



**DESENVOLVIMENTO DE EMULSÕES DESIDRATADAS PARA  
INCORPORAÇÃO EM SOPAS INSTANTÂNEAS**

**Núbia Oliveira Silva**

**Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do  
Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar**

**Orientadores**

Maria Filomena F. Barreiro

Isabel C.F.R. Ferreira

Ailey Aparecida C. Tanamati

**Bragança**

**2018**



## **DEDICATÓRIA**

Dedico esta Dissertação a Deus e aos meus pais e irmãos, por serem minha fonte de inspiração e por todo amor e esforço de vocês para que este meu sonho tenha se realizado.



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expor nesta secção todo o meu respeito, admiração e consideração a todas as pessoas que ao longo do meu Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar me ajudaram, direta ou indiretamente, a cumprir os meus objetivos e a realizar mais esta etapa da minha formação académica. O espaço limitado, seguramente, não me permite agradecer, como devia, porém, deixo apenas algumas poucas palavras, mas com um profundo sentimento de agradecimento.

Primeiramente agradeço a Deus, por tornar possível todo esse aprendizado e experiência vivenciados em Bragança, sempre me cuidando e me dando sabedoria em cada etapa da minha vida.

Aos meus pais José Francisco da Silva e Helena Maria de Oliveira, e aos meus irmãos que mesmo longe estiveram presentes comigo me apoiando e me incentivando, vocês são minha inspiração de luta e persistência.

Ao meu namorado Guilherme Righetto, o meu muito obrigado por todo companheirismo, carinho e compreensão.

Deixo também meus mais sinceros agradecimentos as minhas orientadoras do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Maria Filomena F. Barreiro e Isabel C.F.R. Ferreira, e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), professora Ailey A. C. Tanamati, por todos os conselhos, sugestões e ensinamentos que me foram fundamentais em todo o decorrer do nosso trabalho.

Aos meus professores da UTFPR, Odinei Hess Gonçalves e Fernanda Vitória Leimann, agradeço pela honra de poder aprender com vocês e por todas as contribuições e apoio. Meu muito obrigado a todos os investigadores do IPB, Ricardo Calhella e Isabel Fernandes, que me acolheram e contribuíram para o esclarecimento de dúvidas e a realização deste trabalho. Em especial a Carla Pereira e Lilian Barros, pela paciência e conselhos tanto profissionais como pessoais.

Ao grupo do LA LSRE-LCM e BioChemCore que me receberam, obrigada por todo o aprendizado e ajuda.

Aos meus amigos do Brasil, que cada um com seu jeito contribuiu de alguma forma para a realização deste sonho. Aos meus colegas da UTFPR, Bianca, Guilherme e Marcela, que estiveram durante toda essa jornada comigo aqui em Bragança, obrigada pelos momentos de descontração e por dividirem conhecimentos e experiências.

Agradeço também as instituições de ensino UTFPR e IPB que por meio do programa Dupla Diplomação me proporcionaram não só uma oportunidade de adquirir mais conhecimentos, mas também uma experiência de vida.

Este trabalho é financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Regional Norte 2020, no âmbito do Projeto Norte-01-0247-FEDER-024479 (projeto *Mobilizador ValorNatural*®).



## ÍNDICE

<b>DEDICATÓRIA .....</b>	<b>iii</b>
<b>AGRADECIMENTOS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>xv</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xviii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xix</b>
<b>1.INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>5</b>
2.1. Emulsões como sistemas de liberação de compostos bioativos .....	6
2.1.1. <i>Técnicas de emulsificação.....</i>	6
2.1.2. <i>Fase lipídica.....</i>	8
2.1.3. <i>Micoesteróis como Bioativos .....</i>	9
2.1.3.1. Ergosterol .....	11
2.1.3.1.1. Ergosterol como ingrediente alimentar.....	15
2.2. Desidratação por <i>spray drying</i> .....	17
2.2.1. <i>Aplicação na área alimentar.....</i>	21
2.2.1.1. Sopas Instantâneas .....	23
2.3. Delineamento experimental .....	24
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1. Padrões e Reagentes.....	31
3.2. Otimização do diâmetro e distribuição de tamanhos das gotículas da emulsão primária.....	31
3.2.1. <i>Definição dos fatores significativos para otimização do diâmetro das gotas da emulsão.....</i>	31

3.2.2. Modelagem e validação experimental do diâmetro das gotas da emulsão...	34
3.2.3. Validação experimental do modelo.....	36
3.3. Preparação das emulsões incorporando ergosterol e etapa de desidratação por spray-drying .....	36
3.4. Caracterização das microesferas .....	37
3.4.1 Rendimento do processo de produção das dispersões desidratadas (R) .....	37
3.4.2. Extração da fase óleo das dispersões desidratadas produzidas .....	37
3.4.3. Quantificação de ergosterol.....	38
3.4.4. Determinação da eficiência de encapsulação (EE).....	38
3.4.5. Caracterização do tamanho de partícula para as microesferas.....	39
3.4.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)....	39
3.4.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	39
3.4.8. Determinação da oxidação lipídica e perfis de ácidos gordos do óleo extraído das microesferas.....	39
3.5. Atividade citotóxica em células não tumorais .....	40
3.6. Desenvolvimento de preparados de sopas instantâneas incorporando .....	41
3.7. Caracterização das sopas produzidas .....	42
3.7.1. Análise das propriedades nutricionais.....	42
3.7.1.1. Composição centesimal .....	42
3.7.1.2. Açúcares livres .....	42
3.7.1.3. Ácidos gordos .....	43
3.8. Análise das propriedades citotóxicas .....	43
3.9. Análise estatística .....	43
3.10. Análise da redispersibilidade das dispersões desidratadas e sopas produzidas .	44
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>45</b>
4.1. Seleção das variáveis significativas para a produção das emulsões no delineamento experimental fatorial fracionário.....	46

4.2. Modelação matemática do diâmetro médio das gotículas mediante um delineamento composto central rotacional.....	49
4.2.1 Validação experimental do modelo matemático .....	54
4.3. Desidratação das emulsões pela técnica de <i>spray drying</i> .....	55
4.3.1. Rendimento do processo e eficiência de encapsulação .....	55
4.3.2. Quantificação do ergosterol e avaliação da atividade citotóxica das dispersões desidratadas .....	55
4.3.3. Caracterização do tamanho de partícula para as microesferas obtidas.....	56
4.3.4. Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	58
4.3.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	59
4.3.6. Determinação da oxidação lipídica do óleo extraído das microesferas.....	61
4.4. Incorporação das dispersões desidratadas nas formulações de sopas instantâneas .....	63
4.4.1. Avaliação nutricional das formulações de sopas instantâneas .....	64
4.4.2. Avaliação das propriedades citotóxicas da sopa de vegetais instantânea incorporada com as microesferas .....	67
4.5. Redispersibilidade.....	67
<b>5. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>69</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>73</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura básica do esteróide.....	11
<b>Figura 2.</b> Estrutura química da molécula de ergosterol.....	12
<b>Figura 3.</b> Imagens de microscopia ótica das emulsões produzidas de acordo com as condições experimentais do delineamento fatorial fracionário. Aumento de 40x. ....	46
<b>Figura 4.</b> Diagramas de Pareto para as respostas de $D_{\text{médio}}$ e PDI.....	48
<b>Figura 5.</b> Imagens de microscopia ótica das emulsões produzidas de acordo com as condições experimentais do delineamento composto central rotacional. Aumento de 40x. ....	50
<b>Figura 6.</b> Comparação entre os valores observados versus previstos para a variável $D_{\text{médio}}$ . ....	52
<b>Figura 7.</b> Superfície de resposta de $D_{\text{médio}}$ em função do tempo de dispersão ( $X_1$ ) e carga em óleo ( $X_2$ ) .....	53
<b>Figura 8.</b> Imagens de microscopia ótica das emulsões produzidas de acordo com as condições experimentais do delineamento composto central rotacional. Ampliação de 40x. ....	54
<b>Figura 9.</b> Cromatograma obtido por HPLC-UV do extrato das microesferas contendo ergosterol. ....	56
<b>Figura 10.</b> Distribuição do tamanho de partícula das microesferas obtidas pela técnica de <i>spray drying</i> . Distribuição em volume para as microesferas com (PCE) e sem ergosterol (PSE) (A) Distribuição em número para as microesferas com (PCE) e sem ergosterol (PSE) (B). ....	57
<b>Figura 11.</b> Espetros de infravermelho obtidos para os materiais de base (ERG, Span 20, OG, MD, Tween 20) e dispersões desidratadas (microesferas PCE e PSE). ....	58
<b>Figura 12.</b> Curvas DSC da microesfera com ergosterol (PCE) e sem ergosterol (PSE), maltodextrina (MD) e ergosterol em pó 98% (ERG). ....	60
<b>Figura 13.</b> Espetros de infravermelho obtidos para os óleos extraídos das microesferas (óleo PCE e PSE) e para o óleo de girassol. ....	61
<b>Figura 14.</b> Imagens de microscopia ótica das emulsões primárias produzidas das microesferas com e sem ergosterol (PCE e PSE) e suas respectivas redispersões, e das sopas contendo as PCE e PSE (SPCE e SPSE). Aumento de 40x. ....	68



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração de ergosterol em diferentes espécies de cogumelos comestíveis. .....	13
<b>Tabela 2.</b> Aplicações de emulsões desidratadas redispersáveis em água. ....	22
<b>Tabela 3.</b> Fatores e níveis avaliados no delineamento fatorial fracionário $3^{(3-1)}$ . ....	32
<b>Tabela 4.</b> Formulações utilizadas para produção das emulsões preparadas a partir do delineamento fatorial fracionário $3^{(3-1)}$ . ....	33
<b>Tabela 5.</b> Condições experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (Central Composite Rotational Design) com as variáveis codificadas e reais. ....	34
<b>Tabela 6.</b> Formulações utilizadas para os pontos experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional. ....	35
<b>Tabela 7.</b> Condições experimentais para a validação experimental dos modelos obtidos. .....	36
<b>Tabela 8.</b> Condições experimentais do delineamento experimental fatorial fracionário $3^{(3-1)}$ e resultados obtidos para diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ) e índice de polidispersão (PDI)...	46
<b>Tabela 9.</b> Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes ao $D_{\text{médio}}$ e PDI. ....	48
<b>Tabela 10.</b> Condições experimentais do delineamento composto central rotacional e resultados obtidos para diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ) e índice de polidispersão (PDI). ....	49
<b>Tabela 11.</b> Coeficientes de regressão obtidos para o modelo de $D_{\text{médio}}$ . ....	50
<b>Tabela 12.</b> ANOVA para o delineamento fatorial do modelo de $D_{\text{médio}}$ . ....	51
<b>Tabela 13.</b> Resultados obtidos para diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ). ....	54
<b>Tabela 14.</b> Valores de $D_{10}$ , $D_{50}$ e $D_{90}$ obtidos para as distribuições em volume e em número do tamanho de partícula. ....	57
<b>Tabela 15.</b> Composição em ácidos gordos dos óleos extraídos das microesferas (média±desvio-padrão). ....	62
<b>Tabela 16.</b> Perfil nutricional e energético das amostras de sopa de vegetais instantânea. .....	64
<b>Tabela 17.</b> Composição nutricional das sopas de vegetais instantânea comerciais por 100 g de produto. ....	65
<b>Tabela 18.</b> Composição em ácidos gordos dos produtos finais analisados (média±desvio-padrão). ....	66



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

*Parâmetros matemáticos, de equações e siglas utilizadas neste trabalho.*

<b>AG</b>	Ácido gordo
<b>A/O</b>	Água em óleo
<b>A/O/A</b>	Água/óleo/água
<b>CCD</b>	Delineamento composto central
<b>D<sub>médio</sub></b>	Diâmetro médio
<b>DS</b>	Desvio padrão
<b>E</b>	Energia
<b>EE</b>	Eficiência de encapsulação
<b>ERG</b>	Ergosterol 98%
<b>G</b>	Massa de gordura
<b>GL</b>	Grau de liberdade
<b>hc</b>	Massa de hidratos de carbono
<b>MD</b>	Maltodextrina
<b>m.e/o</b>	Razão material encapsulante/óleo
<b>ms</b>	Massa seca
<b>MSR</b>	Metodologia de Superfície de Resposta
<b>O/A</b>	Óleo em água
<b>O/A/O</b>	Óleo/ água/óleo
<b>OG</b>	Óleo de girassol
<b>p</b>	Massa de proteína
<b>PCE</b>	Partícula com ergosterol
<b>PDI</b>	Índice de polidispersão
<b>PI</b>	Padrão interno
<b>PSE</b>	Partícula sem ergosterol

<b>QM</b>	Quadrado médio
<b>R</b>	Rendimento de encapsulação
<b>SQ</b>	Soma dos quadrados
<b>SPCE</b>	Sopa contendo partículas com ergosterol
<b>SPSE</b>	Sopa contendo partículas sem ergosterol
<b>Td</b>	Tempo de dispersão
<b>Te</b>	Temperatura de entrada
<b>Ts</b>	Temperatura de saída
<b>X</b>	Variável independente em valores reais
<b>Y</b>	Variável resposta em valores reais

---

***Reagentes, padrões e linhas celulares***

<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> – “Meio Eagle modificado por Dulbecco”
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i> – “Soro Fetal Bovino”
<b>HBSS</b>	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> – “Solução Salina Equilibrada de Hank”
<b>PLP2</b>	<i>Porcine liver primary culture</i> – “cultura primária de células de fígado de porco”
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>Tris</b>	Trisaminometano

---

***Outros***

<b>DSC</b>	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> – “Calorimetria Diferencial de Varredura”
<b>FTIR</b>	<i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> – “Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier”
<b>HPLC</b>	<i>High-performance Liquid Chromatography</i> – “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”
<b>GI<sub>50</sub></b>	Concentração responsável por 50% da inibição do crescimento celular na cultura primária PLP2
<b>MUFA</b>	<i>Monounsaturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos monoinsaturados”
<b>PUFA</b>	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos polinsaturados”
<b>SFA</b>	<i>Saturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos saturados”



## RESUMO

As emulsões óleo-em-água (O/A) desidratadas são facilmente redispersáveis em água, consistindo num processo efetivo para a conservação de óleos e/ou libertação de princípios ativos. O seu processo produtivo envolve duas fases: (i) produção das emulsões e (ii) secagem (por exemplo, pela técnica de *spray-drying*). Neste trabalho produziram-se emulsões O/A utilizando água (A), óleo de girassol (OG), maltodextrina como material encapsulante (MD) e dois emulsionantes (Tween 20 e Span 20). Adicionalmente, e tendo em consideração que a incorporação de compostos bioativos pode resultar em efeitos benéficos para a saúde, testou-se a adição de ergosterol, um composto reconhecido pela sua atividade hipocolesterolémica. O trabalho teve como primeira etapa o estudo (delineamento experimental), da influência do tempo de dispersão (Td), percentagem de maltodextrina (MD, calculada relativamente à massa de água utilizada) e carga em óleo (calculada relativamente à massa de MD) no tamanho das gotículas formadas na emulsão (é desejável para uma proteção efetiva do óleo que a dispersão O/A seja suficientemente fina). Após seleção da formulação base, procedeu-se à secagem, caracterização das microesferas (microscopia ótica, tamanho de partícula, FTIR, DSC) e citotoxicidade. O sistema selecionado (carga em óleo de 32%) apresentou gotas com diâmetro micrométrico e formato esférico. As emulsões desidratadas revelaram-se facilmente redispersáveis em água. O teor de ergosterol (avaliado por HPLC-UV), conduziu a uma eficiência de encapsulação baixa (4,46%). A caracterização do óleo extraído das microesferas revelou que este não sofreu oxidação lipídica, evidenciando a eficácia do processo de encapsulação. Nos testes de incorporação em formulações de sopa instantânea não se verificaram diferenças na composição nutricional que possam resultar em alterações da qualidade funcional ou nutricional das mesmas, e não se registou hepatotoxicidade em células humanas não tumorais (PLP2, GI<sub>50</sub> > 5 mg/mL), quando adicionado o ergosterol. Em síntese, este trabalho contribuiu para o desenvolvimento de novos produtos alimentares a partir de emulsões desidratadas incorporando micoesteróis.

## ABSTRACT

The oil-in-water (O/W) dehydrated emulsions are readily redispersible in water, consisting of an effective process for the preservation of oils and/or release of active principles. Their productive process involves two phases: (i) production of the emulsions and (ii) drying (for example by the *spray-drying* technique). In this work, O/W emulsions were made using water (A), sunflower oil (OG), maltodextrin as encapsulating material (MD) and two emulsifiers (Tween 20 and Span 20). In addition, and taking into account that the incorporation of bioactive compounds may result in health benefits, the addition of ergosterol, a compound recognized for its hypocholesterolemic activity, has been tested. The study had as the first step the study (experimental design), the influence of the dispersion time (Td), percentage of maltodextrin (MD, calculated relative to the weight of used water) and load in oil (calculated relative to MD weight) in the size of the formed emulsion droplets (it is desirable for an effective oil protection that the O/W dispersion is sufficiently fine). After selection of the base formulation, the microparticles were dried, characterized (optical microscopy, particle size, FTIR, DSC) and cytotoxicity. The selected system (oil load of 32%) presented droplets with micrometric diameter and spherical shape. The dehydrated emulsions were readily redispersible in water. The ergosterol content (evaluated by HPLC-UV), led to a low encapsulation efficiency (4.46%). The characterization of the oil extracted from the microspheres revealed that it did not undergo lipid oxidation, evidencing the effectiveness of the encapsulation process. In the incorporation tests for the development of instant soup formulations no differences in the nutritional composition, imparting changes in the functional or nutritional quality, were detected, and no hepatotoxicity was observed in human non-tumor cells (PLP2, GI<sub>50</sub> > 5 mg/mL), when ergosterol is added. In summary, this work contributed to the development of new food products from dehydrated emulsions incorporating mycoesterols.

# 1. INTRODUÇÃO



## **Motivação e objetivos**

As emulsões óleo-em-água (O/A) desidratadas são produtos que podem ser facilmente redispersáveis em água. Consistem num processo efetivo para a conservação de óleos e/ou libertação de princípios ativos.

O cogumelo *Agaricus bisporus*, além de ser o mais cultivado em todo o mundo também apresenta um elevado valor nutricional, medicinal e propriedades bioativas, principalmente devido ao ergosterol, esteroide maioritário nesta espécie. Desta forma, o desenvolvimento de um produto enriquecido com um composto que apresente efeitos bioativos de interesse, como atividade antioxidante, antitumoral, antiinflamatória e hipocolesterolêmica, proporcionaria aos consumidores efeitos benéficos à saúde.

Estes produtos podem ser úteis para a formulação de sopas instantâneas. Assim, o desenvolvimento de alimentos incorporados com óleo de girassol enriquecido com ergosterol sob a forma de dispersões desidratadas, poderá também contribuir para a elaboração de alimentos funcionais de acordo com os requisitos de consumidores e mercados atuais.

### **Objetivo geral:**

Desenvolver uma emulsão desidratada contendo óleo de girassol, e testar o seu enriquecimento com ergosterol, para incorporação em preparados de sopas instantâneas.

### **Objetivos específicos:**

- Estudar, utilizando um delineamento experimental, a influência do tempo de dispersão (Td), percentagem de maltodextrina (MD, calculada relativamente à massa de água utilizada) e carga em óleo (calculada relativamente à massa de MD) no tamanho das gotículas formadas na emulsão;
- Produzir as emulsões (com e sem ergosterol) e proceder à sua desidratação utilizando a técnica de *spray drying*;

- Caracterizar o processo de microencapsulação quanto ao rendimento e eficiência de encapsulação e caracterizar as microesferas obtidas quanto ao tamanho de partícula, análise térmica (DSC), análise química/estrutural (FTIR) e citotoxicidade;
- Caracterização do óleo encapsulado quanto à oxidação lipídica;
- Incorporar as dispersões desidratadas em formulações de sopas instantâneas, realizar estudos nutricionais e de citotoxicidade dos produtos desenvolvidos;
- Avaliação das propriedades de redispersão das dispersões desidratadas, diretamente, e quando incorporadas nas formulações de sopas instantâneas.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

## **2.1. Emulsões como sistemas de libertação de compostos bioativos**

### ***2.1.1. Técnicas de emulsificação***

Segundo Karunaratne, Pamunuwa e Ranatunga (2017), uma emulsão é uma dispersão de gotículas de um líquido num segundo líquido imiscível. As gotículas são denominadas de fase dispersa, enquanto o segundo líquido é a fase contínua. Existem dois tipos de emulsões: água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A). Como o nome indica, a água é a fase dispersa em emulsões A/O, enquanto o óleo é a fase dispersa em emulsões O/A. Os sistemas de distribuição coloidais, como as emulsões O/A, são sistemas de encapsulação adequados para a proteção de componentes com carácter lipofílico, facilitando a sua introdução em matrizes alimentares hidrofílicas (MCCLEMENTS; LI, 2010).

As emulsões múltiplas possuem uma estrutura mais complexa que as emulsões simples. Os tipos mais comuns são água/óleo/água (A/O/A) e óleo/ água/óleo (O/A/O) (BOUYER *et al.*, 2012). Este tipo de emulsão é relativamente complexo e propenso a várias vias de degradação física, mas ainda assim, existem algumas vantagens relativamente às emulsões simples. São essencialmente importantes quando se pretende proteger e/ou proporcionar libertação controlada de componentes que possuem a mesma natureza da matriz onde vão ser incorporados ou, numa etapa prévia à encapsulação, é necessário encapsular o princípio ativo com uma matriz polimérica da mesma natureza. Possuem também excelente capacidade de libertação controlada dos compostos ativos aprisionados, assim como garantem também a proteção das espécies encapsuladas da degradação (BONNET *et al.*, 2010).

As emulsões O/A biofuncionais podem ser mantidas por solubilização dos componentes hidrofóbicos na fase óleo, sendo esta então dispersa na fase aquosa na forma de gotículas por um processo de homogeneização. O tamanho das gotículas é crítico para a estabilidade do sistema e é comumente usado para distinguir as emulsões convencionais ( $r > 100$  nm) das nanoemulsões ( $r < 100$  nm) (AHMED *et al.*, 2012).

As nanoemulsões, também conhecidas como emulsões dispersas finas e emulsões submicrométricas, não são termodinamicamente estáveis como o caso das designadas por “microemulsões” (TADROS *et al.*, 2004). Estas são produzidas por técnicas de microfluidização ou formação de micelas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007) e se apresentam como um sistema potencial para melhorar a solubilidade e aumentar a biodisponibilidade dos compostos bioativos dos alimentos (FLANAGAN; SINGH, 2006). A principal particularidade das nanoemulsões é a grande estabilidade da suspensão de gotículas, tornando-os os principais candidatos à engenharia de nanopartículas, (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

As técnicas à base de emulsões O/A ou A/O foram utilizadas com sucesso para encapsular compostos bioativos, incluindo ácidos gordos (AUGUSTIN *et al.*, 2011), vitaminas (CHEN; SUBIRADE, 2006), compostos fenólicos (PAN *et al.*, 2014), antocianinas (VIDAL; AVELLO; LOYOLA, 2013) e óleos (GUPTA; GHOSH, 2014). Deste modo, o princípio ativo a ser encapsulado, quando apresentar propriedades hidrofóbicas, geralmente é disperso na fase lipídica com a qual deve ser compatível. Portanto, é recomendável a realização de um *screening* para selecionar os lípidos mais apropriados. Normalmente são utilizados lípidos de origem natural por serem considerados seguros para o consumo humano, os quais são facilmente digeridos e absorvidos (RAHMAN *et al.*, 2013).

