a 50 °C.



TIC da análise de esqualeno do OFB obtidos por SFE a 60 °C.



TIC da análise de esqualeno do OFB obtidos por SFE a 70 °C.



APÊNDICE A – Valores do índice de esqualeno (mg/ 100g de óleo) presentes nas micropartículas presentes em micropartículas acondicionadas em dias diferentes

	0 dia	10 dias	20 dias	30 dias	45 dias	60 dias
Hi Cap® 100/40 °C	219,13 ± 10,96^{aA}	94,53 ± 14,93^{bB}	85,46 ± 12,77^{bA}	29,26 ± 17,03^{cB}	26,70 ± 5,24^{cB}	16,23 ± 3,66^{cB}
Hi Cap® 100/60 °C	163,57 ± 17,72^{aA}	144,98 ± 24,27^{abB}	112,11 ± 7,23^{abA}	107,84 ± 0,91^{bcAB}	43,02 ± 27,74^{cAB}	32,77 ± 0,83^{cB}
Purity Gum Ultra®/40 °C	246,21 ± 44,90^{aA}	180,60 ± 7,28^{bAB}	138,83 ± 9,12^{bcA}	106,7 ± 10,97^{bcA}	94,18 ± 13,07^{bcAB}	22,33 ± 5,84^{cB}
Purity Gum Ultra®/60 °C	312,95 ± 21,24^{aA}	180,12 ± 21,96^{abB}	178,43 ± 19,83^{abA}	163,12 ±46,55^{bA}	121,02 ± 1,41^{bA}	99,59 ± 1,02^{bA}

Valores seguidos de letras minúsculas diferentes na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha indicam diferença estatística ($p<0,05$) para o teste de Tukey.

APÊNDICE B – Análise de variância ANOVA de todos os resultados tratados estatisticamente.

Apêndice B1 - Análise de variância ANOVA do rendimento de OFB aplicando diferentes temperaturas.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
R^1	76,45	2	38,23	8,50	3	2,84	13,47	0,04
R^2	353,44	2	176,72	84,82	3	28,27	6,25	0,08
R^3	106,43	2	53,21	8,57	3	2,86	18,61	0,02

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
R^1 - rendimento de OFB aplicando diferentes temperaturas.
R^2 - rendimento de OFB aplicando diferentes vazões a 50 °C.
R^3 - rendimento de OFB aplicando diferentes vazões a 60 °C.

Apêndice B2 - Análise de variância ANOVA dos parâmetros físico-químicos e de esqualeno de OFB.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
IR 25 °C	0,000002	2	0,000001	0,000006	3	0,000002	0,54	0,62
IR 40 °C	0,000000083	2	0,000000042	0,0000013	3	0,0000004	0,10	0,91
IA	16,90	2	8,45	11,84	3	1,9	4,28	0,06
IO	276,15	2	138,07	131,19	6	21,86	6,31	0,09
IS	86,98	2	43,49	953,14	6	158,85	0,27	0,76
Esqualeno	14136,11	2	7068,05	398,33	3	132,77	53,23	0,004

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
IR 25°C – índice de refração do OFB mensurado a 25 °C.
IR 40°C – índice de refração do OFB mensurado a 40 °C.
IA – índice de acidez do OFB.

Apêndice B3 - Análise de variância ANOVA do rendimento e dos parâmetros físico-químicos do OFCA.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
RG	12268,54	9	1363,171	185,72	17	10,92496	124,7759	0,000000
RE	12256,88	9	1361,876	119,83	17	7,048739	193,2084	0,000000
ρ 25 °C	0,000007	5	0,000001	0,000020	12	0,000002	0,901	0,511
ρ 40 °C	0,000006	5	0,000001	0,000019	12	0,000002	0,804	0,568
η 25°C	40,71	5	8,14	31,89	12	2,66	3,06	0,052
η 40°C	20,41	5	4,08	30,07	12	2,51	1,62	0,23
IR 25 °C	0,000014	5	0,000003	0,000007	12	0,000001	5,22	0,008
IR 40 °C	0,000005	5	0,000001	0,000009	12	0,000001	1,26	0,34
IA	5,85	6	0,97	0,42	14	0,03	32,33	0,000000
IS	363198,6	6	60533,09	906,75	14	64,77	934,58	0,000000
IO	5481,74	6	913,62	1240,76	14	88,62	10,31	0,00018
IP	315,42	6	52,57	395,69	14	28,26	1,86	0,16

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
RG – rendimento global da extração.
RE – rendimento da extração.
ρ - densidade das amostras de OFCA mensurados a 25 e 40 °C.
η - viscosidade do OFCA mensurado a 25 e 40 °C.
IR – índice de refração do OFCA mensurado a 25 e 40 °C.
IA – índice de acidez das amostras de OFCA.
IS – índice de saponificação das amostras de OFCA.
IO – índice de iodo das amostras de OFCA.
IP – índice de peróxido das amostras de OFCA.

Apêndice B4 - Análise de variância ANOVA dos valores de ácido graxos saturados nas amostras de OFCA obtidas via SFE e OFTC.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
14:0	28,26	6	4,71	1,43	7	0,20	23,04	0,0002
15:0	5,72	6	0,95	0,45	7	0,06	14,71	0,0018
16:0	508,90	6	84,82	23,88	7	3,41	24,86	0,0002
17:0	3,11	6	0,52	0,13	7	0,018	28,43	0,0001
18:0	38,51	6	6,42	1,73	7	0,25	25,87	0,0002

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
Todos os ácidos graxos estão apresentados em g/ 100g.

Apêndice B5 - Análise de variância ANOVA dos valores de ácido graxos poli-insaturados ω-3 nas amostras de OFCA obtidas via SFE e OFTC.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
18:2n-6	7,30	6	1,22	1,19	7	0,17	7,13	0,01
20:2n-6	11,00	4	2,75	9,28	5	1,86	1,48	0,33
20:4n-6	7,48	5	1,50	0,23	6	0,04	38,32	0,0002
22:5n-6	4,04	5	0,81	0,30	6	0,05	15,86	0,002

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
Todos os ácidos graxos estão apresentados em g/ 100g.

Apêndice B6 - Análise de variância ANOVA dos valores de ácido graxos monoinsaturados nas amostras de OFCA obtidas via SFE e OFTC.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
16:1n-7	14,37	6	2,39	2,03	7	0,29	0,0002	0,006
16:1n-9	60,72	6	10,12	2,40	7	0,34	29,53	0,0001
17:1n-9	0,98	4	0,25	0,17	5	0,03	7,15	0,03
18:1n-9	301,63	6	50,27	19,25	7	2,75	18,28	0,0005
18:1n-9t	26,45	7	4,41	9,14	7	1,30	3,37	0,068
20:1n-9	2,63	4	0,65	0,11	5	0,022	29,67	0,001
20:1n-9	22,17	6	3,69	9,85	7	1,40	2,63	0,12
22:1n-9	23,21	6	3,87	3,08	7	0,44	8,79	0,005
24:1n-9	7,97	5	1,59	1,02	6	0,17	9,41	0,008

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
Todos os ácidos graxos estão apresentados em g/ 100g.

Apêndice B7 - Análise de variância ANOVA dos valores de esqualeno e vitamina A nas amostras de OFCA obtidas via SFE e OFTC.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
Esqualeno	922182,3	6	153697,0	277,29	14	19,81	7759,69	0,000000
Vitamina A	17581699	6	2930283	325481,5	7	46497,35	63,02043	0,000010

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
Esqualeno – mg/ 100 g de óleo.
Vitamina A – Retinol equivalente.

Apêndice B8 - Análise de variância ANOVA dos parâmetros de caracterização das micropartículas de OFCA.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
Umidade	58,75	5	11,75	0,93	6	0,15	76,08	0,000024
a_w	0,019	5	0,003	0,00036	6	0,000061	64,90	0,000038
Higroscopidade	111,55	5	22,31	0,027	6	0,0046	4849,02	0,00000
Solubilidade	416,96	5	83,39	52,99	6	8,83	9,44	0,00824
RO	74,813	3	24,93	30,756	4	7,68	3,2432	0,14

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.

Apêndice B9 - Análise de variância ANOVA do parâmetro de cor L* nas micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes dias de acondicionamento.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
0 dias	192,25	3	64,08	0,012	8	0,0015	42023,19	0,000000
10 dias	44,83	3	0,24	0,247	8	0,030	483,67	0,000000
20 dias	416,24	3	138,74,	0,052	8	0,006	21373,44	0,000000
30 dias	346,56	3	115,52	0,663	8	0,082	1393,93	0,000000
45 dias	563,97	3	187,99	1,47	8	0,184	1020,96	0,000000
60 dias	305,85	3	101,95	28,082	8	3,51	29,04	0,000119

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.