Dependendo da aplicação do produto final a fase lipídica pode ser sólida ou líquida à temperatura ambiente. Porém, as matrizes líquidas são físico-química e microbiologicamente mais instáveis que as respectivas formas sólidas. Além disso, as emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis. A desidratação de emulsões surge como uma estratégia interessante que permite aumentar sua estabilidade e, conseqüentemente, o tempo de armazenamento. Uma vez no estado sólido, as emulsões podem ser facilmente redispersas no momento do uso (DOLLO *et al.*, 2003).

Portanto, para a sua aplicação em matrizes alimentares, os sólidos obtidos também devem apresentar afinidade com o meio. Neste contexto, a utilização de um material de parede redispersável em água, como a maltodextrina, constitui um passo importante do processo. Adicionalmente, viabiliza-se a aplicação de uma emulsão desidratada e redispersável em água, constituída de um óleo alimentar, que conjugado com a utilização de um composto bioativo (micoesteróis) como princípio ativo, constitui um produto interessante para utilização na formulação de sopas desidratadas.

### **2.1.2. Fase lipídica**

Nos alimentos, os lípidos estão frequentemente presentes como uma fase dispersa, numa matriz alimentar contínua formada principalmente de água, hidratos de carbono e proteínas. Fontes comuns de lípidos na nossa dieta são emulsões O/A típicas de alimentos líquidos e semi-líquidos como leite, fórmulas infantis, iogurte, maionese, molhos de salada, entre outros (BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014).

Os lípidos alimentares são geralmente compostos insolúveis em água referidos como gorduras (sólidos) ou óleos (líquidos) indicando o seu estado físico à temperatura ambiente. Os lípidos alimentares também são classificados como não polares (por exemplo, triacilglicerol e colesterol) e lipídios polares (por exemplo, fosfolípidos) para indicar diferenças na sua solubilidade e propriedades funcionais. Estes desempenham um papel importante na qualidade sensorial dos alimentos contribuindo para atributos como textura, sabor, nutrição e densidade calórica (WIJAYA; WIJAYA; MEHTA, 2015).

É possível também encontrar lípidos dispersos, para além de alimentos líquidos e semilíquidos, em alimentos sólidos, como por exemplo produtos de cereais como pão e cereais para pequeno-almoço (BERTON-CARABIN; ROPERS; GENOT, 2014). Outro exemplo de sistemas de alimentos sólidos com lípidos dispersos são os óleos alimentares microencapsulados (JACKSON; LEE, 1991), geralmente utilizados na fabricação de sopas desidratadas. Estes são alimentos tipicamente conservados a baixas temperaturas, permitindo uma vida útil longa se armazenados nas condições corretas (SCHAICH *et al.*, 2015). Alguns exemplos desses óleos secos, disponíveis na literatura incluem os óleos de linhaça, peixe, macadâmia e soja (RUBILAR *et al.*, 2012).

Para a seleção do óleo a ser encapsulado, a viscosidade é um fator importante a se considerar, uma vez que tem relação direta com o diâmetro da gota formada e que vai ser atomizada. As viscosidades elevadas interferem no processo de atomização e levam à formação de gotículas alongadas, de grande dimensão e que afetam a taxa de desidratação. Desta forma é necessário controlar a concentração de sólidos na formulação a atomizar que, ao baixar, diminui muito o rendimento do processo (APUD GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Além desse fator, o óleo escolhido deve apresentar compatibilidade com o princípio ativo a ser encapsulado.

### ***2.1.3. Micoesteróis como Bioativos***

No século XXI, os compostos bioativos emergiram como agentes terapêuticos benéficos para a saúde, potenciando o *design* de novos suplementos e alimentos funcionais (SHARMA; SINGH, 2010). O interesse por compostos bioativos continua a crescer, impulsionado pelo desenvolvimento de novas tecnologias e estudos de investigação progressiva na identificação de propriedades e aplicações potenciais destas substâncias, juntamente com o interesse público e as necessidades dos consumidores (WHELEHAN; MARISON, 2011). Assim, os campos farmacêutico e alimentar compartilham o interesse conjunto para obter e caracterizar novos compostos bioativos que podem ser utilizados como fármacos, ingredientes alimentares funcionais ou nutracêuticos (SHARMA; SINGH, 2010). Também são considerados compostos viáveis e mais seguros para aplicações como substituintes de aditivos alimentares artificiais, para satisfazer a procura do mercado mundial por novos produtos (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Algumas plantas são fontes naturais de compostos bioativos, sendo estes produzidos como metabolitos secundários, provocando efeitos farmacológicos nos organismos de humanos e animais (BERNHOF, 2010). Tipicamente, os bioativos surgem em conjunto com outros compostos presentes nas plantas, podendo ser identificados em extratos de diversas partes da planta, como raízes, caules, cascas, folhas, flores, frutos e sementes (AZMIR *et al.*, 2013).

Os compostos bioativos purificados, ou os extratos concentrados de fontes naturais, podem ser incorporados com vantagem nutricional e/ou medicinal em alimentos, fornecendo novas categorias de produtos funcionais e novas oportunidades comerciais. No entanto, o desafio adicional de garantir que os ingredientes funcionais não se degradem, permanecendo ativos e biodisponíveis após o processamento e armazenamento dos alimentos, é ainda uma preocupação (DAY *et al.*, 2009).

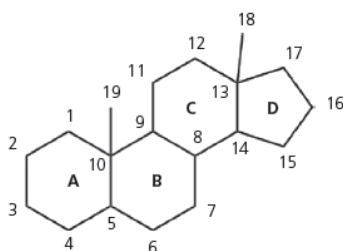
Além das plantas, os cogumelos também são ricos em compostos bioativos podendo apresentar diferentes efeitos benéficos (HELENO *et al.*, 2016). As espécies comestíveis têm sido amplamente utilizadas na alimentação humana durante séculos e têm sido apreciadas pelas suas características organolépticas. O conhecimento de que os cogumelos comestíveis são um

alimento saudável, rico em compostos bioativos com valor nutricional e medicinal, tem sido muito explorado (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005).

Em geral, os cogumelos contêm 90% de água e, dependendo da espécie, o conteúdo proteico pode variar entre 27% e 48% face à matéria seca. Com uma percentagem de hidratos de carbono inferior a 60% e um nível de lípidos residual (2-8% face à matéria seca) e baixas percentagens de sódio, estes constituem alimentos interessantes para dietas específicas (AZEVEDO; CUNHA; FONSECA, 2012).

Vários cogumelos têm sido estudados pela comunidade científica, na procura de novas alternativas terapêuticas (LINDEQUIST; NIEDERMEYER; JÜLICH, 2005), contudo, das cerca de 1800 espécies de cogumelos existentes, apenas se conhecem as propriedades medicinais de 700 delas. Reúnem uma variedade de metabolitos bioativos, como por exemplo, compostos fenólicos, policétidos, terpenos, esteroides e polissacáridos, com propriedades antioxidantes (BARROS *et al.*, 2007a), anti-hiperglicémicas (LIU *et al.*, 2012), antimicrobianas (BARROS *et al.*, 2007b), antitumorais (WASSER, 2002), anti-inflamatórias (GARCIA-LAFUENTE *et al.*, 2010), anticancerígenas (PATEL; GOYAL, 2012), entre outras. São também utilizados na prevenção de doenças como asma (LIU *et al.*, 2003), alergias alimentares (HSIEH *et al.*, 2003), dermatite atópica (KUO *et al.*, 2002) e trombose (YOON *et al.*, 2004).

Os esteróis (da palavra grega *steros*, que significa "sólido") constituem um grupo de moléculas lipossolúveis e são compostos que pertencem à classe dos esteroides, sendo constituídos por uma fusão do núcleo esteroide, resultante de quatro anéis de hidrocarbonetos dispostos em três anéis hexagonais e um pentagonal, denominado ciclopentanoperidrofenantreno, com um grupo 3 $\beta$ -hidroxilo, e uma cadeia lateral alifática adicional de 8 ou mais átomos de carbonos ligada ao núcleo esteroide na posição C17 (FAHY *et al.*, 2005). Os quatro anéis são comumente denotados pelas letras maiúsculas A, B, C e D, lendo da esquerda para a direita. Esta designação da letra do anel é usada apenas em secções de discussão para publicações, sendo que elas não apresentam nenhum papel na nomenclatura formal. Podem ser encontrados em animais, plantas, fungos e microrganismos, e designados por zooesteróis, fitoesteróis e micoesteróis, respectivamente (BARREIRA; FERREIRA, 2015). Dentre estes, os micoesteróis destacam-se por ter componentes bioativos, sendo o seu principal esteroide o ergosterol (GIL-RAMIRÉZ *et al.*, 2014; TEICHMANN *et al.*, 2007).



**Figura 1.** Estrutura básica do esteróide.

**Fonte:** Barreira e Ferreira (2015)

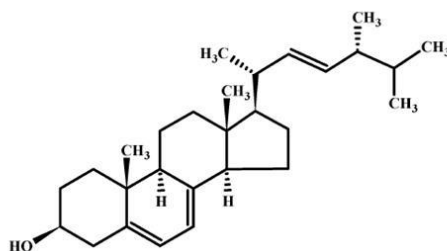
### 2.1.3.1. Ergosterol

Dentre os micoesteróis, o ergosterol está presente nas células ou membranas celulares da grande maioria dos fungos. Os maiores níveis deste composto encontram-se nas camadas fosfolipídicas da membrana fúngica (PEACOCK; GOOSEY, 1989), onde desempenha uma importante função estrutural e hormonal na progressão do ciclo celular (GOAD, 1994), como maturação, formação de hifas e esporulação (VILLARES *et al.*, 2012).

Representando cerca de 80% em massa dos esteróis encontrados em cogumelos (GIL-RAMIRÉZ *et al.*, 2014), o ergosterol também pode ser encontrado nas borras de leveduras dos vinhos, nos cogumelos, nas membranas da parede celular das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) e das mitocôndrias, sendo, também, um constituinte das membranas nos micélios, esporos e células vegetativas (PASANEN *et al.*, 1999). Para além disso, está presente em quantidades relativamente elevadas em plantas como o milho, a semente de algodão, o óleo de amendoim e a linhaça (LAGARDA; GARCÍA-LLATAS; FARRÉ, 2006).

Quimicamente, o ergosterol C-28 (**Figura 2**) tem como nome científico 5,7,22 ergostatrien-3 $\beta$ -ol, fórmula empírica C<sub>28</sub>H<sub>44</sub>O e massa molecular 396,36 g/mol. É um composto sólido, cristalino, incolor e o seu ponto de fusão é da ordem dos 161-166 °C. Adicionalmente, o ergosterol suporta a temperatura de 250 °C sem decomposição. Tem uma cadeia lateral com uma ligação dupla na posição C22 e duas ligações duplas ao nível das posições C5 e C7 (anel B) tendo uma absorção máxima no UV na gama 240-300 nm (BARREIRA; OLIVEIRA; FERREIRA, 2014). É um composto com solubilidade limitada em água, mas apresenta boa

solubilidade em alguns solventes orgânicos, como acetonitrilo, metanol e clorofórmio (VILLARES *et al.*, 2012).



**Figura 2.** Estrutura química da molécula de ergosterol.

**Fonte:** Yuan *et al.*, (2006)

É importante destacar que nem todas as espécies de fungos possuem o ergosterol C-28 como esterol constituinte. Há descrições de espécies filogeneticamente menos avançadas que sintetizam colesterol como constituinte da membrana; em outros casos, diferenças nas etapas da biossíntese podem gerar variações estruturais, como uma metilação adicional, o que leva à formação de um derivado C-29 do ergosterol (WEETE; ABRIL; BLACKWELL, 2010). Zimosterol, fungisterol, ergosta-5,7-dienol, 24-metilcolesterol e colesterol com metileno são outros exemplos de esteróis importantes nos fungos (MATTILA *et al.*, 2002).

Galea e Brown (2009) no seu trabalho de revisão, levantaram a hipótese de que o surgimento dos esteróis de membrana nos microrganismos ocorreu, pelo menos em parte, como um meio de adaptação à oxigenação atmosférica da Terra. Estudos também evidenciaram que a concentração de esteróis nos cogumelos, nomeadamente, o ergosterol, depende da parte do tecido e da fase de desenvolvimento em que o cogumelo se encontra, para além de variar de acordo com a espécie de cogumelo, como apresentado na **Tabela 1**, dentro da mesma espécie e cultivares e com a idade da cultura (JASINGHE; PERERA, 2005; PASANEN *et al.*, 1999).

**Tabela 1.** Concentração de ergosterol em diferentes espécies de cogumelos comestíveis.

Espécie	Ergosterol (mg/100 g ms)
<i>Agaricus bisporus</i>	352±1
<i>Agaricus bisporus</i> Portobello	77±1
<i>Amanita caesarea</i>	231±1
<i>Boletus edulis</i>	234±1
<i>Cantharellus cibarius</i>	234±2
<i>Fistulina hepatica</i>	129±1
<i>Flammultina velutipes</i>	189±2
<i>Lactarius deliciosus</i>	108±1
<i>Lentinus edodes</i>	217±2
<i>Macrolepiota procera</i>	55±1
<i>Morchella esculenta</i>	43±2
<i>Pleurotus eryngii</i>	187±1
<i>Pleuratus ostreatus</i>	104±1

**FONTE:** Adaptado de Barreira; Oliveira; Ferreira, (2014). ms: massa seca.

Nos fungos, o ergosterol pode ser encontrado livre ou esterificado, sendo a proporção destas duas formas variável e dependente da espécie, tecido e estágio de desenvolvimento do cogumelo (SHAO *et al.*, 2010; VILLARES *et al.*, 2012). O ergosterol livre e o ergosterol esterificado desempenham funções distintas. O ergosterol livre é mais importante para a integridade das células e contribui para uma variedade de funções celulares. No caso do *Agaricus bisporus* castanho, alguns estudos indicaram que o ergosterol na sua forma livre era a única forma presente e o principal composto da fracção lipídica responsável pela atividade antioxidante do extrato do cogumelo, verificando-se que o teor de ergosterol está positivamente relacionado com a atividade antioxidante ( $r^2 > 0,89$ ) (SHAO *et al.*, 2010). Contudo, em formulações alimentares, o problema da aplicação de esteróis na sua forma livre está relacionado com o facto de, devido à baixa solubilidade, estes terem que ser incorporados em doses elevadas para que sejam alcançados efeitos benéficos significativos no organismo (MORAN-VALERO *et al.*, 2012).

O ergosterol e os seus produtos de peroxidação são conhecidos por contribuir para potenciais benefícios para a saúde e funções fisiológicas significativas que incluem redução da inflamação relacionada com a dor, inibição das enzimas ciclo-oxigenases (COX), atividades antimicrobiana (ZHANG; MILLS; NAIR, 2002), antitumorais (FERREIRA *et al.*, 2010; TORRES *et al.*, 2017), antioxidantes (SHAO *et al.*, 2010) e hipocolesterolêmicas (GIL-RAMIRÉZ *et al.*, 2014).

Ao avaliar as atividades anti-inflamatória e antioxidante dos extratos do cogumelo comestível *Grifola frondosa*, contendo ergosterol, juntamente com os extratos miceliais, Zhang *et al.* (2002) sugeriram que o consumo de *G. frondosa* como alimento diário ou como ingrediente na preparação de alimentos pode ter efeitos benéficos na saúde. Esses benefícios podem incluir redução da dor relacionada com a inflamação, reduzindo a incidência de doença cardiovascular, e a prevenção do cancro, atuando como inibidor da atividade da enzima ciclo-oxigenase (COX), como antioxidante e / ou como agente anti-inflamatório.

A atividade antitumoral do ergosterol foi descrita pela inibição do crescimento tumoral em camundongos, por inibição direta da angiogénese induzida por tumores (KIMURA *et al.*, 2004). Este esterol também pode gerar novos produtos bioativos quando acumulado nas glândulas suprarrenais e em outros órgãos, tais como, o 17 $\alpha$ , 24 – di-hidroxi-ergosterol, que se verificou ser capaz de inibir a proliferação de células da pele, em cultura, tal como foi demonstrado em queratinócitos humanos e em linhas celulares de melanoma (SLOMINSKI *et al.*, 2005).

Diferentes estudos realizados com formulações de extrato enriquecido com ergosterol, apresentaram efeito satisfatório contra a esteatose hepática e potencial hipocolesterolemico, demonstrando a funcionalidade quando aplicadas em alimentos. Dentre eles, as frações enriquecidas de extrato de ergosterol também reduziram significativamente os níveis de triglicéridos hepáticos alterando a expressão de mRNA de genes relacionados com o colesterol, revelando um efeito potencial contra esteatose hepática (GIL-RAMIRÉZ *et al.*, 2014; GIL-RAMIRÉZ *et al.*, 2016).

Recentemente, o micosterol ergosta-4,6,8 (14), 22-tetraen-3-ona (ergona) mostrou citotoxicidade contra quatro tipos distintos de células cancerígenas, nomeadamente adenocarcinoma de mama humano, osteossarcoma humano, carcinoma de próstata humano e neuroblastoma em ratos (TORRES *et al.*, 2017).

Shimizu *et al.* (2016) investigaram o isolamento do agarol, um bioativo derivado do ergosterol, dos corpos frutíferos de *Agaricus brasilienses*, e avaliaram os efeitos citotóxicos do mesmo. De acordo com os resultados, sugeriram que este composto induz apoptose em células de carcinoma humano, indicando o uso potencial de agarol como agente anticancerígeno.

Ainda neste sentido, o ergosterol é ponto de partida para o enriquecimento nutricional de cogumelos, quando expostos à radiação ultravioleta (KALARAS *et al.*, 2012). Este processo, similar à conversão do 7-desidrocolesterol em vitamina D3 (colecalfiferol) na pele exposta à radiação solar, faz com que este esteroide seja convertido em vitamina D2 (ergocalciferol), substância análoga à vitamina D3 e com propriedades fisiológicas importantes, nomeadamente na regulação da homeostase do cálcio e ação antiproliferativa e estimuladora de diferenciação celular sobre células neoplásicas (CORCORAN *et al.*, 2016).

Taofiq *et al.* (2017) reviram os efeitos da irradiação gama e três subtipos de UV sobre a obtenção de vitamina D2 em vários cogumelos, e descreveram que os dados obtidos apresentavam uma alta taxa de conversão de ergosterol em vitamina D2 num curto período de tratamento, além de aumentar significativamente os níveis séricos de 25-hidroxivitamina D, contribuindo para a redução da deficiência de vitamina D, bem como para outros benefícios associados à promoção da saúde.

#### **2.1.3.1.1. Ergosterol como ingrediente alimentar**

Hoje em dia, a alimentação serve não apenas para satisfazer o desejo primitivo da fome, mas também para promover a saúde do consumidor. Neste contexto, a indústria alimentar concentra-se em evitar a potencial nocividade de alguns aditivos alimentares artificiais e no desenvolvimento de novos produtos alimentares que contenham ingredientes que promovam a saúde. Neste contexto, os produtos naturais bioativos são considerados como substitutos viáveis para satisfazer as necessidades do mercado mundial por novos produtos (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Com este intuito, Heleno *et al.* (2017) estudaram pela primeira vez a incorporação de extratos de *A. bisporus*, contendo ergosterol, em bebidas lácteas em concentrações que

reproduzem os fitosteróis usados em iogurtes comerciais. O iogurte enriquecido com micoesteróis foi avaliado quanto às características nutricionais e propriedades bioativas e comparado com dois controles (iogurte sem aditivos e iogurte comercial aditivado com fitoesteróis), para dois tempos de armazenamento (logo após fabricação do produto e após sete dias de armazenamento a 4 °C). O iogurte enriquecido com micoestróis mostrou propriedades antioxidantes similares às do iogurte contendo fitoesteróis.

Num estudo recente Rudke *et al.*, (2016) procederam à a incorporação de extratos de *A. bisporus* em bebidas lácteas (iogurtes líquidos) e concluíram que os iogurtes com o extrato de *A. bisporus* revelaram maior atividade antioxidante e citotóxica em linhas tumorais, comparativamente às dos iogurtes contendo ergosterol puro em concentração equivalente à presente no extrato. Isto evidencia a vantagem da utilização do extrato de micoesteróis em relação ao ergosterol puro; a presença de vários componentes para além do ergosterol gera efeitos sinérgicos que resultam muitas vezes numa maior bioatividade (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Segundo Gil-Ramiréz *et al.* (2014), o ergosterol, assim como os extratos obtidos de *A. bisporus*, podem também ser utilizados como ingredientes hipocolesterolémicos em alimentos destinados a pessoas que sofrem de níveis altos de colesterol. Assim, com o intuito de avaliar a atividade de redução do colesterol com micoquímicos adicionados a alimentos, Caz *et al.* 2016 estudaram frações enriquecidas com ergosterol obtidas a partir de cogumelos, e descreveram que foi possível reduzir significativamente o colesterol plasmático, LDL-colesterol e níveis de HDL-colesterol em camundongos hipercolesterolémicos.

Recentemente, Francisco *et al.* (2017) testaram a incorporação de ergosterol e do seu derivado acetilado encapsulado em maionese. A maionese incorporada com ergosterol apresentou atividade citotóxica para células tumorais, mas também para células normais. Entretanto, a maionese contendo o seu derivado acetilado, apesar de um efeito inferior ao da molécula precursora, não apresentou toxicidade para células normais. Este resultado é interessante uma vez que ao não apresentar toxicidade, pode ser utilizada uma concentração maior do ergosterol acetilado e, desta forma, maximizar a atividade pretendida quando incorporado em maionese.

Adicionalmente a este estudo, Francisco *et al.* (2017) incorporaram extratos de *A. bisporus* ricos em micoesteróis, nomeadamente ergosterol, encapsulados com maltodextrina

reticulada com ácido cítrico e produzidos por *spray drying*; tendo-se feito a comparação com a utilização do extrato na sua forma livre em iogurtes. O extrato de *Agaricus bisporus* incorporado na forma livre e microencapsulada resultou em produtos com propriedades bioativas promissoras, destacando-se os extratos microencapsulados, nomeadamente no caso em que se utilizou um processo térmico para incrementar a reticulação com o ácido cítrico. Assim, mostrou-se como uma alternativa interessante para a valorização de micoesteróis, sendo que este princípio ativo (extrato) pode ser obtido a partir de bioresíduos da produção de cogumelos.

## **2.2. Desidratação por *spray drying***

As emulsões desidratadas podem ser preparadas a partir da desidratação de uma emulsão O/A líquida primária mediante utilização de um evaporador rotativo, liofilização ou *spray drying*. Para a preparação da emulsão O/A primária, geralmente usa-se uma variedade de homogeneizadores incluindo misturadores de alto cisalhamento, homogeneizadores de alta pressão, moinhos coloidais, homogeneizadores de ultrassons e homogeneizadores de membrana. Esta é preparada na presença de um agente tensoativo ou de um emulsionante que possa estabilizar a superfície das gotículas de óleo formadas (MCCLEMENTS, 2015; MCCLEMENTS; LI, 2010).

Um dos processos de desidratação mais utilizados na indústria de alimentos é a técnica de *spray drying*, uma vez que o seu procedimento é rápido, fácil de reproduzir e o custo é relativamente reduzido, quando comparado com as restantes tecnologias de desidratação. Assim, o *spray drying* surge como solução atrativa face à desidratação convencional, porque é um método eficiente e económico (RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016). A liofilização também permite a obtenção de emulsões desidratadas de alta qualidade, mas é considerado uma operação mais cara de fabricação devido ao alto consumo de energia e aos custos elevados de operação e manutenção (DUAN *et al.*, 2016).

Outra vantagem da técnica de *spray drying*, comparativamente a outras técnicas convencionais, consiste na possibilidade de operação em contínuo, o que aumenta significativamente o rendimento do processo (RÉ, 1998). Adicionalmente, as características do

produto a obter, tais como o tamanho de partícula, a morfologia, a densidade e o teor de humidade residual podem ser controlados durante a pulverização, resultando na produção de pós com propriedades funcionais específicas (KIM; CHEN; PEARCE, 2009; NIJDAM; LANGRISH, 2006).

Adelmann, Binks e Mezzenga (2012) descrevem o processo de *spray drying* como sendo baseado em três etapas: (1) dissolução, emulsificação ou dispersão do princípio ativo; (2) atomização e (3) desidratação. O primeiro passo consiste em dissolver (caso seja hidrossolúvel) ou dispersar (caso seja lipossolúvel) o composto que se deseja encapsular numa solução aquosa do material encapsulante também hidrossolúvel. Essa solução/dispersão é então pulverizada diretamente numa câmara aquecida que promove a evaporação da água, ocorrendo a formação de partículas. O processo de desidratação é realizado por intermédio de ar aquecido. Esta etapa é rápida, sendo realizada em alguns milissegundos, pelo que, até mesmo compostos termossensíveis podem ser encapsulados através desta técnica, sem perdas significativas (DORDEVÍC *et al.*, 2014).

A técnica de desidratação de uma emulsão O/A pode ser usada para evitar que o óleo seja oxidado ou para obter partículas sólidas com uma estrutura do tipo matriz, na qual as gotículas de óleo estão incorporadas numa fase contínua de um material de suporte (JAFARI *et al.*, 2008a). Em muitos casos, esta técnica também é utilizada para aumentar o tempo de prateleira e proporcionar aplicações mais convenientes para os consumidores (TANEJA, 2016). Estes incluem alimentos como leite em pó, pós nutricionais (por exemplo, fórmulas infantis), produtos avançados de nutrição médica e sopas instantâneas.

Os pós de óleo resultantes oferecem algumas vantagens, em comparação com as emulsões líquidas, tal como o aumento da estabilidade física e a redução da contaminação microbiana. Adicionalmente, os pós de óleo também provaram melhorar a estabilidade química das substâncias encapsuladas contra a luz e a oxidação e são adequados para a libertação controlada de ingredientes ativos (HANSEN *et al.*, 2005; JANG *et al.*, 2006).

Em geral, as partículas obtidas podem ser classificadas como microencapsulados ou nanoencapsulados caso estejam na gama de 100-1000 nm ou 1-100 nm, respetivamente (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015). A morfologia principal das micropartículas pode ser catalogada em dois tipos: (1) tipo cápsula, onde o núcleo, contendo o bioativo e por vezes um transportador (composto que facilita a libertação), é protegido por uma membrana; e (2) tipo

matriz, onde o bioativo está disperso no próprio material da matriz (KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

A seleção do material de parede é uma etapa fundamental para a desidratação e encapsulação de compostos por *spray drying*, a qual depende da utilização que vai ser dada ao produto, do tipo de material a ser encapsulado, do custo final (MADENE *et al.*, 2006), e das propriedades físico-químicas, tais como solubilidade, peso molecular, cristalinidade, difusibilidade, temperaturas de transição de fase, formação de filme e propriedades emulsionantes (MADENE *et al.*, 2006; RAY; RAYCHAUDHURI; CHAKRABORTY, 2016).

Alguns dos materiais de parede mais utilizados são gomas naturais (goma arábica (RUBILAR *et al.*, 2012)), hidratos de carbono (alginato (GOH; HENG; CHAN, 2012)), proteínas (soro de leite (GALLARDO *et al.*, 2013), gelatina (SHU *et al.*, 2006), caseinato de sódio (KALAYA; TIDA; SAIWARUNAIWARUN, 2011), etc.), polissacarídeos ((amido (DRUSCH; SERFERT; SCHWARZ, 2006), maltodextrinas (CALVO *et al.*, 2010), etc.) e lípidos (ceras (MILANOVIC *et al.*, 2010), óleos (JAFARI *et al.*, 2008b), etc.). Estes são adicionados à fase aquosa da emulsão O/A ajudando também a co-estabilizar as gotículas de óleo (adicionalmente aos emulsionantes adicionados) evitando a coalescência durante a evaporação da água e evitando as rupturas de óleo durante o armazenamento (ADELMANN; BINKS; MEZZENGA, 2012; BEINDORFF; ZUIDAM, 2010).

A versatilidade dos polissacarídeos é baseada na presença de ambientes hidrofóbicos e hidrofílicos com extensão variável na mesma molécula, que favorecem a encapsulação ou aprisionamento não apenas de moléculas com diversas propriedades físico-químicas, mas também com complexas estruturas biológicas (SANTIAGO; CASTRO, 2016). As maltodextrinas são produtos de hidrólise parcial de amidos, sendo classificadas de acordo com o Equivalente em Dextrose (DE, do inglês *Dextrose Equivalent*), valor normalmente definido como  $DE < 20$  (KLINKESORN *et al.*, 2004). Estas tem sido, geralmente, consideradas como um bom material encapsulante, por gerarem soluções de baixa viscosidade para concentrações elevadas de sólidos, boa solubilidade, levando o seu uso a grandes quantidades de óleo encapsulado (DRUSCH; SERFERT; SCHWARZ, 2006; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007).

A estabilização das emulsões O/A é feita através da modificação da tensão superficial das gotículas ou da viscosidade da fase contínua que circunda as gotículas de óleo. Sendo

requerido nestas emulsões um agente emulsionante adicional para a produção de uma emulsão estável (KLINKESORN *et al.*, 2004).

É desejável que uma formulação desidratada de uma emulsão O/A possa ser redispersada em meio aquoso, sendo que o do tamanho das gotas da emulsão, idealmente, deveria ser idêntica à que resultou da formação da emulsão, sendo estas da ordem de 1-100  $\mu\text{m}$ . Isto indicaria que as gotículas da emulsão não coalesceram durante a desidratação e foram bem preservadas na matriz sólida (FÄLDT; BERGENSTAHL, 1996; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007; JAFARI *et al.*, 2008a; VEGA; ROOS, 2006)

No contexto de desidratação de alimentos, a reconstituibilidade é o termo usado para descrever a taxa em que os alimentos desidratados recolhem e absorvem água, retornando a uma condição que se assemelha ao material não desidratado quando colocado em contato com uma quantidade excessiva deste líquido (BARBOSA-CANOVAS *et al.*, 2005).

Segundo Fang, Selemolya e Chen (2008), o processo de dispersão de um pó desidratado num líquido pode ser dividido em quatro etapas: molhabilidade, que consiste na capacidade das partículas de um pó superar a tensão superficial entre estas e a água; imersibilidade, que consiste na imersão das partículas ou de porções do pó no líquido; dispersibilidade, ou seja, a dispersão do pó no líquido; e a solubilidade, que é a dissolução das partículas no líquido. A redispersão de ingredientes em pó é particularmente importante para os fabricantes e os consumidores, com relação direta à percepção da qualidade geral do produto.

Num estudo feito por Goula e Adamopoulos (2012), a técnica de *spray drying* foi utilizada para a desidratação de uma emulsão de óleo de semente de romã utilizando leite em pó desnatado como agente encapsulante, tendo-se obtido uma eficiência de encapsulação de 95,6%.

Alguns fenómenos físicos sobre a estabilidade de uma emulsão contendo um ingrediente lipofílico encapsulado com proteínas foram também investigados por Drusch *et al.* (2012) que relatou, que no caso de ingredientes lipofílicos, as características reológicas interfaciais influenciam a manutenção da estrutura da emulsão ao longo do processo de desidratação minimizando a quantidade de óleo não encapsulado.

Num outro estudo de Jiménez-Martín *et al.* (2015), avaliou-se a encapsulação de ácidos gordos  $\omega$ -3 por *spray drying*, a partir de emulsões com lecitina como material de parede

e emulsões de lecitina-quitosano combinada com hidratos de carbono. Como resultado obtiveram-se microcápsulas multicamada que proporcionam um excelente efeito protetor contra a oxidação lipídica do óleo de peixe durante o armazenamento a temperaturas moderadas a altas (30 °C e 60 °C).

Com o uso da tecnologia de emulsificação antecedendo o processo de desidratação por *spray drying*, Guadarrama-Lezama *et al.* (2012) tiveram por objetivo microencapsular extratos não aquosos de *Capsicum annuum L.* (chilli) incorporados em três óleos diferentes (milho, girassol e cártamo) utilizando goma árabe e maltodextrina como materiais de parede. Os autores concluíram que as microcápsulas obtidas podem ser incluídas como ingredientes funcionais numa gama diversificada de produtos alimentares, para além de ter capacidade de funcionar como agente antimicrobiano natural.

Embora a inclusão de bioativos hidrofóbicos, como alguns extratos de cogumelos, num meio aquoso seja desejável, a sua natureza não polar é frequentemente um fator limitante na sua incorporação em produtos alimentares de matriz hidrofílica (MCCLEMENTS; DECKER; WEISS, 2007). Deste modo, as emulsões, se formuladas e processadas em conformidade, são capazes de ultrapassar esta restrição viabilizando a introdução de ingredientes bioativos de forma precisa e controlada (RAIKOS; RANAWANA, 2017).

### ***2.2.1. Aplicação na área alimentar***

Segundo Dias, Ferreira e Barreiro (2015), a grande maioria dos estudos feitos na literatura não inclui a validação dos bioativos microencapsulados desenvolvidos através da sua incorporação em matrizes alimentares. Em geral, as matrizes de alimentos preferenciais para teste são o leite, e outros produtos lácteos como queijo, iogurte e sorvetes. Os produtos dos setores de cereais, pão, macarrão, chás, sopas e carne são também matrizes alimentares que foram alvo de estudo para incorporação de microcápsulas contendo bioativos.

Alguns exemplos da aplicação da técnica de *spray drying* na formulação de emulsões desidratadas redispersáveis em água com utilização na área alimentar, assim como alguns aspectos da formulação e temperatura de atomização (entrada e saída) utilizada, estão reunidos na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Aplicações de emulsões desidratadas redispersáveis em água.

Óleo encapsulado	Material encapsulante	Formulação	Temperatura de atomização	Referência
Azeite	Caseinato de sódio e maltodextrina	de 2:1 m.e/o	Te: 165°C Ts: 80°C	(CALVO <i>et al.</i> , 2010)
Óleo de peixe	Caseinato de sódio, caseinato de cálcio ou leite em pó	de 30-34,5 sólidos	Te: 177°C Ts: 75°C	(KEOGH <i>et al.</i> , 2001)
Óleo de atum	Xarope milho	de 4:1 m.e/o	Te: 165, 180 e 195°C	(KLINKESORN <i>et al.</i> , 2006)
Óleo de soja	Caseinato de sódio	de 1:40 m.e/o	Te: 180°C Ts: 75°C	(HOGAN <i>et al.</i> , 2001)
Óleo de alecrim	Goma arábica	1:4 m.e/o	Te: 135-195°C	(FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2013)
Azeite aditivado com $\alpha$ -tocoferol	Maltodextrina, inulina e goma acácia	Concentrações variadas	Te: 180°C Ts: 90°C	(TURCHIULI <i>et al.</i> , 2014)

sólidos (%): teor de sólidos totais em %; m.e/o: razão material encapsulante/óleo; Te: temperatura de entrada; Ts: temperatura de saída.

Estudos como o de Davidov-Pardo *et al.* (2008), avaliaram a incorporação de emulsões desidratadas (óleo de peixe em matriz de metil-celulose) com o objetivo de estudar o seu impacto na formulação de pães. Descreveram ser possível adicionar os produtos obtidos ao pão sem modificar significativamente as suas características sensoriais e tecnológicas, o que acontecia usando métodos de polimerização com transglutaminase e *spray drying*. O método de *spray drying* descrito apresentou maior potencial dado que se obteve uma eficiência de encapsulação superior para o óleo de peixe e melhor desempenho.

Por outro lado, Gallardo *et al.* (2013) analisaram o óleo de linhaça microencapsulado por *spray drying* utilizando goma arábica (GA) sozinha ou combinada com maltodextrina (MD), metilcelulose (MC) e isolado de proteína de soro de leite (WPI), também para incorporação em pães. As microcápsulas que apresentaram fraca permeabilidade ao oxigênio e

consequentemente minimizaram a oxidação lipídica, foram as produzidas com GA e a mistura ternária de GA, MD e MC. O pão fortificado revelou uma aparência semelhante ao pão sem adição de microcápsulas, porém o teor de ácido  $\alpha$ -linolénico foi significativamente reduzido após a preparação.

Com o intuito de microencapsular o óleo de sementes de agrião de jardim (GCO), por apresentar um elevado teor de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) e, portanto, ser propenso à auto-oxidação, Umesha *et al.* (2015) utilizou o método de *spray drying* para desidratar uma emulsão de O/A utilizando concentrado de proteína de soro como material de matriz (razão óleo/proteína de 0,4). Posteriormente incorporaram-se os pós obtidos em biscoitos, usando como controle biscoitos não fortificados e fortificados com o óleo na forma livre. Nas amostras aditivadas com óleo (na forma livre e microencapsulada) verificou-se um incremento da qualidade nutricional, contudo os biscoitos contendo o composto bioativo na forma livre mostraram uma taxa de oxidação do ALA superior em comparação com biscoitos contendo GCO microencapsulado, indicando que a técnica de microencapsulação impediu a oxidação do ALA nos biscoitos.

Wan, Tian e Chen (2011) produziram, por *spray drying*, micropartículas a partir de uma emulsão óleo de peixe/água com proteína da cevada como material de matriz. Estas microcápsulas apresentaram elevada eficiência de encapsulação (92,9-100%), uma carga em óleo elevada (46,5-50,1%) e baixo teor de humidade (0,75-0,90%), além de demonstrarem uma forte capacidade para proteger o óleo de peixe contra a oxidação, tornando-os produtos ideais para adicionar a alimentos líquidos/semi-líquidos. A utilização destas micropartículas foi testada na formulação de alimentos, tendo sido bem-sucedida em leite e iogurte, conforme avaliado para o seu tempo de prateleira.

As sopas em pó (sopas instantâneas), também serviram de base a estudos de incorporação, como será detalhado no ponto seguinte.

#### **2.2.1.1. Sopas Instantâneas**

A sopa é provavelmente um dos alimentos mais antigos consumidos pelo homem, uma vez que teve o seu desenvolvimento no tempo em que a fervura foi encontrada como uma forma de cozinhar alimentos. A procura por alimentos saudáveis e de fácil utilização originou a

introdução de várias misturas de sopas instantâneas no mercado, estando prevista uma taxa de crescimento de mais de 25% nos próximos anos (KAUR; DAS, 2015; RAHMAN; SAIFULLAH; ISLAM, 2012).

A sopa é um alimento produzido por combinação de ingredientes como carne e vegetais com água quente/fervente, até o sabor ser extraído, formando um caldo. As misturas para preparação de sopas são, hoje em dia, um alimento estabelecido nos mercados alimentares mundiais sendo bastante procuradas sob a forma de misturas desidratadas aptas a serem preparadas de forma rápida por adição de água (RAHMAN; SAIFULLAH; ISLAM, 2012).

Um método comum para a preparação de sopas instantâneas baseia-se em processos contínuos, em que os ingredientes desidratados pré-produzidos são misturados juntamente com adição de óleo ou gordura na forma de pó. Estes ingredientes desidratados são geralmente vegetais, especiarias, sabores e extratos de levedura. A deterioração microbiana e enzimática dos produtos desidratados é minimizada quando a atividade da água é baixa o que diminui as reações de deterioração química e física, o que prolonga a vida útil do produto (GIBBS, 1985).

Para o desenvolvimento de uma formulação de sopa em pó enriquecida com ácidos gordos ómega-3, compostos com papel importante na saúde humana, Pramestia, Riyanto e Trilaksani (2015) incorporaram óleo de peixe microencapsulado em sopas instantâneas de creme de caranguejo. O método de microencapsulação utilizado recorreu a uma etapa de homogeneização e de *spray drying*. A microencapsulação do óleo de peixe visa manter o sabor, aroma, estabilidade e também transferir com sucesso o componente bioativo do óleo de peixe para a sopa. A melhor formulação de sopa correspondeu à que utilizou uma concentração de microcápsulas de óleo de peixe de cerca de 3,30%, correspondendo a 8,19% da dose diária recomendada de ómega-3.

Rubilar *et al.* (2012) desenvolveram microcápsulas contendo ácidos gordos ómega-3 (óleo de linhaça) que foram adicionadas a uma sopa instantânea em pó para desenvolver um novo produto funcional. Como matriz polimérica para produzir os encapsulados de óleo de linhaça foram usadas goma arábica e maltodextrina. Neste trabalho, os autores avaliaram também a libertação controlada do núcleo lipofílico.

### **2.3. Delineamento experimental**

A necessidade de otimização de produtos e processos, minimizando custos e tempo operacional têm levado a uma enorme busca por técnicas sistemáticas de delineamento experimental. O delineamento experimental é uma ferramenta poderosa para estudar o efeito de um conjunto de vários fatores sobre uma variável resposta de interesse. Esta técnica possui como principais vantagens: (i) a diminuição do número de ensaios; (ii) o estudo de um número considerável de fatores; (iii) a detecção das interações entre fatores; (iv) a detecção dos níveis ótimos; (v) a melhoria de precisão dos resultados e (vi) a otimização dos resultados (ARANDA; JUNG; CATEN, 2008).

As técnicas de delineamento experimental podem ser utilizadas nas etapas de projeto preliminar, projeto do produto e processo de fabricação e na etapa de avaliação e melhoria. Nessas fases, quando o interesse for avaliar apenas o efeito de um único fator nas respostas do produto ou processo, recomenda-se utilizar a técnica de delineamento experimental completamente aleatório ou a técnica de delineamento experimental em blocos aleatórios, tal como descritas por (MONTGOMERY, 2006).

Por outro lado, quando o interesse é investigar o efeito provocado nas respostas do processo, por dois ou mais fatores de controle e, cada um deles com dois ou mais níveis, Juran e Godfrey (1998) e Montgomery (2006), recomendam o uso de técnicas clássicas de delineamento, como por exemplo, a técnica de delineamento fatorial completo, fatorial fracionado ou experiências com pontos centrais.

Dentre estas técnicas o delineamento fatorial é indicado para a fase inicial do procedimento experimental quando há necessidade de se definir os fatores mais importantes e estudar os efeitos sobre a resposta escolhida e todas as interações entre os fatores controláveis de forma simultânea, tornando esta técnica bastante recomendada para a otimização de experimentos (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Nele estão envolvidos  $k$  fatores (ou variáveis), sendo cada um deles presente em diferentes níveis. Quando se estuda o mesmo número de níveis para todos os fatores, o delineamento fatorial pode ser representado por  $b^a$ , onde  $a$  é o número de fatores e  $b$  é o número de níveis escolhidos. Na realização de um experimento com  $k$  fatores em dois níveis, conhecido como o caso mais simples, são feitas  $2 \times 2 \times \dots \times 2$  ( $k$  vezes) =  $2^k$  (NEVES; SCHEVARTZMAN;

JORDÃO, 2002). Logo, para cada fator há um número de níveis atribuído, cujos valores reais são geralmente codificados para valores menores ou para sinais (p. ex. -2, -1, 0, +1, +2; cinco níveis), a fim de facilitar os cálculos (TEÓFILO; FERREIRA, 2006). A atribuição destes sinais é feita arbitrariamente, não interferindo na realização dos experimentos ou interpretação dos resultados, além de permitir ilustrar o planejamento sob forma de matriz de delineamento (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Um delineamento fatorial completo permite estudar os efeitos principais e todas as interações entre os fatores controláveis. Com o aumento do número de fatores, o número de interações entre os fatores aumenta rapidamente. No entanto as interações de alta ordem são difíceis de interpretar e em geral não são significativas. Desta forma optar por rodar um delineamento fatorial fracionário pode-se tornar mais vantajoso (ARANDA; JUNG; CATEN, 2008). Nesta técnica,  $2^{k-p}$  (k é o número de fatores de controle do experimento e p é o número de colunas inseridas na matriz experimental), se utiliza um fator de redução que limita o número de ensaios a um valor mais baixo do que no delineamento completo, mas conduz, possivelmente, às mesmas conclusões que seriam obtidas com o número total de ensaios, sendo possível analisar a influência de um número grande de fatores (BRERETON, 2003; CALADO; MONTGOMERY, 2003; MONTGOMERY, 2006; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Em muitos casos, a realização de repetições autênticas pode gerar problemas por diversas razões. Para contornar estes problemas e obter uma boa estimativa dos erros, um experimento é normalmente incluído no centro do delineamento, denominado de experimentos no ponto central (nível zero), onde este ponto no centro utilizado será equivalente à média da faixa de níveis determinada por cada um dos fatores. Deste modo, é possível avaliar a significância dos efeitos ou coeficientes, tanto em delineamentos de triagem (completos ou fracionários) como em metodologias de superfície de resposta. Além desta vantagem, recomenda-se este tipo de experimento pelas seguintes razões: o risco de perder a relação não linear entre os intervalos é minimizado e é possível estimar um modelo razoável e verificar se há falta de ajuste (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Pode-se citar ainda a Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) do inglês *Response Surface Methodology* (RMS), também frequentemente utilizada em experimentos de otimização (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003). Ela se subdivide claramente em duas etapas: modelagem e deslocamento, que podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias,

até se alcançar um objetivo pré-estabelecido. A modelagem trata da criação de modelos matemáticos que descrevem o comportamento de uma ou mais variáveis sobre uma resposta de interesse, geralmente usando dados de experimentos delineados. O deslocamento se trata de alterar progressivamente os valores das variáveis na direção que promove a variação mais pronunciada na resposta (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003)

Basicamente a metodologia de superfície de resposta pode ser definida como um método estatístico que utiliza dados quantitativos de um desenho experimental adequado para determinar e simultaneamente solucionar equações multivariadas. Essas equações podem ser representadas graficamente como superfícies de resposta, que podem ser usadas de três formas: descrever como as variáveis em teste afetam as respostas; para determinar as interrelações entre as variáveis em teste; e para descrever efeitos combinados de todas as variáveis em teste sobre a resposta (MONTGOMERY, 2006).

Quando dois fatores A e B apresentam-se com níveis quantitativos, a resposta Y é representada por um gráfico de contorno ou gráfico de superfície, em um espaço bidimensional ou tridimensional, respectivamente, oriundo de um modelo de primeira ou de segunda ordem, com ou sem interação dupla entre eles.

Desse modo, um modelo completo baseado em n observações de Y, medidas em diferentes combinações entre os níveis dos fatores A e B, é representado por:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 a_i + \beta_2 a_i^2 + \beta_3 b_j^2 + \beta_5 a_i b_i + \varepsilon_{ij} \text{ Equação (1)}$$

Em que,

$a_i$  é o valor do nível i do fator A;

$b_j$  é o valor do nível j do fator B;

$\beta_k$  é o parâmetro do modelo, com  $k= 0, 1, \dots, 5$ .