Apêndice B10 - Análise de variância ANOVA do parâmetro de cor L* nas micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes polímeros e temperaturas de processo.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
Purity Gum Ultra®/ 40 °C	26,0848	5	5,21	0,16	12	0,013	388,36	0,000000
Purity Gum Ultra®/ 60 °C	165,80	5	33,16	0,104	12	0,008	3809,03	0,000000
Hi Cap® 100/ 40 °C	1085,36	5	217,07	28,5131	12	2,37	91,357	0,000000
Hi Cap® 100/ 60 °C	312,55	5	62,51	1,75	12	0,14	4428,341	0,000000

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando p<0,05.

Apêndice B11 - Análise de variância ANOVA do parâmetro de cor a* nas micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes dias de acondicionamento.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
0 dias	2,45	3	0,818	0,00033	8	0,000042	19634,67	0,000000
10 dias	1,06	3	0,35	0,0021	8	0,000267	1328,58	0,0000000
20 dias	46,41	3	15,46	0,0031	8	0,00039	33493,58	0,0000000
30 dias	45,094	3	15,03	0,0236	8	0,0029	5081,10	0,0000000
45 dias	86.6564	3	28,88	0,0217	8	0,0027	10632,70	0,0000000
60 dias	81,0079	3	27,00	6,6066	8	0,82582	32,6977	0,00007

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando p<0,05.

Apêndice B12 - Análise de variância ANOVA do parâmetro de cor a* nas micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes polímeros e temperaturas de processo.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
Purity Gum Ultra®/ 40 °C	7,60	5	1,52	0,008	12	0,00072	2089,78	0,000000
Purity Gum Ultra®/ 60 °C	12,90	5	2,58	0,013	12	0,00112	2310,92	0,000000
Hi Cap® 100/ 40 °C	234,69	5	46,93	1,200	12	0,10000	469,03	0,000000
Hi Cap® 100/ 60 °C	75,14	5	15,03	5,434	12	0,45287	33,18	0,000001

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando p<0,05.

Apêndice B13 - Análise de variância ANOVA do parâmetro de cor b* nas micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes dias de acondicionamento.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
0 dias	333,7062	3	111,2354	0,00553	8	0,0066	160822,2	0,000000
10 dias	35,1531	3	11,7177	0,0344	8	0,0043	2725,05	0,000000
20 dias	979,4136	3	326,4712	0,1003	8	0,0125	26030,93	0,000000
30 dias	186,8772	3	62,2924	0,8639	8	0,108	576,87	0,000000
45 dias	476,3029	3	158,7676	2,3267	8	0,291	545,89	0,000000
60 dias	347,3837	3	115,7946	114,2637	8	14,282	8,11	0,08269

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando p<0,05.

Apêndice B14 - Análise de variância ANOVA do parâmetro de cor b* nas micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes polímeros e temperaturas de processo.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
Purity Gum Ultra®/ 40 °C	567,94	5	113,58	0,29	12	0,024	4729,55	0,000000
Purity Gum Ultra®/ 60 °C	907,64	5	181,52	0,15	12	0,012	14652,52	0,000000
Hi Cap® 100/ 40 °C	1617,40	5	323,48	114,61	12	9,551	33,87	0,000001
Hi Cap® 100/ 60 °C	1436,94	5	287,38	2,54	12	0,2117	1356,96	0,000000

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando p<0,05.

Apêndice B15 - Análise de variância ANOVA do índice de peróxido de micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes dias de acondicionamento.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
0 dias	34085,31	3	170,45	11361,77	4	42,61	266,63	0,000046
10 dias	85604,77	3	28534,92	1923,09	4	480,77	59,32	0,00089
20 dias	143652,2	3	47884,07	335,71	4	83,92	570,53	0,00001
30 dias	16689,01	3	5563,00	3322,33	4	830,58	6,70	0,048
45 dias	257133,3	3	85711,11	15322,58	4	3830,64	22,37	0,006
60 dias	28521,06	3	9507,02	8128,21	4	2032,05	4,67	0,085

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando p<0,05.

Apêndice B16 - Análise de variância ANOVA do índice de peróxido de micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes polímeros e temperaturas de processo.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
Purity Gum Ultra®/ 40 °C	46297,30	5	9259,46	2664,54	6	444,09	20,85	0,00094
Purity Gum Ultra®/ 60 °C	58962,40	5	11792,48	1915,44	6	319,24	36,94	0,00029
Hi Cap® 100/ 40 °C	522253,5	5	104450,7	19080,7	6	3180,11	32,85	0,00027
Hi Cap® 100/ 60 °C	486518,2	5	97303,64	5541,72	6	923,62	105,35	0,000009

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.