Uma vez que a MSR necessita de dados de um delineamento experimental, vários tipos de delineamentos podem ser utilizados para gerar dados ajustáveis a modelos. O delineamento composto central é um dos mais utilizados, mas pode-se citar o delineamento Doehlert (NETO;

SCARMINIO; BRUNS, 2003; TEÓFILO; FERREIRA, 2006) e o delineamento Box-Behnken (HELENO *et al.*, 2016).

O delineamento composto central (do inglês *Central Composite Design*, CCD) é um tipo especial de fatorial, em que os pontos tradicionais do experimento sofrem uma rotação de 45° nos níveis. O CCD apresenta a vantagem de se iniciar com um experimento fatorial completo (pontos fatoriais) ou fracionado e, caso seja necessário, realiza-se a rotação do fatorial inicial e inclusão dos novos ensaios para ajuste de um modelo. Um delineamento composto central é considerado rotacional, quando as variâncias das predições da resposta dependem apenas da distância em relação ao ponto central. Essa situação é útil quando um modelo ajustado apresentar falta de ajuste ou o experimento não fornece graus de liberdade o suficiente para avaliar a falta de ajuste do modelo, ocasião na qual será necessário incluir mais ensaios no experimento (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Nesse sentido, uma otimização multivariada pode empregar o delineamento fatorial completo ou fracionado em uma etapa inicial, também chamada de triagem, que seleciona as variáveis experimentais que influenciam significativamente na resposta analítica (SILVA *et al.*, 2008). Numa etapa seguinte, as variáveis selecionadas são otimizadas por alguma ferramenta estatística que geram modelos quadráticos, por exemplo, o delineamento composto central (CCD) ou delineamento composto central rotacional (*Central Composite Rotational Design*). Por fim, é estabelecida uma equação matemática que relaciona as variáveis a serem otimizadas com a resposta analítica (superfície de resposta). Nessa equação são aplicados artifícios matemáticos com os quais se estabelecem uma combinação numérica otimizada para as variáveis do sistema (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2003).

Com base na literatura, alguns estudos na área alimentar também utilizaram o delineamento experimental com o intuito de investigar a influência de diferentes condições na formulação de emulsões. Dentre eles, Li e Chiang (2012) teve como objetivo principal utilizar um delineamento composto central e metodologia de superfície de resposta para investigar a influência das condições de uma emulsão ultra-sônica no tamanho das gotículas das nanoemulsões D-limoneno, para posteriormente otimizar as condições de preparação de nanoemulsões D-limoneno com menor tamanho de gotícula.

Para avaliar diversas formulações de emulsões visando maximizar a concentração de óleo em bebidas e relacionar suas propriedades físico-químicas com a estabilidade, Almeida

(2012), elaborou um delineamento experimental do tipo fracionado, no qual foram variadas a razão óleo de limão/água (30% a 50%), a concentração de amido e goma arábica (0% a 30%), e a concentração de surfactante DSS. Obtendo como resultado emulsões estáveis, contendo 5% de amido ou goma arábica e 50% de óleo de limão.

Com o objetivo de otimizar os atributos sensoriais de uma emulsão à base de soja sobre uma variedade de suco de goiaba rosa (GJ: 22% a 32%) e proteína de soja (SP: 1% para 3%), Granato *et al.* (2010) utilizou a metodologia de superfície de resposta (MSR) com a intenção de oferecer uma nova opção para intolerantes à lactose ou consumidores vegetarianos. Os modelos desenvolvidos pela MSR descreveram adequadamente a cremosidade, sabor e aparência das emulsões, sugerindo que um produto com 30,35% GJ e 3% SP foi a melhor combinação destes componentes.

Tendo em vista a importância do desenvolvimento de alimentos contendo compostos bioativos, no presente trabalho é proposto o desenvolvimento de misturas para sopas instantâneas contendo ergosterol. Além disso, objetiva-se o estudo prévio do comportamento das emulsões O/A (óleo de girassol em água) para encapsulação do ergosterol em emulsões desidratadas por *spray drying* (maltodextrina como encapsulante) através do uso de delineamento experimental para modelagem e validação experimental do tamanho das gotas emulsionadas.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1. Padrões e Reagentes**

Dentre os materiais de base para a preparação das emulsões, o óleo de girassol foi adquirido num mercado local de Bragança - Portugal, a maltodextrina da Cargill (Wayzata MN, EUA) e o Tween 20 e o Span 20 (emulsionantes), foram adquiridos da Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). O ergosterol usado neste trabalho foi adquirido à Acros Organics (New Jersey, EUA). Possui um grau de pureza de 98%, apresenta coloração amarelada, é isento de modificações. A sulforrodamina B (SRB), o ácido tricloroacético, o Trisaminometano (Tris) e a elipticina foram adquiridos na Sigma- Aldrich (Saint. Louis, MO, EUA). O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), a solução salina equilibrada de Hank (HBSS), o soro fetal bovino (FBS) e a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) foram obtidos na Gibco Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Califórnia, EUA).

Os solventes acetonitrilo 99% e metanol 99% de grau HPLC foram adquiridos à Fisher Scientific (Loures, Portugal). Todos os outros solventes usados eram de grau analítico: metanol e clorofórmio, da marca Lab-Scan, tolueno e ácido sulfúrico, da marca Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na Sigma-Aldrich, assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos e padrões de açúcares.

A água foi tratada com um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Sistemas de água pura, Greenville, SC, EUA).

### **3.2. Otimização do diâmetro e distribuição de tamanhos das gotículas da emulsão primária**

#### ***3.2.1. Definição dos fatores significativos para otimização do diâmetro das gotas da emulsão***

A produção eficiente de emulsões alimentares de alta qualidade depende do conhecimento da contribuição que cada componente individual tem nas propriedades gerais e de como essa contribuição é influenciada pela presença dos outros constituintes (MCCLEMENTS, 2015). Com base neste princípio, é importante investigar a etapa de dispersão para avaliar o efeito de cada componente nas características de gotícula e determinar

a melhor condição de preparação desta para a obtenção eficiente das dispersões desidratadas (objetivo deste trabalho).

O primeiro passo consistiu em determinar as variáveis mais importantes na formulação das amostras, tendo-se selecionado três variáveis a serem testadas no delineamento, sendo estas: X<sub>1</sub>- tempo de dispersão (Td), X<sub>2</sub>- percentagem de MD (relativa à água presente na formulação), e X<sub>3</sub>- carga em óleo (percentagem de óleo relativamente à MD).

O estudo foi realizado em duas etapas. A primeira consistiu em elaborar um delineamento experimental fatorial fracionário 3<sup>(3-1)</sup>, com duplicado no ponto central, para verificação do diâmetro das gotas e distribuição de tamanhos. Posteriormente, determinar se os fatores avaliados influenciam significativamente o processo. Para este estudo foram considerados os fatores e níveis reais apresentados na **Tabela 3**, totalizando 11 experiências. Na **Tabela 4** são apresentadas as massas dos respectivos componentes, utilizados para a preparação da emulsão.

**Tabela 3.** Fatores e níveis avaliados no delineamento fatorial fracionário 3<sup>(3-1)</sup>.

Experiencia	Níveis codificados (valor real)		
	X <sub>1</sub> (Td, min)	X <sub>2</sub> (MD, %)	X <sub>3</sub> (Carga em óleo, %)
1	-1 (5)	-1 (20)	-1 (10)
2	-1 (5)	1 (40)	0 (20)
3	-1 (5)	0 (30)	1 (30)
4	0 (10)	1 (40)	-1 (10)
5	0 (10)	0 (30)	0 (20)
6	0 (10)	-1 (20)	1 (30)
7	1 (15)	0 (30)	-1 (10)
8	1 (15)	-1 (20)	0 (20)
9	1 (15)	1 (40)	1 (30)
10	0 (10)	0 (30)	0 (20)
11	0 (10)	0 (30)	0 (20)

**Tabela 4.** Formulações utilizadas para produção das emulsões preparadas a partir do delineamento fatorial fracionário  $3^{(3-1)}$ .

Experiência	Água (mL)	MD (g)	Óleo de girassol (g)	Tween 20 (g)	Span 20 (g)
1	20	4,0394	0,4023	0,2056	0,0047
2	20	6,0045	1,8005	0,2014	0,0185
3	20	8,0107	1,6021	0,2008	0,0160
4	20	4,0119	0,4033	0,2049	0,0043
5	20	6,0322	1,8016	0,2018	0,0189
6	20	8,0020	1,6084	0,2016	0,016
7	20	4,0427	0,4153	0,2057	0,0043
8	20	6,0200	1,8045	0,2018	0,0184
9	20	8,0570	1,6026	0,2032	0,0168
10	20	6,0013	1,2080	0,2058	0,0129
11	20	6,0830	1,2063	0,2064	0,0129

Para a preparação da emulsão, preparou-se uma solução aquosa contendo 1% em massa Tween 20 (em relação à água). Adicionou-se a maltodextrina de acordo com a percentagem indicada pelo delineamento experimental e manteve-se a mistura sob agitação magnética por 10 minutos. Num recipiente em separado pesou-se o óleo de acordo com o delineamento experimental juntamente com 1% em massa de Span 20 (em relação à fase lipídica). Posteriormente, realizou-se a mistura da fase lipídica com a fase aquosa sob agitação magnética por 10 minutos. Posteriormente esta macroemulsão foi submetida a homogeneização a 11000 rpm (homogeneizador Ultraturrax Unidrive, X1000D, CAT), sendo o tempo de dispersão o definido pelo delineamento experimental.

Para monitorizar o tamanho das gotículas formadas, depositou-se uma amostra da emulsão numa lâmina de vidro que por sua vez foi analisada por microscopia óptica num microscópio (Nikon Eclipse 50i), equipado com uma câmara para aquisição de imagem (Nikon Digital Sighth). As imagens foram obtidas com ampliação de 40x e a partir destas foi feita a avaliação do diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ) das gotículas através do *software Size Meter* (LEIMANN *et al.*, 2009a; VEIGA *et al.*, 2016). Foram avaliadas cerca de 300 gotas para cada ponto experimental de forma a determinar a média e o índice de polidispersão (PDI), este obtido pela Equação (2), onde  $\sigma$  representa o desvio padrão das medições do diâmetro e  $D_{\text{médio}}$  o diâmetro médio ( $\mu\text{m}$ ).

$$PDI = \left( \frac{\sigma^2}{D_{m\u00e9dio}^2} \right) \quad \text{Equa\u00e7\u00e3o (2)}$$

Os resultados obtidos para di\u00e2metro m\u00e9dio e \u00edndice de polidispers\u00e3o (PDI) de acordo com o delineamento experimental, foram avaliados com o *software* Statistica 7.0 (Statsoft, USA). Os resultados foram submetidos \u00e0 an\u00e1lise de vari\u00e2ncia (ANOVA) com 95% de confian\u00e7a para verifica\u00e7\u00e3o da signific\u00e2ncia dos fatores avaliados. Adicionalmente, foi obtido o diagrama de Pareto com os efeitos estimados estandardizados. Os fatores que se revelaram significativos para as respostas foram selecionados ent\u00e3o para a segunda etapa correspondente \u00e0 aplica\u00e7\u00e3o do delineamento composto central rotacional.

### 3.2.2. Modelagem e valida\u00e7\u00e3o experimental do di\u00e2metro das gotas da emuls\u00e3o

Definiu-se um delineamento composto central rotacional a partir dos resultados obtidos no delineamento fatorial fracion\u00e1rio, cujas condi\u00e7\u00f5es experimentais s\u00e3o as apresentadas na **Tabela 5** (condi\u00e7\u00f5es experimentais em n\u00edveis codificados e reais). Somente os fatores de tempo de dispers\u00e3o ( $X_1$ ) e carga em \u00f3leo ( $X_2$ ) se mostraram significativos dentro da gama experimental estudada. Na **Tabela 6** s\u00e3o apresentadas as formula\u00e7\u00f5es utilizadas para os pontos experimentais do delineamento proposto. O procedimento de produ\u00e7\u00e3o das emuls\u00f5es foi id\u00eantico ao descrito anteriormente, assim como a metodologia para a determina\u00e7\u00e3o do di\u00e2metro m\u00e9dio e do PDI.

**Tabela 5.** Condi\u00e7\u00f5es experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional (Central Composite Rotational Design) com as vari\u00e1veis codificadas e reais.

Experimento	N\u00edveis codificados (valor real)	
	$X_1$ (Td min)	$X_2$ (Carga em \u00f3leo %)
1	-1,00 (5)	-1,00 (10)
2	-1,00 (5)	1,00 (30)
3	1,00 (15)	-1,00 (10)
4	1,00 (15)	1,00 (30)
5	-1,41 (2,95)	0,00 (20)
6	1,41 (16,41)	0,00 (20)
7	0,00 (10)	-1,41 (5,9)
8	0,00 (10)	1,41 (34,1)

<b>9</b>	0,00 (10)	0,00 (20)
<b>10</b>	0,00 (10)	0,00 (20)

**Tabela 6.** Formulações utilizadas para os pontos experimentais do Delineamento Composto Central Rotacional.

<b>Experiência</b>	<b>Água (mL)</b>	<b>MD (g)</b>	<b>Óleo de girassol (g)</b>	<b>Tween 20 (g)</b>	<b>Span 20 (g)</b>
<b>1</b>	20	8,0430	0,8035	0,205	0,0082
<b>2</b>	20	8,0384	2,4044	0,2001	0,0248
<b>3</b>	20	8,0425	0,8229	0,2018	0,0081
<b>4</b>	20	8,0055	2,4019	0,2038	0,0243
<b>5</b>	20	8,0216	1,6076	0,2009	0,0161
<b>6</b>	20	8,0335	1,6013	0,2039	0,0167
<b>7</b>	20	8,0154	0,4721	0,2084	0,0045
<b>8</b>	20	8,0072	2,7289	0,2026	0,0272
<b>9</b>	20	8,0341	1,6042	0,2052	0,0169
<b>10</b>	20	8,0228	1,6063	0,2081	0,0160

Os dados foram submetidos a análise através do *software* Statistica 7.0, sendo que, inicialmente, se avaliou a significância dos coeficientes do modelo experimental relativo ao delineamento proposto para as respostas  $Y_1$  ( $D_{\text{médio}}$ ,  $\mu\text{m}$ ) e  $Y_2$  (PDI, adimensional) (expressos em termos das variáveis codificadas). Os termos que não se apresentaram significativos (5% de significância, ANOVA), em cada modelo, foram eliminados e os coeficientes de determinação  $R^2$  e  $R^2_{\text{adj}}$  foram avaliados para definição da composição final dos coeficientes. Assim, em conjunto com a significância da regressão do modelo e da falta de ajuste, obtidos pela análise de variância ANOVA do modelo (5% de significância), foi definido o modelo para descrição de cada resposta. Os coeficientes foram então organizados na expressão polinomial de segunda ordem (**Equação 3**) descrita abaixo.

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{12}X_1X_2 \quad \text{Equação (3)}$$

Em que  $Y$  é a resposta,  $b_0$  é o coeficiente de regressão para a interceção;  $b_1$  e  $b_2$  são os coeficientes de regressão para os efeitos lineares;  $b_{11}$  e  $b_{22}$  são os coeficientes de regressão para os efeitos quadráticos;  $b_{12}$  o coeficiente de regressão para o efeito de interação; e  $X_1$  e  $X_2$  são

as variáveis independentes em valores reais. As superfícies de resposta para os modelos obtidos foram plotados somente para os efeitos que se apresentaram significativos.

### 3.2.3. Validação experimental do modelo

Para validação do modelo obtido no delineamento experimental, foram realizados três ensaios, sendo as formulações escolhidas de forma aleatória dentro da gama analítica estudada. As condições experimentais utilizadas estão representadas na **Tabela 7**. Os resultados previstos foram determinados com a aplicação dos valores desejados na equação do modelo experimental determinado. Os valores desejados reais (apresentados na **Tabela 5**) foram convertidos para valores codificados para aplicação na Equação do modelo de acordo com a Equação (4). Onde  $\varepsilon_i$  corresponde ao valor real desejado,  $\varepsilon_i(0)$  ao valor real desejado no ponto central (0) e  $\varepsilon_i(-1)$  corresponde ao valor real desejado no ponto codificado (-1).

$$X_i = \left[ \frac{\varepsilon_i - \varepsilon_i(0)}{\varepsilon_i(0) - \varepsilon_i(-1)} \right] \quad \text{Equação (4)}$$

Foram considerados validados experimentalmente os pontos em que o resultado se apresentou dentro do intervalo de confiança gerado pelo *software* Estatística de acordo com os resultados da ferramenta de previsão dos valores das variáveis dependentes.

**Tabela 7.** Condições experimentais para a validação experimental dos modelos obtidos.

Experimento de validação	Td (min)	Carga em óleo (%)	Água (mL)	MD (g)	Óleo de girassol (g)	Tween 20 (g)	Span 20 (g)
V1	12	25	20	8	2,00	0,20	0,0200
V2	14	32	20	8	2,56	0,20	0,0256
V3	7	15	20	8	1,20	0,20	0,0120

### 3.3. Preparação das emulsões incorporando ergosterol e etapa de desidratação por *spray-drying*

Inicialmente foi definida a condição experimental para produção da emulsão óleo em água (O/A). Foi escolhida a condição validada experimentalmente correspondendo ao valor mais elevado de carga em óleo, permitindo assim que quando adicionadas às formulações de sopas, as microesferas permitissem a adição de uma quantidade adequada de óleo, sem excesso de maltodextrina. Seguindo o procedimento utilizado anteriormente para produção das emulsões, adicionou-se ergosterol (1,77 mg/g<sub>sólidos</sub>) na fase de preparação da macroemulsão, que foi sujeita posteriormente a uma segunda fase de homogeneização. Uma formulação sem ergosterol (branco) também foi preparada.

Após preparadas as emulsões estas foram desidratadas usando um *spray drying* de acordo com o procedimento e condições de operação utilizadas por Francisco *et al.* (2017). Tal compreendeu a utilização de um Mini Spray Dryer B-290 Buch (Flawil, Switzerland). O bocal utilizado tinha um diâmetro de 0,7 mm e o volume atomizado para cada formulação foi de 100 mL, em duplicado. As condições de operação do equipamento foram: temperatura de entrada 170°C, temperatura de saída 95°C, aspirador a 90% e bomba a 20% (6 mL/min).

### **3.4. Caracterização das microesferas**

#### **3.4.1 Rendimento do processo de produção das dispersões desidratadas (R)**

O rendimento de encapsulação (R), parâmetro utilizado para estimativa das perdas de material durante o processo de encapsulação, foi determinado gravimetricamente como a razão entre a massa de microesferas recolhida no final do processo e a massa dos materiais atomizados, conforme a Equação (5).

$$R = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad \text{Equação (5)}$$

Sendo **M** referente à soma das massas dos materiais utilizados na encapsulação **i** e **f** referente ao início e ao fim do processo, respetivamente.

#### **3.4.2. Extração da fase óleo das dispersões desidratadas produzidas**

As microesferas obtidas com e sem ergosterol (PCE e PSE, respectivamente, 1 g) foram extraídas com 30 mL de metanol e mantidas sob agitação magnética (placa de aquecimento, VELP scientific) durante 30 minutos. Após filtração (filtros Whatman n°4), o resíduo sólido obtido foi re-extraído sob as mesmas condições. Os extratos líquidos combinados foram evaporados num evaporador rotativo (Büchi R-210) a 40 °C de forma a remover o

metanol. Os resíduos obtidos foram posteriormente utilizados para a quantificação do ergosterol e avaliação da atividade citotóxica em células não tumorais.

### **3.4.3. Quantificação de ergosterol**

A quantificação do ergosterol nas microesferas com ergosterol (PCE) foi realizado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor UV (HPLC-UV). Para isso, utilizou-se um equipamento constituído por um sistema integrado composto por uma bomba (Knauer, sistema Smartiline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartiline manager 5000), um detetor de ultravioleta (Knauer Smartline 2500) e um injetor automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD, EUA). O ergosterol obtido na secção 3.4.2 foi redissolvido em metanol e filtrado com um filtro de nylon de 0,2 µm, seguindo o procedimento descrito por (BARREIRA; OLIVEIRA; FERREIRA, 2014). A separação cromatográfica foi obtida com numa coluna de fase reversa Inertsil 100A ODS-3 (4,6 x 150 mm, 5 µm, BGB Analytik AG, Boeckten, Suíça) operando a 35°C (forno Grace 7971R). A fase móvel foi acetonitrilo/metanol (70:30, v/v), trabalhando com um fluxo de 1 mL/min, com o volume de injeção foi de 20 µL e a detecção foi realizada a 280 nm. O ergosterol foi quantificado pelo método de padrão externo, sendo realizada uma comparação da área do pico com a sua curva de calibração obtida a partir do padrão comercial. Os dados foram analisados usando o Software Clarity 2.4 (DataApex).

### **3.4.4. Determinação da eficiência de encapsulação (EE)**

A Eficiência de Encapsulação (EE) foi determinada pela Equação (6):

$$EE = \frac{ERG_{exp}}{ERG_{teórica}} \times 100 \quad \text{Equação (6)}$$

Sendo esta a razão entre a massa de ergosterol encapsulada determinada experimentalmente por HPLC-UV (**ERG<sub>exp</sub>**), e o valor teórico colocado no processo de encapsulação (**ERG<sub>teórica</sub>**).

A massa de ergosterol encapsulado foi obtida conforme descrito na secção 3.4.3.

#### ***3.4.5. Caracterização do tamanho de partícula para as microesferas***

Os diâmetros D<sub>10</sub>, D<sub>50</sub> e D<sub>90</sub>, relacionados com os diâmetros de corte da curva de distribuição acumulada (em volume e em número) em 10%, 50% e 90%, respectivamente, foram obtidos por análise de difração a laser num equipamento (Malvern Mastersizer 3000) contendo uma unidade de dispersão Hydro MV (Malvern, Reino Unido). Foi utilizado como meio de dispersão o etanol.

#### ***3.4.6. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)***

Os espectros no infravermelho médio das amostras das dispersões desidratadas (branco e incorporadas com ergosterol), bem como dos componentes puros, foram obtidos num espectrofotômetro MB300 (ABB, Zurique, Suíça) equipado com um acessório de refletância total atenuada (ATR). Utilizaram-se os seguintes parâmetros: 32 scans, resolução de 16 cm<sup>-1</sup> e uma gama de leitura de 4000 a 550 cm<sup>-1</sup>. Antes da análise, as amostras permaneceram em estufa a vácuo (30 °C) para eliminação da humidade. Antes da análise de cada amostra fez-se a aquisição de um background, sendo o mesmo utilizado para eliminar a influência dos componentes do ar no espectro. Os espectros foram normalizados em relação ao pico de maior intensidade.

#### ***3.4.7. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)***

As temperaturas de transição das microesferas obtidas, maltodextrina e ergosterol foram determinadas utilizando-se um equipamento de DSC (Netzsch, DSC 204 F1, Phoenixv). Aproximadamente 6 mg de cada amostra foram pesadas em cadinhos de alumínio, fechados e aquecidos na taxa de 10 °C.min<sup>-1</sup> de -80 °C até 300 °C sob atmosfera de nitrogênio de 50 mL.min<sup>-1</sup>.

#### ***3.4.8. Determinação da oxidação lipídica e perfis de ácidos gordos do óleo extraído das microesferas***

Para a extração do óleo contido nas microesferas, dissolveu-se 1 g de microesferas (PCE e PSE) em 50 mL de água e colocou-se sob agitação magnética durante 3 minutos. De seguida procedeu-se a uma extração líquido-líquido com 20 mL de clorofórmio e após separação das fases, a fase orgânica (fase inferior) foi transferida para um balão de fundo redondo, previamente pesado. A extração líquido-líquido foi repetida num total de 5 vezes para garantir

a extração completa do óleo e do ergosterol. A fase orgânica obtida no final das repetições foi evaporada num evaporador rotativo a 40 °C (Büchi R-210), até à total remoção do solvente e obtenção do óleo.

A estabilidade oxidativa do óleo extraído proveniente das microesferas, foi determinada por FTIR seguindo o mesmo procedimento da secção 3.4.6 e por cromatografia gasosa acoplado a um detector de ionização em chama (GC-FID).

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização em chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Barros *et al.* (2013), e após o seguinte processo de trans-esterificação. O óleo obtido foi misturado com 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 °C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada, para obter a separação das fases. A FAME foi recuperada com 3 mL de éter etílico em agitação no *vortex*; posteriormente adicionou-se sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um *vial* com tampa contendo membrana de teflon e filtrou-se com um filtro de nylon 0,2 µm Milipore. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m×0,32 mm×0,25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C, 20 °C/min até 220 °C que permaneceu durante 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

### **3.5. Atividade citotóxica em células não tumorais**

As amostras extraídas a partir de PCE e PSE de acordo com a metodologia descrita na secção 3.4.2 foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO, 1 mL) obtendo soluções com concentrações finais de 300 mg/mL, que foram submetidas a quatro diluições sucessivas numa gama de concentrações de 0,9375 até 15 mg/mL.

Uma cultura de células foi preparada a partir de fígado de porco obtido num matadouro local, que foi designada PLP2 (*porcine liver primary culture*; cultura primária de células de fígado de porco). O tecido de fígado foi lavado com solução salina equilibrada de Hank (HBSS) (solução contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e divididos em explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25 cm<sup>2</sup> em DMEM suplementado com 10% de FBS, 2 mM de aminoácidos não essenciais e 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, e incubados a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi renovado a cada dois dias e o crescimento celular foi acompanhado com um microscópio com contraste de fase.

Para avaliar a citotoxicidade, foi realizado o ensaio da Sulforodamina B (SRB) de acordo com o procedimento previamente descrito por Abreu *et al.* (2011). Para isso, a linha celular foi colocada numa microplaca de 96 poços, juntamente com as diferentes diluições da amostra em análise, a uma densidade de 1,0x10<sup>4</sup> células/poço e incubadas durante 48 horas. Após o período de incubação, as células aderentes foram fixadas pela adição de ácido tricloroacético 10% previamente refrigerado (100 µL) e incubadas por 60 minutos a 4°C. Decorrido esse período, as microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. Em seguida, foi adicionado SRB (0,1% em ácido acético a 1%, 100 µL) nos poços da microplaca e esta foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi removida a SRB não aderida pela lavagem com solução de ácido acético a 1% e novamente a placa foi seca. A SRB aderida foi solubilizada com Tris 10 mM (200 µL) e a absorvância foi lida em comprimento de onda de 540 nm, no leitor de microplacas (ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA). Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular na cultura primária PLP2). A elipticina foi utilizada como padrão.

### **3.6. Desenvolvimento de preparados de sopas instantâneas incorporando**

A formulação da sopa de vegetais instantânea seguiu uma receita tipo de uma sopa em pó adquirida num supermercado local na cidade de Bragança – Portugal, com algumas modificações. Inicialmente, os vegetais (adquiridos no mercado local de Bragança, Portugal) foram higienizados, descascados e picados. Em seguida os mesmos foram congelados e liofilizados (Coolsafe Scanvac®). Em seguida a preparação da sopa foi desenvolvida considerando uma mistura base contendo uma porção total de vegetais de aproximadamente

12,50 g (batata (7,68 g), cenoura (1,50 g), abóbora (0,80 g), couve lombarda (2,01 g), e cebola (0,50 g)). Os vegetais desidratados foram pesados e triturados em conjunto num liquidificador doméstico. Em seguida as microesferas (4 g; PCE ou PSE) foram adicionadas à mistura base, sendo as sopas produzidas designadas de SPCE e SPSE, respectivamente, prefazendo então uma massa de sólidos de 16,50 g. Esta massa é indicada para a preparação de 250 mL de sopa.

### **3.7. Caracterização das sopas produzidas**

#### **3.7.1. Análise das propriedades nutricionais**

##### **3.7.1.1. Composição centesimal**

As amostras das sopas foram analisadas quanto ao teor em proteínas, hidratos de carbono, gorduras, humidade e cinzas seguindo os procedimentos oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). A proteína foi determinada pelo método macro-Kjeldahl e foi utilizado o fator 6,25 para a conversão do teor de azoto em proteína total. A gordura total foi determinada após extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração a  $600 \pm 15^\circ\text{C}$ . Os hidratos de carbono totais foram obtidos pela diferença de 100 g de produto pela soma da massa determinada de gordura, proteína e cinzas. A energia foi calculada a partir da Equação (7).

$$E = 4 \times (p + hc) + 9 \times G \quad \text{Equação (7)}$$

Onde E representa Energia (kcal/100 g), p a massa de proteína, hc a massa de hidratos de carbono e G a massa de gordura, todas estas expressas em g/100g.

##### **3.7.1.2. Açúcares livres**

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros *et al.* (2013) com algumas modificações. Cada uma das amostras de sopa (1 g, pó resultante após a análise de gordura) foi enriquecida com melezitose como padrão interno (PI, 5 mg/mL) e foi

extraída com 40 mL de etanol aquoso 80%, a 80 °C num banho com agitação, durante 1h30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion) a 15,000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida; os vestígios de gordura foram removidos utilizando três lavagens sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 mL. Os açúcares foram determinados usando um sistema de HPLC (Knauer, sistema Smartline) acoplado a um detetor de RI (Knauer Smartline 2300), com uma coluna 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6×250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min, operando a 35°C. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões, utilizando a metodologia do padrão interno. Os resultados foram expressos em g por 100 g de sopa seca.

### **3.7.1.3. Ácidos gordos**

Os ácidos gordos foram analisados no resíduo seco obtido pela extração em Soxhlet das sopas e analisados por GC-FID (GC modelo DANI 1000), como descrito anteriormente na secção 3.4.8. Os resultados foram processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

## **3.8. Análise das propriedades citotóxicas**

As sopas (8 g) contendo partículas com e sem ergosterol (SPCE e SPSE, respectivamente) foram extraídas com metanol (200 mL), sob agitação magnética durante 1 hora e submetidas ao processo de filtração, re-extração e evaporação como descrito na secção 3.4.2. Posteriormente foram avaliadas quanto à atividade citotóxica em células não tumorais.

As amostras extraídas a partir das sopas SPCE e SPSE foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo soluções com concentrações finais de 100 mg/mL, que foram submetidas a quatro diluições sucessivas numa gama de concentrações de 0,3125 até 5 mg/mL. Sendo estas analisadas conforme descrito na secção 3.4.9.

## **3.9. Análise estatística**

Os ensaios descritos foram realizados utilizando três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios ± desvio padrão (DS). Os resultados foram analisados através do *teste-t Student* de forma a determinar as

diferenças significativas entre duas amostras diferentes, com  $p = 0.05$ . Este tratamentos estatísticos foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 23.0.

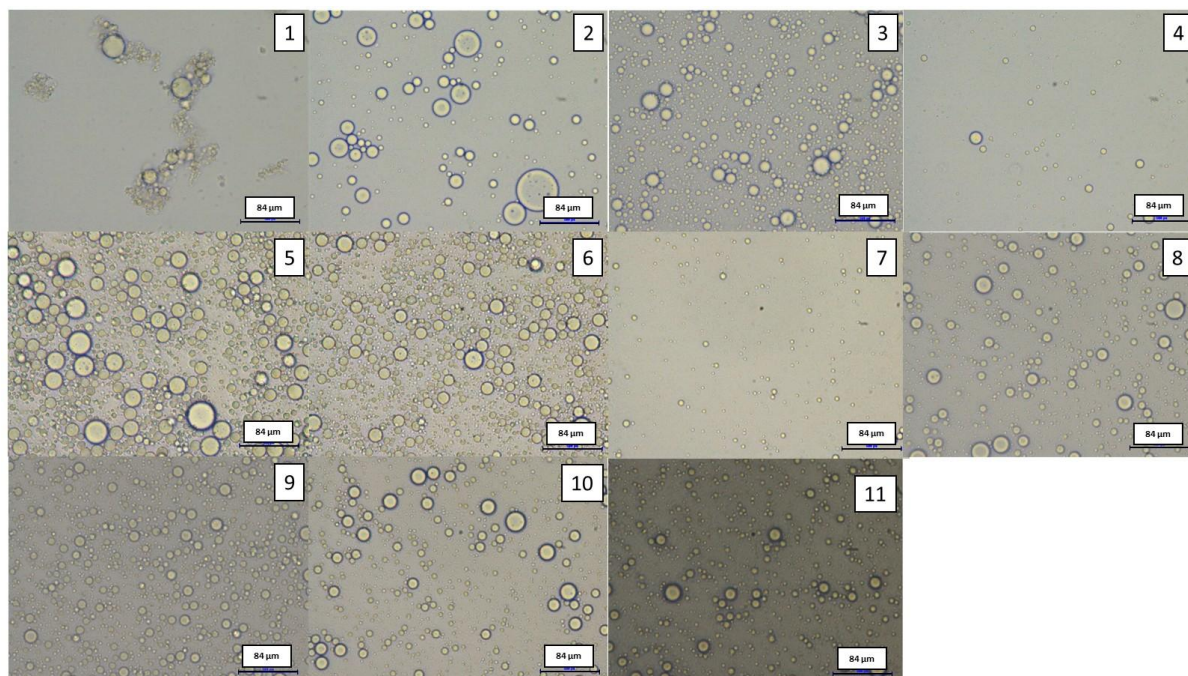
### **3.10. Análise da redispersibilidade das dispersões desidratadas e sopas produzidas**

A redispersão das microesferas e das sopas produzidas foi testada por mistura de 5,28 g das microesferas (PCE e PSE) em 10 mL de água destilada, tentando reproduzir a razão fase óleo/fase aquosa utilizada para a emulsão primária; e 1,32 g de sopa em pó (SPCE e SPSE) em 20 mL de água destilada. As misturas permaneceram em agitação magnética durante 15 minutos à temperatura ambiente, sendo o tamanho das gotículas formadas avaliado por microscopia óptica (Nikon Ni-U) com uma ampliação de 40x.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

#### 4.1. Seleção das variáveis significativas para a produção das emulsões no delineamento experimental fatorial fracionário

Inicialmente foi realizado um delineamento fatorial fracionário para avaliar quais variáveis envolvidas na produção da emulsão que apresentavam efeito significativo nas respostas definidas: diâmetro médio e PDI. Na **Figura 3** podem ser observadas as imagens das gotículas das emulsões produzidas. Na **Tabela 8** encontram-se descritos os resultados relativos às medidas de diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ) e índice de polidispersão (PDI).



**Figura 3.** Imagens de microscopia ótica das emulsões produzidas de acordo com as condições experimentais do delineamento fatorial fracionário. Aumento de 40x.

**Tabela 8.** Condições experimentais do delineamento experimental fatorial fracionário  $3^{(3-1)}$  e resultados obtidos para diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ) e índice de polidispersão (PDI).

Experiência	Td (min)	%MD	Carga em óleo %	$D_{\text{médio}}$ ( $\mu\text{m}$ )	PDI
1	5	20	10	5,39	0,74
2	5	30	30	11,36	1,04
3	5	40	20	4,11	0,57

4	10	20	10	4,98	0,57
5	10	30	30	7,13	0,39
6	10	40	20	6,56	0,35
7	15	20	10	3,78	0,33
8	15	30	30	5,32	0,70
9	15	40	20	4,46	0,37
10	10	30	20	4,98	0,49
11	10	30	20	4,41	0,53

Ao observar as emulsões produzidas (**Figura 3**), verifica-se que se trata de um sistema polidisperso, ou seja, as gotas formadas possuem uma distribuição de tamanhos variados. Nas experiências correspondentes a uma carga em óleo inferior, ou seja 10% (experiências 1, 4 e 7), existe uma população menor de gotas, conforme esperado. A tendência de haver menor chance de coagulação das gotas, pelo menor número de choques prováveis entre as mesmas, leva a um controle melhor do tamanho médio (LEIMANN *et al.*, 2009b), sendo estes mais homogêneos, o que se reflete nos resultados de PDI, uma vez que valores de PDI inferiores indicam distribuições de tamanho mais estreitas, portanto mais homogêneas (VEIGA *et al.*, 2016). De acordo com Bachtzi *et al.* (1996), em geral, o diâmetro médio das gotas numa dispersão líquido-líquido é determinado pelo balanço entre as forças turbulentas que tendem a provocar a quebra destas, a tensão interfacial e as forças viscosas que tendem a manter as gotas unidas, ou seja provocar a sua coalêscencia.

A média de tamanho das gotículas manteve-se, na maioria dos casos, entre 3 e 7  $\mu\text{m}$ , contudo para a experiência 2 o diâmetro médio obtido foi de 11,36  $\mu\text{m}$ , além do maior valor de PDI (1,04), indicando a distribuição de tamanhos mais larga entre todas as amostras analisadas. Este efeito pode ser atribuído tanto ao elevado valor de carga em óleo utilizado quanto ao baixo tempo de dispersão.

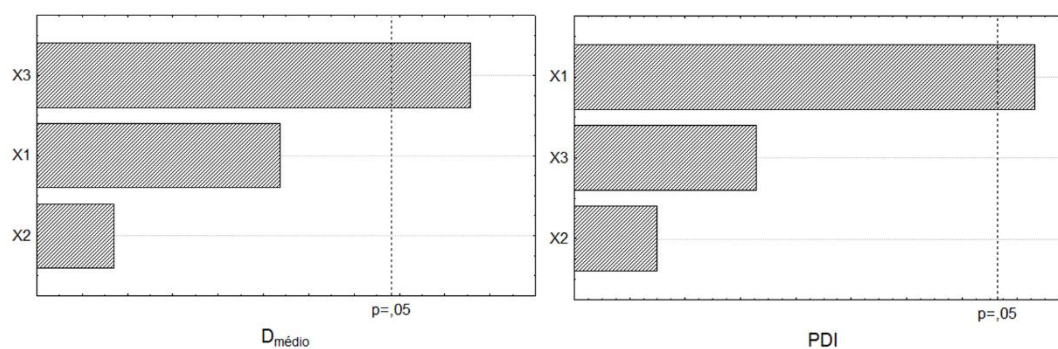
Os resultados relativos à análise de variância (ANOVA) dos dados de  $D_{\text{médio}}$  e PDI estão apresentados na **Tabela 9**. Na **Figura 4** estão apresentados os diagramas de Pareto para as respostas  $D_{\text{médio}}$  e PDI.

**Tabela 9.** Análise de Variância (ANOVA) dos resultados referentes ao  $D_{\text{médio}}$  e PDI.

<b><math>D_{\text{médio}}</math></b>				
<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>p-valor</b>
<b>X<sub>1</sub> (Td min)</b>	8,916	1	8,917	0,103
<b>X<sub>2</sub> (MD %)</b>	3,296	1	3,296	0,292
<b>X<sub>3</sub> (carga em óleo, %)</b>	18,652	1	18,652	0,030*
<b>Error</b>	17,755	7	2,536	
<b>Total</b>	45,48071	10		

<b>PDI</b>				
<b>Fator</b>	<b>SQ</b>	<b>GL</b>	<b>QM</b>	<b>p-valor</b>
<b>X<sub>1</sub> (Td min)</b>	0,155	1	0,155	0,045*
<b>X<sub>2</sub> (MD %)</b>	0,080	1	0,080	0,124
<b>X<sub>3</sub> (carga em óleo, %)</b>	0,097	1	0,097	0,095
<b>Error</b>	0,183	7	0,026	
<b>Total</b>	0,458	10		

SQ-Soma dos quadrados; GL- Grau de liberdade; Quadrado médio (QM); \*p-valor: indica significância ( $p < 0,05$ )



**Figura 4.** Diagramas de Pareto para as respostas de  $D_{\text{médio}}$  e PDI.

De uma forma geral verifica-se que os resultados da análise de variância corroboram os obtidos com a análise do diâmetro das gotículas e o PDI, sendo somente significativos ( $p <$

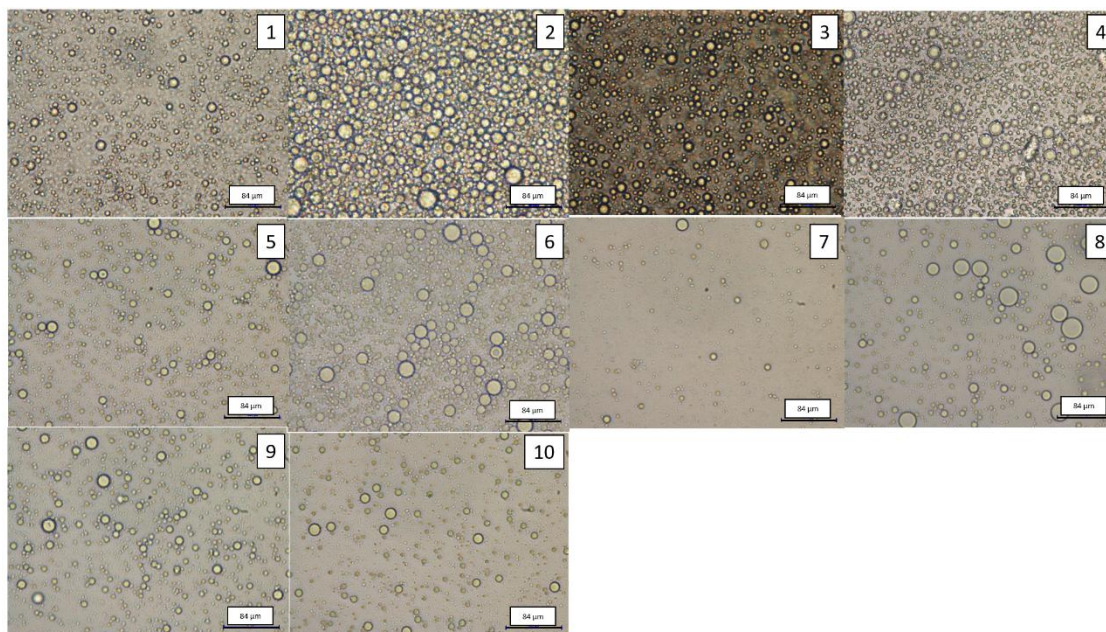
0,05) os efeitos da carga em óleo ( $X_3$ ) para o primeiro resultado e somente o tempo de dispersão ( $X_1$ ) para o segundo.

#### 4.2. Modelação matemática do diâmetro médio das gotículas mediante um delineamento composto central rotacional

A partir destes resultados definiu-se um novo delineamento experimental considerando somente os fatores carga em óleo (% ,  $X_2$ ) e tempo de dispersão (min,  $X_1$ ). O delineamento composto central rotacional conduziu aos resultados de diâmetro médio e PDI apresentados na **Tabela 10**. As imagens das emulsões obtidas, analisadas por microscopia ótica, estão apresentadas na **Figura 5**.

**Tabela 10.** Condições experimentais do delineamento composto central rotacional e resultados obtidos para diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ) e índice de polidispersão (PDI).

Experiência	Td (min)	Carga em óleo (%)	$D_{\text{médio}}$ ( $\mu\text{m}$ )	PDI
1	5	10	3,82	0,20
2	5	30	7,53	0,20
3	15	10	5,20	0,22
4	15	30	5,59	0,30
5	2,95	20	6,09	0,21
6	16,41	20	6,36	0,16
7	10	5,9	3,64	0,21
8	10	34,1	5,85	0,18
9	10	20	7,50	0,24
10	10	20	6,31	0,14



**Figura 5.** Imagens de microscopia ótica das emulsões produzidas de acordo com as condições experimentais do delineamento composto central rotacional. Aumento de 40x.

Não foi possível construir um modelo experimental baseado nos resultados de PDI pois o mesmo não descreveu de forma significativa os resultados, sendo desta forma rejeitado. Com os resultados de  $D_{\text{médio}}$  foi possível obter um modelo experimental estando os resultados obtidos para os coeficientes de regressão apresentados na **Tabela 11**.

**Tabela 11.** Coeficientes de regressão obtidos para o modelo de  $D_{\text{médio}}$ .

Coeficientes		p-valor
$b_0$	6.90453	0.000036
$b_1$	-0.02419	0.895011
$b_1^2$	-0.32691	0.224372
$b_2$	0.90143	0.006350*
$b_2^2$	-1.06650	0.009417*
$b_1b_2$	-0.83113	0.026907*

\*p-valor: indica significância ( $p < 0,05$ )

Com a análise do p-valor dos coeficientes de regressão, percebe-se que apresentaram significância na resposta do modelo em questão os coeficientes linear e quadrático da carga em óleo ( $b_2$  e  $b_2^2$ ) e a interação entre o tempo de dispersão e a carga em óleo ( $b_1b_2$ ). Os demais coeficientes foram mantidos no modelo, uma vez que a sua eliminação reduziu a sua capacidade de previsão. O efeito da carga em óleo foi positiva para o diâmetro das gotículas, indicando que com o seu aumento, um aumento no diâmetro médio também deve ocorrer. Adicionalmente, o efeito quadrático negativo da carga em óleo indica uma curvatura na superfície de resposta, com ponto de máximo.

**Tabela 12.** ANOVA para o delineamento composto central rotacional do modelo de  $D_{\text{médio}}$ .

Resposta	Fonte de variância	SQ	GL	QM	$F_{\text{calc}}$	$F_{\text{tab}}$	p	
$D_{\text{médio}}$	Regressão	14,5630	5	2.9126	12,2917	6,2561	0,015350	
	Resíduo	0,9478	4	0,2370				
	Falta de ajuste	0,235	3	0,0783	0,1099	215,7073	0,943079	
	Erro puro	0,713	1	0,7128				
	Total	15,511	9					
		Coefficiente de determinação			$R^2$	93,89		
		Coefficiente de determinação ajustado			$R^2_{\text{adj}}$	86,25		
		Desvio padrão da estimativa			Dp	0,4861		

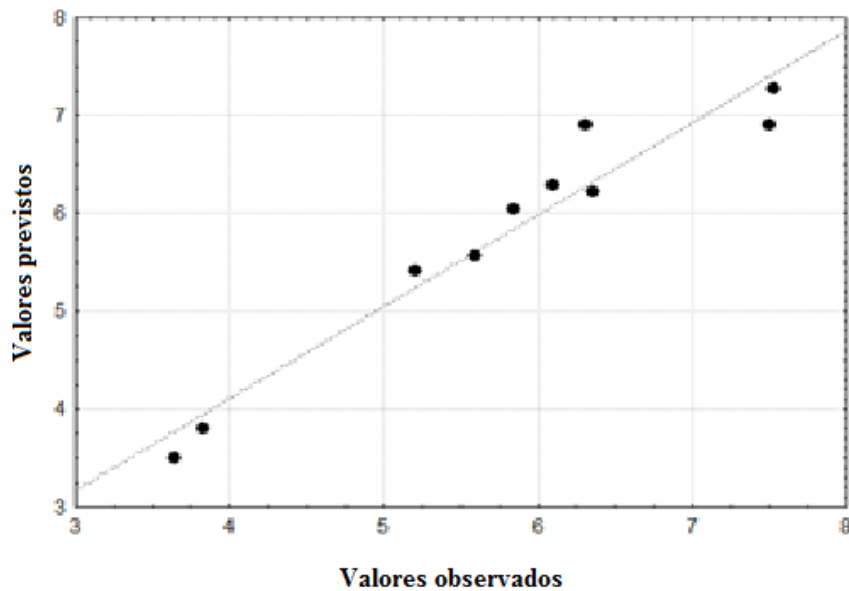
Com relação à ANOVA (**Tabela 12**), os valores de coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e determinação ajustado ( $R^2_{\text{adj}}$ ), indicam que um modelo quadrático representa bem a relação entre os efeitos e a resposta. Pode-se perceber também que o modelo proposto é estatisticamente significativo e preditivo, ao nível de 95% de confiança, uma vez que o valor de F (calculado) para a relação de regressão é pelo menos 2 vezes superior ao F (tabelado) (SNEDECOR; COCHRAN, 1967). Adicionalmente, o modelo não apresentou falta de ajuste significativo ( $p > 0,05$ ).