Apêndice B17 - Análise de variância ANOVA dos teores de esqualeno de micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes dias de acondicionamento.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
0 dias	6598,73	3	2199,57	2910,34	4	727,58	3,02	0,156
10 dias	11227,77	3	3742,59	943,99	4	235,99	15,85	0,011
20 dias	8554,78	3	2851,59	2558,35	4	639,58	4,45	0,091
30 dias	10167,73	3	3389,24	828,49	4	207,12	16,36	0,011
45 dias	10683,16	3	3561,05	1535,37	4	383,84	9,27	0,028
60 dias	8478,96	3	2826,32	71,38	4	17,85	158,37	0,00013

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.
Esqualeno – mg/ 100 g de óleo.

Apêndice B18 - Análise de variância ANOVA dos teores de esqualeno de micropartículas de OFCA analisadas durante 60 dias de acondicionamento. Teste estatístico realizado tomando-se diferentes polímeros e temperaturas de processo.

Resposta	SQ efeito	GL Efeito	QM Efeito	SQ Resíduo	QL Resíduo	QM Resíduo	F_{cal}	p
Purity Gum Ultra®/ 40 °C	58525,05	5	11705,85	891,85	6	148,64	148,74	0,000022
Purity Gum Ultra®/ 60 °C	28704,43	5	5740,89	1898,65	6	316,44	316,44	0,0014
Hi Cap® 100/ 40 °C	55667,23	5	11133,45	2838,94	6	473,15	23,53	0,0007
Hi Cap® 100/ 60 °C	27184,43	5	5436,89	3218,48	6	536,41	10,13	0,0068

SM- soma dos quadrados; GL- graus de liberdade; QM- quadrado médio. Resposta apresenta diferença significativa quando $p<0,05$.

APÊNDICE C - Produção científica associada a esta tese de Doutorado.

Apresentação de trabalhos em congressos:

1. TAKAHASHI, E. H.; VERDE, A. B.; SANTOS, D.N.; OLIVEIRA, A.L. **Extração de óleo de fígado beijupirá (*Rachycentrum canadum*) com CO_2 supercrítico.** in: 21° Simpósio Internacional de Iniciação Científica da USP SIICUSP, 2013, São Carlos. Anais do 21° SIICUSP, 2013.
2. SANTOS, D. N.; SILVA, F. S.; FERREIRA, N. J.; OLIVEIRA, A. L. **Microparticles Formation of Shark Liver Oil Through Supercritical Process PGSS.** In: 2nd Latin America Symposium on Encapsulation, 2014, João Pessoa. Proceedings of 2nd Latin America Symposium on Encapsulation, 2014. p. 92-93.
3. VERDE, A. B.; SANTOS, D. N.; OLIVEIRA, A. L. **Physicochemical Profile of Blue Shark Liver Oil Obtained by Extraction with Supercritical CO_2.** In: International Congress on Engineering Food, 2015, Québec City. Proceedings of ICEF12, 2015. p. 11.
4. SILVA, F. S.; OLIVEIRA, A.L.; SANTOS, D. N.; FERREIRA, N. J. **Microencapsulação de Óleo de Fígado de Cação azul (*Prionace Glauca*) Utilizando CO_2 Supercrítico.** In: 22º Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da USP SIICUSP, 2014, São Paulo. Anais do 22° SIICUSP, 2014.
5. SANTOS, D. N.; REGO, M. G.; OLIVEIRA, A. L. **Bioactive compounds in blue shark liver oil obtained by supercritical CO_2 extraction.** In: 29th EFFoST International Conference, 2015, Athens. 29th EFFoST International Conference Proceedings. Athens, 2015. v. II. p. 1017-1017.
6. SANTOS, D. N.; VARGAS, S. C.; OLIVEIRA, A. L. **Extraction of cobia liver oil using supercritical CO_2: Physicochemical characterization and fatty acids profile.** In: 29th EFFoST International Conference, 2015, Athens. 29th EFFoST International Conference Proceedings. Athens, 2015. v. II. p. 1381-1382.

Prêmios recebidos:

1. Destaques IC/IT do 22° SIICUSP (Recebido pela aluna Franciely Stefani da Silva), Universidade de São Paulo, Pró-Reitoria de Pesquisa.

2. Terceiro Lugar Apresentações Orais do 1° Encontro da Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da FZEA/USP, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, 2015.

Artigos enviados para submissão:

Débora Nascimento e Santos, Eliane Hissae Takahashi, Alessandra Barros Verde, Alessandra Lopes de Oliveira. **Supercritical extraction of cobia (*Rachycentron canadum*) liver oil as a new source of squalene**. Enviado para a revista Journal of Food Composition and Analysis, Elsevier, 2016.