O modelo quadrático obtido para a variável de resposta diâmetro médio das gotas em função das variáveis (valores codificados) e interações que se mostraram significativas, está representado na Equação (8). Os coeficientes de regressão são apresentados na **Tabela 11**.

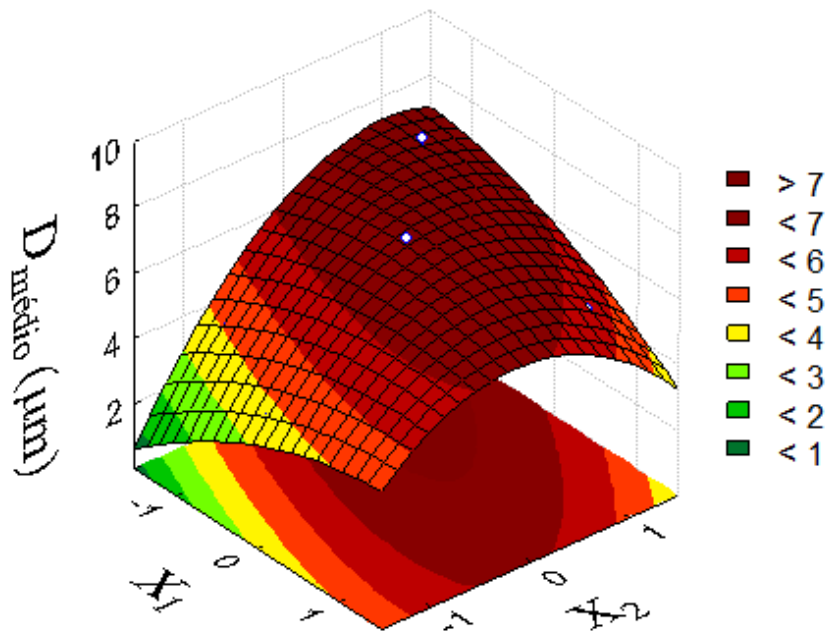
$$Y = 6,900453 - 0,02419 \times X_1 - 0,32691 \times X_1^2 + 0,90143 \times X_2 - 1,06650 \times X_2^2 - 0,83113 \times X_1 \times X_2$$

Equação (8)

A **Figura 6** mostra o comportamento do diâmetro médio das gotas em comparação com o previsto (calculado) pelo delineamento. A partir dos resultados obtidos pela geração do modelo matemático, apresenta-se na **Figura 7**, o gráfico de contorno para a variação da carga em óleo *versus* tempo de dispersão tendo o  $D_{\text{médio}}$  como resposta.



**Figura 6.** Comparação entre os valores observados versus previstos para a variável  $D_{\text{médio}}$ .



**Figura 7.** Superfície de resposta de  $D_{\text{médio}}$  em função do tempo de dispersão ( $X_1$ ) e carga em óleo ( $X_2$ )

Observa-se que foi possível obter uma boa concordância entre os valores observados e previstos pelo modelo, além de uma distribuição aleatória dos pontos, indicando que este pode ser utilizado para prever valores de diâmetro médio dentro da gama experimental avaliada.

O efeito significativo da interação entre a carga em óleo e o tempo de dispersão, além do efeito quadrático significativo da carga em óleo, geram um comportamento não linear na superfície de resposta, como ilustrado na **Figura 7**. Soleimanpour, Koocheki e Kadkhodae (2013) avaliaram as influências da concentração de estabilizante e óleo no tamanho de gotícula formado. Constatou-se que concentrações elevadas de óleo e concentrações baixas de emulsionantes originam gotas de tamanho superior. Este efeito do aumento do tamanho de gotícula com o aumento da fração de volume de óleo foi explicado pelo intensificação da frequência de colisão entre as gotículas, o que incrementa a taxa de floculação. O efeito foi também observado por Carpenter e Saharan (2017). De acordo com Tonon *et al.* (2012), com o aumento do conteúdo de óleo, mantendo a quantidade de material de parede constante (tal como o caso do presente trabalho), a quantidade de maltodextrina pode não ter sido suficiente para cobrir/proteger completamente as gotículas, levando à coalescência destas e, assim, resultando na formação de gotículas maiores. Os autores sugerem também outra possível causa, nomeadamente relacionado com o fato de o homogeneizador utilizado não ser eficiente para

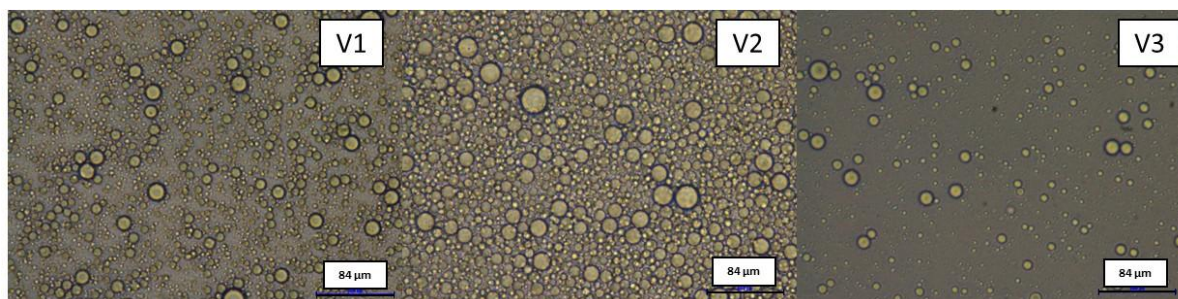
produzir emulsões homogêneas com elevado teor de óleo. Este comportamento pode estar relacionado com o efeito combinado do tempo de dispersão e carga em óleo que apresenta um efeito negativo no diâmetro das gotas. Assim, para tempos baixos e teores de óleo elevados na emulsão, o homogeneizador pode não possuir capacidade de reduzir suficientemente o diâmetro das gotículas tornando-se estas instáveis. Porém, se o tempo de dispersão for aumentado, mesmo com um teor elevado de óleo, é de esperar que se formem gotículas com diâmetros baixos.

#### 4.2.1 Validação experimental do modelo matemático

Procedeu-se à validação experimental do modelo matemático obtido, com a escolha de três pontos experimentais localizados em regiões diferentes do conjunto experimental estudado. Na **Tabela 13** apresentam-se os pontos selecionados para a validação, os intervalos de confiança gerados durante a análise de desejabilidade no *software* Statistica bem como os resultados experimentais para  $D_{\text{médio}}$  das gotículas. No que respeita ao diâmetro médio das gotículas das emulsões preparadas para a validação deste modelo, o registro das respetivas imagens encontra-se reunido na **Figura 8**.

**Tabela 13.** Resultados obtidos para diâmetro médio ( $D_{\text{médio}}$ ).

Experiencia	Td (min)	Carga em óleo %	Intervalo de confiança $D_{\text{médio}}$ ( $\mu\text{m}$ )	$D_{\text{médio}}$ experimental ( $\mu\text{m}$ )
V1	12	25	0,22 < 6,86 < 13,49	6,46
V2	14	32	0,56 < 5,42 < 14,18	6,39
V3	7	15	0,53 < 5,84 < 12,20	6,64



**Figura 8.** Imagens de microscopia ótica das emulsões produzidas de acordo com as condições experimentais do delineamento composto central rotacional. Ampliação de 40x.

Os resultados obtidos com as experiências de validação forneceram respostas válidas quanto às interações entre os parâmetros em estudo (Td e carga em óleo), dentro do intervalo de confiança determinado. Isto significa que outras emulsões podem ser desenvolvidas sob as condições apresentadas no trabalho sendo que o modelo pode ser usado na previsão da resposta.

### **4.3. Desidratação das emulsões pela técnica de *spray drying***

#### **4.3.1. *Rendimento do processo e eficiência de encapsulação***

O rendimento do processo (R) é caracterizado pela relação entre a massa obtida após atomização relativamente à massa inicial, sendo um parâmetro que quantifica a perda global de material durante o processo de atomização. O valor obtido foi de 36,8 e 21,2% para as microesferas com e sem ergosterol, respectivamente. A eficiência de encapsulação (EE) obtida no presente trabalho, para as microesferas incorporando ergosterol, foi de 4,46%. Esta medida representa a percentagem de princípio ativo (ergosterol) que foi encapsulado durante o processo de atomização.

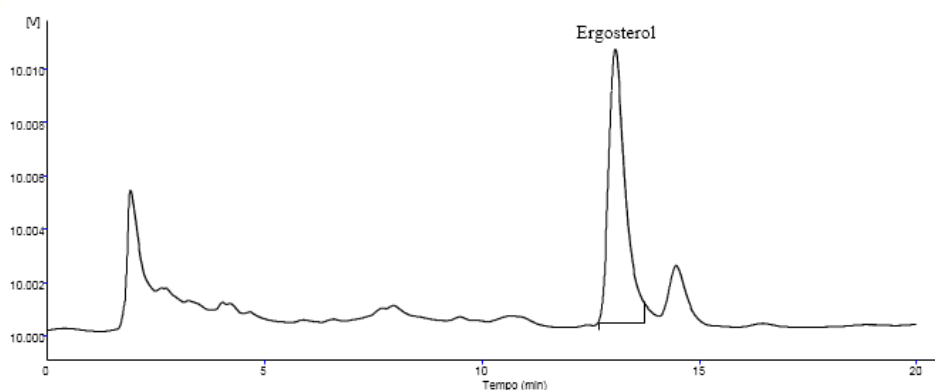
A baixa eficiência de encapsulação obtida pode ser justificada pelo facto do ergosterol apresentar afinidade com a fase óleo e com a fase aquosa (embora limitada), fazendo com que este possa não ter sido totalmente incorporado na fase óleo ficando exposto na superfície externa das microesferas, sendo então perdido na fase do processo de desidratação por *spray-drying*.

Alguns autores relatam também que a baixa eficiência de encapsulação pode ser proveniente de diversos fatores como: o tipo de material de parede, as propriedades dos materiais do núcleo (concentração, volatilidade), as características do material, a emulsão primária (sólidos totais, viscosidade, tamanho das gotículas) e as condições do processo de secagem (tipo de atomização, temperatura do ar de entrada, fluxo de ar, humidade). Assim, é também relevante fazer uma otimização do processo de desidratação, de forma a obter uma maior eficiência (JAFARI *et al.*, 2008b).

#### **4.3.2. *Quantificação do ergosterol e avaliação da atividade citotóxica das dispersões desidratadas***

As amostras obtidas a partir da extração das microesferas PCE e PSE, tal como obtido na secção 3.4.2, foi caracterizado cromatograficamente quanto ao teor de ergosterol. A

quantidade identificada nestes extratos foi obtida a partir da comparação entre a área do pico apresentado na **Figura 9** e a do padrão comercial, sendo o valor encontrado de  $232 \pm 4 \mu\text{g/g}$  extrato (ou aproximadamente  $79 \pm 8 \mu\text{g}$  de ERG/g de microesfera PCE) para as microesferas PCE. O valor teórico adicionado às emulsões ( $1,77 \text{ mg/g}_{\text{sólidos}}$ ) para a obtenção das microesferas PCE não condizem com o resultado verificado, o que pode indicar uma perda durante o processamento, como relatado anteriormente para a eficiência de encapsulamento.



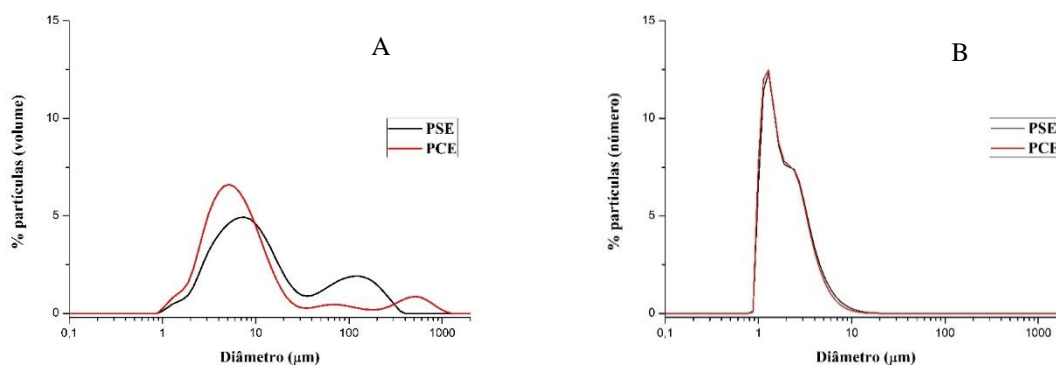
**Figura 9.** Cromatograma obtido por HPLC-UV do extrato das microesferas contendo ergosterol.

Adicionalmente, o extrato obtido a partir das microesferas PCE não apresentou toxicidade para células não tumorais para concentração máxima testada (PLP2;  $\text{GI}_{50} > 15 \text{ mg/mL}$ ).

#### **4.3.3. Caracterização do tamanho de partícula para as microesferas obtidas**

As microesferas com ergosterol (PCE) e sem ergosterol (PSE) foram caracterizadas relativamente ao tamanho de partícula. As distribuições de tamanho de partícula em volume e em número estão apresentadas na **Figura 10**. Os dados foram expressos pelos seus respectivos percentis  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$ , que correspondem, respectivamente, ao tamanho de partícula máximo correspondente a 10, 50 e 90% das partículas.

Os valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  para as distribuições em volume e número estão reunidos na **Tabela 14**.



**Figura 10.** Distribuição do tamanho de partícula das microesferas obtidas pela técnica de *spray drying*. Distribuição em volume para as microesferas com (PCE) e sem ergosterol (PSE) (A) Distribuição em número para as microesferas com (PCE) e sem ergosterol (PSE) (B).

**Tabela 14.** Valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  obtidos para as distribuições em volume e em número do tamanho de partícula.

		$D_{10}(\mu\text{m})$	$D_{50}(\mu\text{m})$	$D_{90}(\mu\text{m})$
<b>Distribuição em volume</b>	PCE	$2,68 \pm 0,01$	$6,49 \pm 0,09$	$64,3 \pm 24,4$
	PSE	$3,32 \pm 0,07$	$10,7 \pm 0,5$	$144 \pm 10$
<b>Distribuição em número</b>	PCE	$1,160 \pm 0,005$	$1,85 \pm 0,03$	$4,01 \pm 0,04$
	PSE	$1,170 \pm 0,001$	$1,88 \pm 0,01$	$4,27 \pm 0,02$

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

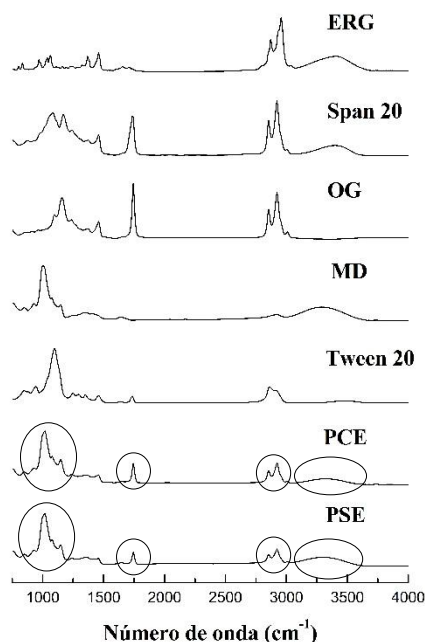
A partir da **Figura 10A** pode-se verificar que a distribuição de tamanho em número é semelhante para os dois tipos de microesferas (PSE e PCE), resultado também observado na **Tabela 14**, onde aproximadamente 90% das microesferas possuem valores de até aproximadamente 4  $\mu\text{m}$ .

Ao analisar a distribuição em volume, as microesferas com ergosterol (PCE) apresentaram um percentual maior de partículas no intervalo de 1 a 40  $\mu\text{m}$ , comparativamente com as microesferas sem ergosterol (PSE). Esses resultados indicam que houve um

deslocamento do diâmetro das partículas para tamanhos menores que 40  $\mu\text{m}$  quando o ergosterol foi adicionado à formulação, contudo também houve a formação de um pico entre 200 e 1000  $\mu\text{m}$ , que pode ser atribuído a aglomerados de partículas que não foram dispersados durante a análise de tamanho de partícula.

#### 4.3.4. Análise de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na **Figura 11** apresentam-se os espectros de FTIR obtidos para os materiais de base e para as dispersões desidratadas com ergosterol (PCE) e sem ergosterol (PSE).



**Figura 11.** Espectros de infravermelho obtidos para os materiais de base (ERG, Span 20, OG, MD, Tween 20) e dispersões desidratadas (microesferas PCE e PSE).

Pela análise do espectro de FTIR do ERG (**Figura 11**), registou-se a banda característica de estiramento simétrico de  $-\text{CH}_2$  na faixa de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  (CHEN; TRIPP, 2012), presente também nos materiais de base como o Span 20, óleo de girassol (OG) e Tween 20, justificando a presença desta banda nas microesferas produzidas (PSE e PCE), diferenciando-se uma da outra apenas pela intensidade dos picos. As PCE apresentam o pico

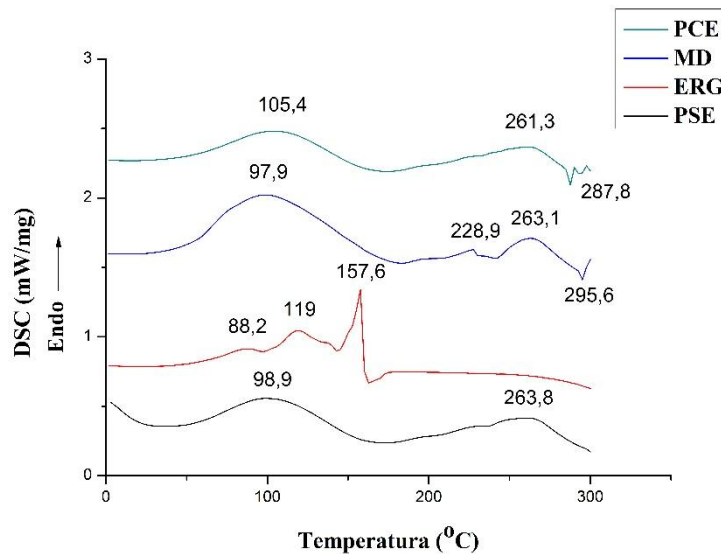
mais forte, por sofrer influência do ergosterol (ERG), intensificando o sinal desta banda característica. Este é um indicativo de que o ergosterol se encontra distribuído também na parte externa das microesferas. Para além disso, as microesferas PSE e PCE, apresentaram também as bandas entre 1700 e 1750  $\text{cm}^{-1}$  referentes às vibrações do grupo C=O, e entre 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  relacionada com a vibração por estiramento dos grupos hidroxilo.

O óleo de girassol (OG) apresentou picos de absorção comuns para triglicerídeos, componente principal das gorduras e óleos comestíveis. A faixa a 3007  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de alongamento de =C-H. Foram também observadas absorções fortes na região de 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  associada às vibrações por estiramento dos C-H, tal como descrito anteriormente. Os grupos metileno (-CH<sub>2</sub>) e metil (-CH<sub>3</sub>) são observados a partir das suas vibrações de alongamento nas frequências de 2922 e 2853  $\text{cm}^{-1}$ , respectivamente. O pico intenso em torno de 1750  $\text{cm}^{-1}$  deve-se à vibração de alongamento da ligação dupla C=O. Deformação e flexão dos C-H e alongamento da vibração C-O resultam em picos na região de 1500-650  $\text{cm}^{-1}$  (GURDENIZ; TOKATLI; OZEN, 2007).

Em relação a maltodextrina, as principais características a assinalar correspondem às bandas registradas a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , características dos anéis de anidroglicose (estiramento); na gama 800-1500  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas com a ligação C-O (estiramento); entre 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação das ligações C-H e por fim entre 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  relacionada com a vibração por estiramento dos grupos hidroxilo.

#### ***4.3.5. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)***

O comportamento térmico da amostra foi estudado por DSC sendo os resultados apresentados na **Figura 12**.



**Figura 12.** Curvas DSC da microesfera com ergosterol (PCE) e sem ergosterol (PSE), maltodextrina (MD) e ergosterol em pó 98% (ERG).

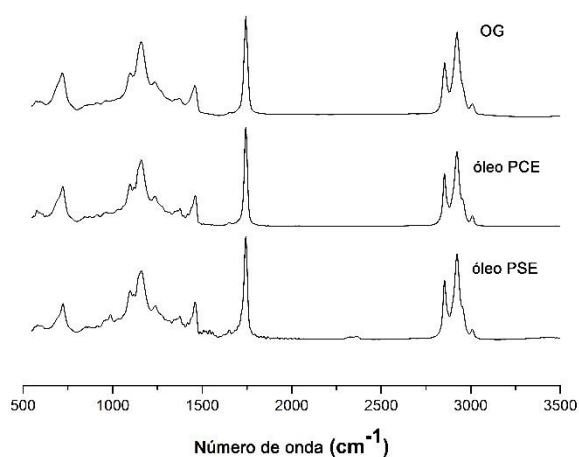
Para o ergosterol (ERG), o pico endotérmico que aparece na curva de DSC, indica a temperatura de fusão cristalina a 157,6 °C, que tal como relatado por Barreira, Oliveira e Ferreira (2014) se mantém entre 161-166 °C. No termograma que representa as microesferas PCE, o ponto de fusão do ERG não foi observado, apesar dos resultados de FTIR indicarem que há possibilidade de o ergosterol estar localizados na parte externa das microesferas. Este efeito possivelmente se deve à baixa concentração de ergosterol na amostra.

Avaliando os termogramas obtidos por DSC, podemos verificar também que entre a MD e as microesferas (PCE e PSE), se observa que há uma transição endotérmica em comum, (temperaturas em torno de 97,9, 105,4 e 98,9 °C, respectivamente). Tal transição endotérmica pode ser associada à perda de água presente nas respectivas amostras, como também observado por (MULLER, 2011). Adicionalmente pode verificar-se que o processo de obtenção das microesferas por *spray drying* não interfere no comportamento térmico da maltodextrina, como pode também ser observado pelas transições térmicas adicionais (temperatura de 263,1 °C que se mantém muito próxima das temperaturas de 261,3 °C e 263,8 °C, da PCE e PSE, respectivamente).

#### 4.3.6. Determinação da oxidação lipídica do óleo extraído das microesferas

Da análise dos espectros obtidos para os óleos extraídos a partir das microesferas, com e sem ergosterol (PCE e PSE, **Figura 13**), em comparação com o espectro do óleo de girassol utilizado para a produção das emulsões, nota-se uma semelhança entre os picos encontrados. Guillén e Goicoechea (2007) detectaram-se num estudo sobre a oxidação primária e secundária do óleo de girassol durante o armazenamento, que as bandas de maior significância obtidas por FTIR estão próximas a 3471, 1746 e 988  $\text{cm}^{-1}$ . Sendo a primeira caracterizada pelo aumento da intensidade da banda devido à absorção de hidroperóxidos gerados durante o processo de oxidação; já a diminuição da frequência da banda perto de 1746  $\text{cm}^{-1}$  em óleos oxidados, é atribuída ao aumento da concentração de aldeídos como resultado do grau mais elevado de oxidação; e a terceira banda pode indicar a presença de ligações duplas *trans*, *trans* e/ou *cis,trans*-conjugadas associadas a produtos de oxidação. Contudo, esta banda não é apreciável ou esta totalmente ausente nos espectros de óleo de girassol não oxidado, como descrito pelos autores.

Assim, tal como observado pela **Figura 13**, observa-se uma pequena alteração na banda próxima a 988  $\text{cm}^{-1}$  para o espectro do óleo PSE, porém não há evidência das outras bandas características da oxidação lipídica, indicando a efetiva proteção do óleo nas dispersões desidratadas produzidas.



**Figura 13.** Espectros de infravermelho obtidos para os óleos extraídos das microesferas (óleo PCE e PSE) e para o óleo de girassol.

Adicionalmente, foi determinado o perfil em ácidos gordos (expresso em percentagem relativa) dos óleos extraídos das microesferas obtidos por análise por cromatografia gasosa (GC-FID). Sendo apresentados também as percentagens de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). Verifica-se pela **Tabela 15**, que os óleos extraídos apresentam um alto teor de ácidos gordos polinsaturados (67,2 e 67,76%, PUFA), tal como esperado, uma vez que o óleo de girassol é rico neste perfil de ácidos gordos; seguindo-se os ácidos gordos saturados (SFA) com valores entre 17,15 e 16,63% e, por último, os monoinsaturados (MUFA) na gama de 15,59 e 15,62%. Entre os ácidos gordos identificados, os mais abundantes foram o ácido linoleico (C18:2n6c), ácido oleico (C18:1n9c) e ácido palmítico (C16:0), com valores variando de 66,74 a 67,32%, 15,22 a 15,24% e 7,10 a 7,11%, respectivamente. Sendo o ácido mais abundante encontrado o ácido linoleico, muito conhecido por promover características nutricionais e biológicas de alta qualidade.

Os valores da composição em ácidos gordos encontrados no presente estudo, são próximos dos apresentados por Gunstone (1996), que estabelece para os óleos de girassol, valores de 11% de ácidos gordos saturados, 20% de ácidos gordos monoinsaturados e 69% de ácidos gordos polinsaturados. De uma forma geral os resultados obtidos destacam os benefícios da encapsulação para a diminuição dos fenômenos de oxidação lipídica.

Foi encontrada uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) para a maioria dos ácidos gordos identificados nas duas amostras analisadas. Contudo, estas alterações não promoveram a ocorrência de oxidação lipídica, em ambos os casos estudados, com e sem adição do ergosterol.

**Tabela 15.** Composição em ácidos gordos dos óleos extraídos das microesferas (média±desvio-padrão).

	PCE	PSE	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student <sup>1</sup>
<b>C8:0</b>	0,71±0,02	0,64±0,02	0,003
<b>C10:0</b>	0,48±0,03	0,44±0,01	0,018
<b>C11:0</b>	0,031±0,001	0,025±0,002	0,002
<b>C12:0</b>	3,2±0,1	2,86±0,04	0,001
<b>C14:0</b>	1,22±0,02	1,10±0,03	0,001
<b>C15:0</b>	0,025±0,001	0,027±0,001	0,026

<b>C16:0</b>	7,11±0,02	7,1±0,1	0,992
<b>C16:1</b>	0,19±0,01	0,189±0,004	0,004
<b>C17:0</b>	0,055±0,004	0,055±0,001	1,000
<b>C17:1</b>	0,041±0,002	0,041±0,001	1,000
<b>C18:0</b>	3,15±0,01	3,150±0,003	1,000
<b>C18:1n9c</b>	15,24±0,03	15,22±0,03	0,303
<b>C18:2n6t</b>	0,038±0,001	0,033±0,001	0,001
<b>C18:2n6c</b>	66,7±0,1	67,3±0,2	0,002
<b>C18:3n3</b>	0,15±0,01	0,15±0,01	0,661
<b>C20:0</b>	0,2±0,1	0,201±0,001	0,158
<b>C20:1</b>	0,14±0,01	0,141±0,003	0,026
<b>C20:2</b>	0,054±0,001	0,077±0,001	<0,001
<b>C22:0</b>	0,58±0,02	0,6±0,1	0,048
<b>C22:2</b>	0,246±0,001	0,172±0,004	<0,001
<b>C23:0</b>	0,41±0,01	0,43±0,01	0,005
<b>SFA</b>	17,2±0,2	16,6±0,2	0,008
<b>MUFA</b>	15,62±0,03	15,59±0,03	0,236
<b>PUFA</b>	67,2±0,1	67,8±0,2	0,004

Valores expressos em percentagem relativa. Os resultados são expressos como média±amplitude. SFA *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). PCE: partícula com ergosterol; PSE: partícula sem ergosterol; SPCE: sopa contendo partícula com ergosterol; SPSE: sopa contendo partícula sem ergosterol. <sup>1</sup>Se o valor de p for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas entre as amostras.

Ishido *et al.* (2002) avaliaram o processo de oxidação em microcápsulas preparadas por *spray drying*, a partir de uma emulsão fina contendo ácido linoleico e maltodextrina, com diferentes diâmetros de gotas de óleo. E relataram que a microcápsula preparada a partir da emulsão com menor diâmetro (0,604 µm) foi mais resistente à oxidação, evidenciando a vantagem da desidratação de uma formulação de emulsão com diâmetros de gota menores, como no presente trabalho.

#### 4.4. Incorporação das dispersões desidratadas nas formulações de sopas instantâneas

As dispersões sólidas produzidas na secção 3.3 (PCE e PSE) foram incorporadas em formulações de sopas instantâneas (designadas por SPCE e SPSE, respetivamente). As formulações produzidas foram caracterizadas e o seu perfil nutricional comparado, nomeadamente quanto ao nível de macronutrientes, energia, açúcares solúveis e ácidos gordos. Adicionalmente realizou-se uma análise detalhada dos produtos obtidos para verificar se os mesmos apresentavam citotoxicidade.

#### 4.4.1. Avaliação nutricional das formulações de sopas instantâneas

Na **Tabela 16** apresentam-se os perfis nutricionais e energéticos (por 100 g de produto) das amostras de sopas instantâneas produzidas. Nutricionalmente, os hidratos de carbono correspondem à fração maioritária (81,55 a 81,9 g/100g); as proteínas apresentaram uma variação de 9,4 a 9,7 g/100g, seguidas da gordura (4,8 a 5,16 g/100g) e cinzas (3,5 a 3,89 g/100g).

Pela análise dos açúcares livres, o açúcar que está em maior concentração nas amostras analisadas é a glucose, com valores variando de 5,48 a 5,5 g/100g, seguindo-se a frutose (4,09 a 4,10 g/100g), sacarose (3,03 a 3,02 g/100g), rafinose (1,03 a 1,04 g/100g) e trealose (0,577 a 0,623 g/100g). Em geral, nota-se que entre os açúcares encontrados nas amostras analisadas, a sopa que contém ergosterol (SPCE) apresentou uma quantidade de açúcares totais (14,2 g/100g) muito semelhante à sopa sem ergosterol (SPSE, 14,3 g/100g). O mesmo se nota em relação aos restantes parâmetros nutricionais juntamente com o valor energético. Sendo encontradas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) apenas na quantidade de trealose, porém este valor não compromete alterações da qualidade funcional ou nutricional do produto final.

**Tabela 16.** Perfil nutricional e energético das amostras de sopa de vegetais instantânea.

Amostra	Gordura (g/100g)	Proteínas (g/100g)	Cinzas (g/100g)	Hidratos de Carbono (g/100g)	Frutose (g/100g)	Glucose (g/100g)	Sacarose (g/100g)	Trealose (g/100g)	Rafinose (g/100g)	Energia (kcal/100g)
SPSE	4,8±0,1	9,7±0,2	3,5±0,1	81,9±0,5	4,09±0,02	5,5±0,1	3,03±0,03	0,623±0,002	1,04±0,01	410,3±0,8
SPCE	5,16±0,03	9,4±0,1	3,89±0,08	81,55±0,02	4,10±0,01	5,48±0,01	3,02±0,03	0,577±0,003	1,03±0,03	410,2±0,5
Valor de $p$ teste t-Student <sup>1</sup>	0,005	0,001	0,006	0,105	0,309	0,319	0,568	<0,001	0,546	0,939

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. SPCE: sopa contendo microesfera com ergosterol; SPSE: sopa contendo microesfera sem ergosterol. <sup>1</sup>Se o valor de  $p$  for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas entre as amostras.

Estes resultados foram também comparados com a composição nutricional de sopas instantâneas encontradas atualmente no mercado, cuja formulação mais se assemelhava a utilizada no presente trabalho (**Tabela 17**).

**Tabela 17.** Composição nutricional das sopas de vegetais instantânea comerciais por 100 g de produto.

Informação nutricional	
(a) Porção: 20 g de sopa de vegetais instantânea (total de 4 porções) e 250 mL de água	
Valores nutricionais médios	Por 100 g
Energia (kcal)	350
Lipídeos (g)	9
Hidratos de carbono (g)	55
Proteínas (g)	11,5
(b) Porção: 15,75 g de sopa de vegetais instantânea (total de 4 porções) e 250 mL de água	
Valores nutricionais médios	Por 100 g
Energia (kcal)	336,5
Lipídeos (g)	6,3
Hidratos de carbono (g)	55,9
Proteínas (g)	8,2

Verificou-se que as sopas formuladas neste estudo apresentaram valores de proteínas relativamente similares; uma diminuição no teor de lipídeos e maior teor de hidratos de carbono e energia (410,2 e 410,3 kcal/100g de produto, para as formulações SPCE e SPSE, respetivamente).

A **Tabela 18** mostra a composição em ácidos gordos (expresso em percentagem relativa) obtidos por análise de GC-FID, e as percentagens totais de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA).

Entre os ácidos gordos identificados, o ácido linoleico (C18:2n6c) e o ácido oleico (C18:1n9c) foram os mais abundantes para as duas amostras analisadas, com valores entre 65,95-67,33% e 13,43-15,24%. O ácido gordo saturado maioritário corresponde ao ácido palmítico (C16:0) que varia de 8,87 a 9,17%.

As pequenas variações da percentagem de alguns ácidos gordos fez com que fossem detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, porém na prática tais valores não promovem alterações do produto final.

**Tabela 18.** Composição em ácidos gordos dos produtos finais analisados (média±desvio-padrão).

	SPCE	SPSE	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> - Student <sup>1</sup>
<b>C8:0</b>	0,061±0,001	0,08±0,01	<0,001
<b>C10:0</b>	0,099±0,001	0,073±0,001	<0,001
<b>C11:0</b>	0,030±0,001	0,035±0,001	<0,001
<b>C12:0</b>	0,47±0,01	0,42±0,01	0,005
<b>C13:0</b>	0,044±0,001	0,033±0,001	<0,001
<b>C14:0</b>	0,49±0,01	0,390±0,004	<0,001
<b>C15:0</b>	0,119±0,002	0,115±0,001	0,028
<b>C16:0</b>	9,2±0,1	8,87±0,01	0,001
<b>C16:1</b>	0,198±0,001	0,173±0,004	<0,001
<b>C17:0</b>	0,127±0,003	0,123±0,001	0,019
<b>C17:1</b>	0,054±0,002	0,028±0,001	<0,001
<b>C18:0</b>	3,68±0,01	3,441±0,001	<0,001
<b>C18:1n9c</b>	13,45±0,02	13,434±0,004	<0,001
<b>C18:2n6t</b>	0,17±0,01	0,147±0,004	0,128
<b>C18:2n6c</b>	65,9±0,1	66,43±0,02	0,001
<b>C18:3n6</b>	0,033±0,001	0,073±0,005	<0,001
<b>C18:3n3</b>	3,96±0,01	4,15±0,01	<0,001
<b>C20:0</b>	0,285±0,004	0,252±0,002	<0,001
<b>C20:1</b>	0,14±0,01	0,138±0,001	0,065
<b>C20:2</b>	0,072±0,001	0,08±0,01	0,027
<b>C22:0</b>	0,63±0,02	0,629±0,005	0,468
<b>C22:2</b>	0,284±0,002	0,328±0,001	<0,001
<b>C23:0</b>	0,53±0,01	0,56±0,01	0,004
<b>SFA</b>	15,7±0,1	15,024±0,005	<0,001
<b>MUFA</b>	13,84±0,01	13,77±0,01	<0,001
<b>PUFA</b>	70,4±0,1	71,206±0,002	<0,001

Valores expressos em percentagem relativa. Os resultados são expressos como média±amplitude. SFA *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). SPCE: sopa contendo partícula com ergosterol; SPSE: sopa contendo partícula sem ergosterol. <sup>1</sup>Se o valor de *p* for inferior a 0,05, o parâmetro correspondente apresenta diferenças significativas entre as amostras.

#### ***4.4.2. Avaliação das propriedades citotóxicas da sopa de vegetais instantânea incorporada com as microesferas***

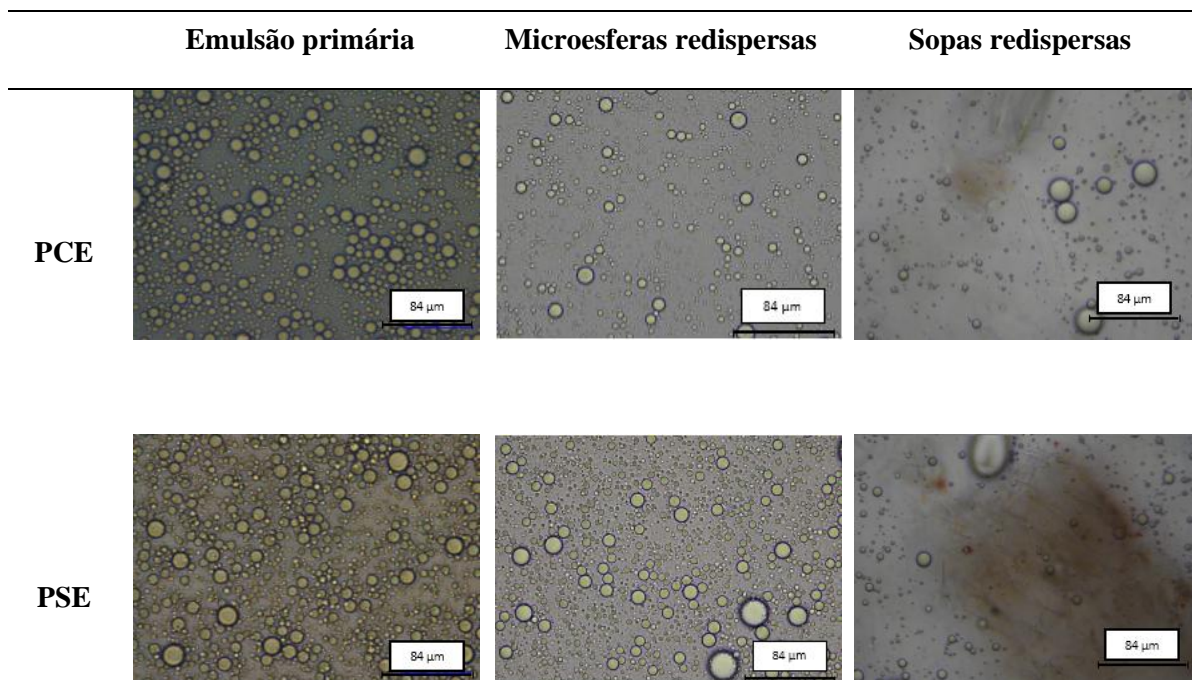
Relativamente à atividade citotóxica, os valores foram expressos em GI<sub>50</sub>, representando a concentração responsável por 50% de inibição do crescimento celular. Verifica-se que para as células não tumorais-PLP2 obtêm-se um GI<sub>50</sub> > 15 mg/mL, concluindo que nenhuma das sopas apresentou toxicidade para as células normais, para a máxima concentração testada. Uma vez que não apresentaram toxicidade em células não-tumorais, os resultados são satisfatórios tanto para as microesferas obtidas quanto para as sopas, pois com a concentração de ergosterol incorporada as sopas vegetais instantâneas não apresentam toxicidade.

#### **4.5. Redispersibilidade**

Devido à alta tensão de cisalhamento durante o processo de desidratação, é provável que ocorram alterações na estrutura da emulsão, com alguma coalescência ou fragmentação das gotículas de óleo, que podem levar a um encapsulamento menos eficiente. A fim de estudar a influência da desidratação por *spray drying* na reconstituição do tamanho das gotículas de óleo, realizou-se um processo de redispersão das microesferas em água.

A partir das imagens da **Figura 14**, nota-se que o tamanho das gotículas das microesferas redispersas apresentam um tamanho relativamente semelhante ao das emulsões primárias, o que pode indicar que as emulsões se mantiveram estáveis durante o processo de desidratação. A mesma estabilidade pode ser observada para as sopas de vegetais que contêm as microesferas, pois estas mantiveram-se um sistema polidisperso e bem distribuído. A capacidade de uma emulsão desidratada ser redispersa em água, é uma propriedade importante para a sua utilização em formulações de alimentos para preparação instantânea, como por exemplo as sopas desenvolvidas no presente trabalho.

Dollo *et al.* (2003) relataram que o uso de maltodextrina (DE=12,6) a 10-30% com caseinato de sódio como emulsificador originou emulsões estáveis e microesferas secas que se redispersaram reconstituindo as emulsões originais (tamanho de gotícula e distribuição de tamanho semelhantes), em comparação com aqueles encapsulados apenas com caseinato de sódio; indicando que a utilização da maltodextrina como material de parede pode ter sido um fator determinante para a eficiência da redispersibilidade.



**Figura 14.** Imagens de microscopia ótica das emulsões primárias produzidas das microesferas com e sem ergosterol (PCE e PSE) e suas respectivas redispersões, e das sopas contendo as PCE e PSE (SPCE e SPSE). Aumento de 40x.

## **5. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO**

Neste trabalho foram produzidas dispersões desidratadas em duas etapas: formação da dispersão primária seguida da secagem pela técnica de *spray drying*. As emulsões O/A primárias foram formadas a partir de óleo de girassol e dois emulsionantes (Tween 20 e Span 20). A maltodextrina foi adicionada à fase água tendo como função proteger o óleo originando um produto final com aspecto seco (emulsões desidratadas). Adicionalmente, foi preparada uma formulação incorporada com ergosterol visando contribuir para o desenvolvimento de alimentos funcionais que proporcionem aos consumidores efeitos benéficos á saúde.

O estudo da formação da dispersão primária compreendeu o estudo de variáveis como o tempo de dispersão ( $T_d$ ), percentagem de MD na fase aquosa e carga em óleo estabelecendo as melhores condições que foram posteriormente validadas experimentalmente, sendo que a formulação com o valor mais promissor de carga em óleo correspondeu ao teor de 32 %. Tal visou adicionar uma quantidade adequada de óleo, sem excesso de maltodextrina, mas promovendo a obtenção de um produto sólido. Este estudo revelou que o modelo matemático obtido pode ser usado como forma de predição da resposta para formulação de outras emulsões, a partir dos parâmetros em estudo ( $T_d$  e carga em óleo), tendo o diâmetro médio de gota ( $D_{\text{médio}}$ ) como resposta.

Adicionalmente, foi possível observar a relação positiva entre o diâmetro médio das gotículas e a carga em óleo, conduzindo a um aumento do diâmetro com o aumento da concentração de óleo. O efeito contrário foi observado com a interação tempo de dispersão e carga em óleo, que apresentou um efeito negativo. Em síntese, para tempos menores e maiores teores de óleo, obtiveram-se tamanhos de gotículas maiores. Porém, com aumento do tempo de dispersão, e mesmo mantendo o teor de óleo elevado, podem resultar em gotículas com diâmetro menor.

A produção de dispersões desidratadas com etapa de secagem por *spray drying* foi realizada com sucesso, tendo sido produzidos pós formados por microesferas esféricas e lisas com uma distribuição de tamanho em número de até aproximadamente 4  $\mu\text{m}$  para 90% das mesmas. Foram obtidos valores semelhante para os dois tipos de dispersões desidratadas produzidas (PSE e PCE). Contudo, as distribuições de tamanho em volume apresentaram algumas diferenças.

Das análises químicas/estruturais por FTIR, foi possível verificar que parte do ergosterol adicionado à formulação se encontra distribuído na parte externa das microesferas, quer seja

pela sua solubilidade limitada, ou pela insuficiência ou adequabilidade do emulsificante utilizado para dissolvê-lo na fase óleo. Esta hipótese suporta o facto de se ter observado uma baixa eficiência de encapsulação (EE).

Quando estudada a estabilidade da oxidação lipídica mediante análise do óleo extraído das microesferas por FTIR verificou-se que não houve alteração das bandas principais (comparativamente ao óleo original) tendo-se concluído que não ocorreu oxidação lipídica. Adicionalmente não se verificaram alterações significativas na composição dos ácidos gordos identificados; concluindo que a técnica de produção de dispersões desidratadas é uma técnica vantajosa para minimização da oxidação do óleo.

Verificou-se ainda que as dispersões desidratadas conduziram à reconstituição da dispersão em água, isto é, apresentaram características de redispersibilidade. Este fator é de extrema importância para a validação da utilização desta tecnologia (produção de dispersões desidratadas) para a produção de ingredientes (óleos secos e/ou óleos secos enriquecidos com bioativos, por exemplo ergosterol) para incorporação em formulações de alimentos de preparação instantânea.

As sopas instantâneas produzidas não revelaram citotoxicidade para células normais (não-tumorais) testadas, nomeadamente para as formulações contendo ergosterol. A composição nutricional das duas sopas analisadas foi semelhante entre si e não diferiu muito da de formulações comerciais típicas atualmente no mercado.

Como trabalho futuro seria interessante proceder a estudos de incorporação de extratos ricos em ergosterol, nomeadamente extratos de *Agaricus bisporus* nas formulações de emulsões desidratadas. Tal poderia superar a dificuldade encontrada quando se utilizou o ergosterol 98%. A presença de outras moléculas nos extratos ricos em ergosterol pode favorecer a encapsulação do ergosterol, tal como relatado em outros estudos. Adicionalmente, o encapsulamento de outras moléculas, juntamente com o ergosterol, pode resultar em efeitos sinérgicos incrementando a bioatividade e efeitos benéficos para o consumidor.



## **6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

A.O.A.C. **Official methods of analysis of AOAC international**. 20<sup>a</sup> ed. AOAC international, 2016.

ABREU, R. M. V *et al.* Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2- carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5800–5806, 2011.

ADELMANN, H.; BINKS, B. P.; MEZZENGA, R. Oil powders and gels from particle-stabilized emulsions. **Langmuir**, v. 28, n. 3, p. 1694–1697, 2012.

AHMED, K. *et al.* Nanoemulsion and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 799–807, 2012.

ALMEIDA, T. C. A. **Avaliação da estabilidade de emulsões concentradas em bebidas**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, 2008.

ARANDA, M. H.; JUNG, C. F.; CATEN, C. S. TEN. Aplicação Do Projeto De Experimentos Para Otimização De Uma Inovação Tecnológica Application of a Design of Experiments for Optimization. **Revista Gestão Industrial**, n. 4, p. 116–132, 2008.

AUGUSTIN, M. A. *et al.* Effects of microencapsulation on the gastrointestinal transit and tissue distribution of a bioactive mixture of fish oil, tributyrin and resveratrol. **Journal of Functional Foods**, v. 3, n. 1, p. 25–37, 2011.

AZEVEDO, S.; CUNHA, L. M.; FONSECA, S. C. DA. Importância da utilização de cogumelos na alimentação humana. **Agrotec: revista técnico-científica agrícola**, mar. 2012.

AZMIR, J. *et al.* Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.

BACHTSI, A. R.; BOUTRIS, C. J.; KIPARISSIDES, C. Production of Oil-Containing Crosslinked Poly (vinyl alcohol) Microcapsules by Phase Separation: Effect of Process

Parameters on the Capsule Size Distribution. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 60, n. 1, p. 9–20, 1996.

BARBOSA-CANOVAS, G. V. *et al.* Food Powders: Physical Properties, Processing, and Functionality. **Food Engineering Series**, v. 1, p. 1286, 2005.

BARREIRA, J. C. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Steroids in natural matrices: Chemical features and bioactive properties. **Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications**, p. 395–431, 2015.

BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p. 217–223, 2014.

BARROS, L. *et al.* Total phenols, ascorbic acid,  $\beta$ -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities. **Food Chemistry**, v. 103, n. 2, p. 413–419, 2007a.

BARROS, L. *et al.* Antimicrobial activity and bioactive compounds of Portuguese wild edible mushrooms methanolic extracts. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 2, p. 151–156, 2007b.

BARROS, L. *et al.* Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1732–1740, 2013.

BEINDORFF, C. M.; ZUIDAM, N. J. Microencapsulation of Fish Oil. In: **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. New York: Springer, 2010. p. 161–185.

BERNHOF, A. A brief review on bioactive compounds in plants. In: **Bioactive compounds in plants – benefits and risks for man and animals**. Oslo: The Norwegian Academy of Science and Letters, Novus Forlag, 2010. p. 18–29.

BERTON-CARABIN, C. C.; ROPERS, M. H.; GENOT, C. Lipid Oxidation in Oil-in-Water Emulsions: Involvement of the Interfacial Layer. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 5, p. 945–977, 2014.

BONNET, M. *et al.* Influence of the oil globule fraction on the release rate profiles from multiple W/O/W emulsions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 78, p. 44–52, 2010.

BOUYER, E. *et al.* Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 359–378, 2012.

BRERETON, R. G. **Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant**. New York: John Wiley & Sons, 2003.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. C. **Planejamento de Experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: EPapers Serviços Editoriais, 2003.

CALVO, P. *et al.* Microencapsulation of extra-virgin olive oil by *spray-drying*: Influence of wall material and olive quality. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 112, n. 8, p. 852–858, 2010.

CARPENTER, J.; SAHARAN, V. K. Ultrasonic assisted formation and stability of mustard oil in water nanoemulsion: Effect of process parameters and their optimization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 35, p. 422–430, 2017.

CAZ, V. *et al.* Plasma cholesterol-lowering activity of lard functionalized with mushroom extracts is independent of niemannpick C1-like 1 protein and ABC sterol transporter gene expression in hypercholesterolemic mice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 8, p. 1686–1694, 2016.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184–190, 2007.

CHEN, C.; TRIPP, C. P. A comparison of the behavior of cholesterol, 7-dehydrocholesterol and ergosterol in phospholipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1818, n. 7, p. 1673–1681, 2012.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate-whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, n. 26, p. 4646–4654, 2006.

CORCORAN, A. *et al.* Biological evaluation of new vitamin D 2 analogues. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 164, p. 66–71, 2016.

DAVIDOV-PARDO, G. *et al.* Utilization of different wall material to microencapsulate fish oil evaluataion of it behaviour in bread product. **American Journal of Food Technology**, v. 3, n. 6, p. 384–393, 2008.

DAY, L. *et al.* Incorporation of functional ingredients into foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 20, n. 9, p. 388–395, 2009.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1035–1052, 2015.

DOLLO, G. *et al.* *Spray-dried* redispersible oil-in-water emulsion to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 273–280, 2003.

DONSÍ, F. *et al.* Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1666–1671, 2011.

DORDEVÍĆ, V. *et al.* Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, n. 4, p. 452–490, 2014.

DRUSCH, S. *et al.* New insights into the microencapsulation properties of sodium caseinate and hydrolyzed casein. **Food hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 332–338, 2012.

DRUSCH, S.; SERFERT, Y.; SCHWARZ, K. Microencapsulation of fish oil with n-octenylsuccinate-derivatised starch: Flow properties and oxidative stability. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, p. 501–512, 2006.

DUAN, X. *et al.* Technical aspects in freeze-drying of foods. **Drying Technology**, v. 34, n. 11, p. 1271–1285, 2016.

FAHY, E. *et al.* A comprehensive classification system for lipids. **Journal of Lipid Research**, v. 46, n. 5, p. 839–862, 2005.

FÄLDT, P.; BERGENSTAHL, B. *Spray-dried* whey protein/lactose/soybean oil emulsions. 1. Surface composition and particle structure. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 4, p. 421–429, 1996.

FANG, Y.; SELOMULYA, C.; CHEN, X. D. On Measurement of food powder reconstitution properties. **Drying Technology**, v. 26, n. 1, p. 3–14, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. DE; ROCHA, G. A. Revisão : Microencapsulação

de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.

FERNANDES, R. V. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Influence of *spray drying* operating conditions on microencapsulated rosemary essential oil properties. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, n. 1, p. 171–178, 2013.

FERREIRA, C. F. R. I. *et al.* Compounds from Wild Mushrooms with Antitumor Potential. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 5, p. 424–436, 2010.

FLANAGAN, J.; SINGH, H. Microemulsions: A potential delivery system for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 3, p. 221–237, 2006.

FRANCISCO, C. R. L. **Micoesteróis como agentes funcionalizantes de iogurtes: estabilização de micoesteróis, de ergosterol e seus derivados obtidos por modificação química**. Tese (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança, 2017.

FRANCISCO, C. R. L. *et al.* Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in *spray-dried* maltodextrin crosslinked with citric acid. **Food Chemistry**, n. 7, p. 1–9, 2017.

GALEA, A. M.; BROWN, A. J. Special relationship between sterols and oxygen: Were sterols an adaptation to aerobic life? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 6, p. 880–889, 2009.

GALLARDO, G. *et al.* Microencapsulation of linseed oil by *spray drying* for functional food application. **Food Research International**, v. 52, n. 2, p. 473–482, 2013.

GARCIA-LAFUENTE, A. *et al.* Mushrooms as a Source of Anti-Inflammatory Agents. **Anti-Inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 125–141, 2010.

GHARSALLAOUI, A. *et al.* Applications of *spray-drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107–1121, 2007.

GIBBS, P. A. Microbiological quality of dried foods. **Concentration and drying of foods**, p. 89–111, 1985.

GIL-RAMIRÉZ, A. *et al.* Effect of ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. **Journal of Functional**

**Foods**, v. 11, p. 589–597, 2014.

GIL-RAMÍREZ, A. *et al.* Modulation of cholesterol-related gene expression by ergosterol and ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus*. **European Journal of Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 1041–1057, 2016.

GOAD, L. J. The effects of antifungal compounds on growth and sterol metabolism in plants and protozoa. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, p. p 269-635, 1994.

GOH, C. H.; HENG, P. W. S.; CHAN, L. W. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 88, n. 1, p. 1–12, 2012.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. A method for pomegranate seed application in food industries : Seed oil encapsulation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 639–652, 2012.

GRANATO, D. *et al.* Physical stability assessment and sensory optimization of a dairy-free emulsion using response surface methodology. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 3, p. 149–155, 2010.

GUADARRAMA-LEZAMA, A. Y. *et al.* Preparation and characterization of non-aqueous extracts from chilli ( *Capsicum annum L.* ) and their microencapsulates obtained by *spray-drying*. **Journal of Food Engineering**, v. 112, n. 1–2, p. 29–37, 2012.

GUILLÉN, M. D.; GOICOECHEA, E. Detection of Primary and Secondary Oxidation Products by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) and <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance (NMR) in Sunflower Oil during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10729–10736, 2007.

GUNSTONE, F. D. **Fatty Acid and Lipid Chemistry**. London: Blackie Academic & Professional, 1996.

GUPTA, S. SEN; GHOSH, M. Preparation and characterisation of protein based nanocapsules of bioactive lipids. **Journal of Food Engineering**, v. 121, n. 1, p. 64–72, 2014.

GURDENIZ, G.; TOKATLI, F.; OZEN, B. Differentiation of mixtures of monovarietal olive oils by mid-infrared spectroscopy and chemometrics. **European Journal of Lipid Science and**

**Technology**, v. 109, n. 12, p. 1194–1202, 2007.

HANSEN, T. *et al.* In vivo evaluation of tablets and capsules containing *spray-dried* o/w-emulsions for oral delivery of poorly soluble drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 293, n. 3, p. 203–211, 2005.

HE, W. SEN *et al.* A novel chemo-enzymatic synthesis of hydrophilic phytosterol derivatives. **Food Chemistry**, v. 192, p. 557–565, 2016.

HELENO, S. A. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1054–1063, 2016.

HELENO, S. A. *et al.* Development of dairy beverages functionalized with pure ergosterol and mycosterol extracts: an alternative to phytosterol-based beverages. **Food Funct.**, v. 8, n. 1, p. 103–110, 2017.

HOGAN, S. A. *et al.* Microencapsulating Properties of Sodium Caseinate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 1934–1938, 2001.

HSIEH, K. Y. *et al.* Oral administration of an edible-mushroom-derived protein inhibits the development of food-allergic reactions in mice. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 33, n. 11, p. 1595–1602, 2003.

ISHIDO, E. *et al.* Oxidation Process of Linoleic Acid Encapsulated with a Polysaccharide by *Spray-Drying*. **Food Science and Technology Research**, v. 8, n. 1, p. 85–88, 2002.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation in the Food Industry. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 24, p. 289–297, 1991.

JAFARI, S. M. *et al.* Nano-particle encapsulation of fish oil by *spray drying*. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 172–183, 2008a.

JAFARI, S. M. *et al.* Encapsulation efficiency of food flavours and oils during *spray drying*. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, 2008b.

JANG, D. J. *et al.* Improvement of bioavailability and photostability of amlodipine using redispersible dry emulsion. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 28, n. 5, p. 405–411, 2006.

JASINGHE, V. J.; PERERA, C. O. Distribution of ergosterol in different tissues of mushrooms and its effect on the conversion of ergosterol to vitamin D2 by UV irradiation. **Food Chemistry**, v. 92, p. 541–546, 2005.

JIMÉNEZ-MARTÍN, E. *et al.* Suitability of Using Monolayered and Multilayered Emulsions for Microencapsulation of  $\omega$ -3 Fatty Acids by *Spray Drying*: Effect of Storage at Different Temperatures. **Food Bioprocess Technology**, v. 8, n. 7, p. 100–111, 2015.

JURAN, J. M.; GODFREY, A. B. **Juran's Quality Handbook**. Fifth ed. Universidade de Michigan: McGraw Hill, 1998.

KALARAS, M. D. *et al.* Generation of potentially bioactive ergosterol-derived products following pulsed ultraviolet light exposure of mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Food Chemistry**, v. 135, n. 2, p. 396–401, 2012.

KALAYA, L.; TIDA, M.; SAIWARUNAIWARUN, C. Microencapsulation of Macadamia oil by *spray drying*. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1660–1665, 2011.

KARUNARATNE, D. N.; PAMUNUWA, G.; RANATUNGA, U. Introductory Chapter: Microemulsions. In: **Properties and Uses of Microemulsions**. IntechOpen, 2017. p. 1–13.

KAUR, S.; DAS, M. Nutritional and functional characterization of barley flaxseed based functional dry soup mix. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5510–5521, 2015.

KEOGH, M. K. *et al.* Stability to Oxidation of *Spray-Dried* Fish Oil Powder Microencapsulated Using Milk Ingredients. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 2, p. 217–224, 2001.

KIM, E. H. J.; CHEN, X. D.; PEARCE, D. Surface composition of industrial *spray-dried* milk powders. 1. Development of surface composition during manufacture. **Journal of Food Engineering**, v. 94, n. 2, p. 163–168, 2009.

KIMURA, Y. *et al.* Isolation of an anti-angiogenic substance from *Agaricus blazei* Murill: Its antitumor and antimetastatic actions. **Cancer Science**, v. 95, n. 9, p. 758–764, 2004.

KLINKESORN, U. *et al.* Stability and rheology of corn oil-in-water emulsions containing maltodextrin. **Food Research International**, v. 37, n. 9, p. 851–859, 2004.

KLINKESORN, U. *et al.* Characterization of *spray-dried* tuna oil emulsified in two-layered

interfacial membranes prepared using electrostatic layer-by-layer deposition. **Food Research International**, v. 39, n. 4, p. 449–457, 2006.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 10, p. 951–968, 2010.

KUO, Y.-C. *et al.* Cell cycle progression and cytokine gene expression of human peripheral blood mononuclear cells modulated by *Agaricus blazei*. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 140, n. 3, p. 176–187, 2002.

LAGARDA, M. J.; GARCÍA-LLATAS, G.; FARRÉ, R. Analysis of phytosterols in foods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 5, p. 1486–1496, 2006.

LEIMANN, F. V. *et al.* Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, 2009a.

LEIMANN, F. V. *et al.* Antimicrobial activity of microencapsulated lemongrass essential oil and the effect of experimental parameters on microcapsules size and morphology. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, n. 2, p. 430–436, 2009b.

LI, P. H.; CHIANG, B. H. Process optimization and stability of d-limonene-in-water nanoemulsions prepared by ultrasonic emulsification using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, n. 1, p. 192–197, 2012.

LINDEQUIST, U.; NIEDERMEYER, T. H. J.; JÜLICH, W. D. The pharmacological potential of mushrooms. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 3, p. 285–299, 2005.

LIU, Y. *et al.* Effectiveness of Dp2 nasal therapy for Dp2- induced airway inflammation in mice : using oral Ganoderma lucidum as an immunomodulator. **Microbiology, Immunology and Infection**, v. 36, p. 236–242, 2003.

LIU, Y. T. *et al.* Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1238–1244, 2012.

- MADENE, A. *et al.* Flavour encapsulation and controlled release - A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1–21, 2006.
- MATTILA, P. *et al.* Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 293–298, 2002.
- MCCLEMENTS, D. J. **Food Emulsions - principles, practices, and techniques**. 3. ed. New York: CRC Press, 2015.
- MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A.; WEISS, J. Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 8, p. 109–124, 2007.
- MCCLEMENTS, D. J.; LI, Y. Structured emulsion-based delivery systems: Controlling the digestion and release of lipophilic food components. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 159, n. 2, p. 213–228, 2010.
- MILANOVIĆ, J. *et al.* Microencapsulation of flavors in carnauba wax. **Sensors**, v. 10, n. 1, p. 901–912, 2010.
- MONTGOMERY, D. C. Introduction to Factorial Designs. In: **Design and Analysis of Experiments**. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 2006. v. 48p. 158.
- MORAN-VALERO, M. I. *et al.* Phytosterols esterified with conjugated linoleic acid. *in vitro* intestinal digestion and interaction on cholesterol bioaccessibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11323–11330, 2012.
- MULLER, P. S. **Microencapsulação do óleo essencial de laranja**. Tese (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal do Paraná, 2011.
- NETO, B. B.; SCARMINIO, S. I.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 4. ed. Campinas: Bookman, 2003.
- NEVES, C. DE F. C.; SCHEVARTZMAN, M. M. E A. M.; JORDÃO, E. Técnica para seleção de variáveis aplicada à separação de gases. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 327–329, 2002.
- NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. G. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 919–925, 2006.
- PAN, Y. *et al.* Effect of barrier properties of zein colloidal particles and oil-in-water emulsions on oxidative stability of encapsulated bioactive compounds. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 82–

90, 2014.

PASANEN, A. L. *et al.* Ergosterol content in various fungal species and biocontaminated building materials. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 1, p. 138–142, 1999.

PATEL, S.; GOYAL, A. Recent developments in mushrooms as anti-cancer therapeutics: a review. **3 Biotech**, v. 2, n. 1, p. 1–15, 2012.

PEACOCK, G. A.; GOOSEY, M. W. Separation of sterols by normal phase Phase High – Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 469, p. p 293-304, 1989.

PÍSECKY, J. **Handbook of milk powder manufacture**. 1. ed. GEA Niro, 2012.

PRAMESTIA, S. P.; RIYANTO, B.; TRILAKSANI, W. Fish Oil Microencapsulation as Omega-3 Fatty Acids Fortification Material for Cream of Crab Soup. **Jurnal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia**, v. 18, n. 2, p. 162–176, 2015.

RAHMAN, M. A. *et al.* Role of excipients in successful development of self-emulsifying/microemulsifying drug delivery system (SEDDS/SMEDDS). **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 39, n. 1, p. p 1-19, 2013.

RAHMAN, M. A; SAIFULLAH, M.; ISLAM, M. N. Fish powder in instant fish soup mix. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 1, p. 145–148, 2012.

RAIKOS, V.; RANAWANA, V. Designing emulsion droplets of foods and beverages to enhance delivery of lipophilic bioactive components – a review of recent advances. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 68–80, 2017.

RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.

RÉ, M. I. Microencapsulation by *Spray Drying*. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 1195–1236, 1998.

RUBILAR, M. *et al.* Development of a soup powder enriched with microencapsulated linseed oil as a source of omega-3 fatty acids. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, n. 4, p. 423–433, 2012.

RUDKE, A. R. **Obtenção de extratos de *Agaricus bisporus* com ergosterol para incorporação em iogurtes e procedimentos de microencapsulação.** Tese (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança, 2016.

SANTIAGO, L. G.; CASTRO, G. R. Novel technologies for the encapsulation of bioactive food compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 78–85, 2016.

SCHAICH, K. M. *et al.* Lipid Oxidation. In: **Biochemistry of Foods**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2015. p. 419–478.

SHAO, S. *et al.* Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11616–11625, 2010.

SHARMA, R.; SINGH, R. B. Bioactive Foods and Nutraceutical Supplementation Criteria in Cardiovascular Protection. **The Open Nutraceuticals Journal**, v. 3, p. 141–153, 2010.

SHIMIZU, T. *et al.* Agarol, an ergosterol derivative from *Agaricus blazei*, induces caspase-independent apoptosis in human cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 48, n. 4, p. 1670–1678, 2016.

SHU, B. *et al.* Study on microencapsulation of lycopene by *spray-drying*. **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 4, p. 664–669, 2006.

SILVA, J. A. *et al.* Aplicação da metodologia de planejamento fatorial e análise de superfícies de resposta para otimização da fermentação alcoólica. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1073–1077, 2008.

SLOMINSKI, A. *et al.* Enzymatic metabolism of ergosterol by cytochrome P450<sub>scc</sub> to biologically active 17 $\alpha$ ,24-dihydroxyergosterol. **Chemistry and Biology**, v. 12, n. 8, p. 931–939, 2005.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical Methods**. 6. ed. Iowa: The Iowa State University Press, 1967.

SOLEIMANPOUR, M.; KOOCHKEKI, A.; KADKHODAEI, R. Influence of main emulsion components on the physical properties of corn oil in water emulsion: Effect of oil volume fraction, whey protein concentrate and *Lepidium perfoliatum* seed gum. **Food Research**

**International**, v. 50, n. 1, p. 457–466, 2013.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004.

TAOFIQ, O. *et al.* UV-irradiated mushrooms as a source of vitamin D2: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 70, n. 10, p. 82–94, 2017.

TEICHMANN, A. *et al.* Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 815–822, 2007.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

TONON, R. V. *et al.* Microencapsulation of Flaxseed Oil by *Spray Drying*: Effect of Oil Load and Type of Wall Material. **Drying Technology**, v. 30, n. 13, p. 1491–1501, 2012.

TORRES, S. *et al.* Steroidal composition and cytotoxic activity from fruiting body of *Cortinarius xiphidipus*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 4, p. 473–476, 2017.

TURCHIULI, C. *et al.* Use of different supports for oil encapsulation in powder by *spray drying*. **Powder Technology**, v. 255, p. 103–108, 2014.

UMESHA, S. S. *et al.* Enrichment of biscuits with microencapsulated omega-3 fatty acid (Alpha-linolenic acid) rich Garden cress (*Lepidium sativum*) seed oil: Physical, sensory and storage quality characteristics of biscuits. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 654–661, 2015.

VEGA, C.; ROOS, Y. H. Invited Review: *Spray-Dried Dairy and Dairy-Like Emulsions—Compositional Considerations*. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 2, p. 383–401, 2006.

VEIGA, C. C. *et al.* Microencapsulation Of Roasted Coffee Oil By Complex Coacervation With Gelatin/Gum Arabic Enzymatically Crosslinked. **Brazilian Journal of Food Research - REBRAPA**, v. 7, n. 2, p. 156–172, 2016.

VIDAL, J.; AVELLO, L.; LOYOLA, C. Microencapsulation of maqui (*Aristotelia chilensis* Molina Stuntz) leaf extracts to preserve and control antioxidant properties. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 73, n. 3, p. 17–23, 2013.

- VILLARES, A. *et al.* Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in Tuber spp. truffles. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1–2, p. 177–182, 2012.
- WANG, R.; TIAN, Z.; CHEN, L. A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. **Food Research International**, v. 44, n. 9, p. 2735–2741, 2011.
- WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 258–274, 2002.
- WEETE, J. D.; ABRIL, M.; BLACKWELL, M. Phylogenetic distribution of fungal sterols. **Plos One**, v. 5, n. 5, p. 3–8, 2010.
- WHELEHAN, M.; MARISON, I. W. Microencapsulation by dripping and jet break up. **Bioencapsulation innovations**, p. 4–10, 2011.
- WIJAYA, C. H.; WIJAYA, W.; MEHTA, B. M. General Properties of Major Food Components. In: **Handbook of Food Chemistry**. Berlin: Springer, 2015. p. 15–54.
- YOON, S. J. *et al.* The nontoxic mushroom *Auricularia auricula* contains a polysaccharide with anticoagulant activity mediated by antithrombin. **Thrombosis Research**, v. 112, n. 3, p. 151–158, 2004.
- YUAN, J. P. *et al.* Determination of ergosterol in ganoderma spore lipid from the germinating spores of *Ganoderma lucidum* by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 17, p. 6172–6176, 2006.
- ZHANG, Y.; MILLS, G. L.; NAIR, M. G. Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant compounds from the mycelia of the edible mushroom *Grifola frondosa*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 26, p. 7581–7585, 2002.



