



INSTITUTO POLITÉCNICO DE BRAGANÇA Escola Superior Agrária

**OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *Agaricus bisporus* COM
ERGOSTEROL PARA INCORPORAÇÃO EM IOGURTES E
PROCEDIMENTOS DE MICROENCAPSULAÇÃO**

Adenilson Renato Rudke

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

Orientado por:

Maria Filomena F. Barreiro

Isabel C.F.R. Ferreira

Odinei Hess Gonçalves

Bragança

2016



**OBTENÇÃO DE EXTRATOS DE *Agaricus bisporus* COM
ERGOSTEROL PARA INCORPORAÇÃO EM IOGURTES E
PROCEDIMENTOS DE MICROENCAPSULAÇÃO**

Adenilson Renato Rudke

**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

Odinei Hess Gonçalves

Bragança

2016

“Alguns objetivos muitas vezes parecem ser impossíveis, mas a determinação, o apoio e a fé traduzem a conquista.”
(Rudke, Adenilson Renato).

DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação a **meus pais Divanir Maria Rudke e Lauri Renato Rudke**. Somente eu sei o esforço de vocês para que eu pudesse conseguir realizar esse sonho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aquele que tornou tudo isso possível me dando sabedoria, paciência, colocando pessoas em minha vida e trilhando as minhas direções, desta maneira, agradeço a **DEUS** por tudo.

Aos meus pais **Divanir Maria Rudke** e **Lauri Renato Rudke**, que são os meus orientadores de vida, e que não mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos. Aos meus irmãos **Alexandro Carlos Rudke** e **Anderson Paulo Rudke** por tudo que fizeram por mim.

A minha namorada **Carla Roana Moraes Monteiro** pelo incentivo, pela paciência, pelo companheirismo, por acreditar em mim e por tudo que me fizeste, meu muito obrigado!

Aos meus orientadores do Instituto Politécnico de Bragança (IPB), Professora **Maria Filomena F. Barreiro** (LA LSRE-LCM), Professora **Isabel C.F.R. Ferreira** (BioChemCore) e da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) Professor **Odinei Hess Gonçalves** por todos os ensinamentos, pela paciência e por depositarem sua confiança em mim.

Aos investigadores que me ajudaram muito no meu trabalho aqui realizado **Ricardo Calhelha**, **Isabel Fernandes**, **Miguel Ángel**, **Lilian Barros** e **Márcio Carocho**. Um obrigado especial a **Sandrina Heleno** que desde o meu primeiro dia no laboratório esteve me ajudando, me cobrando e me apoiando.

Ao grupo do **LA LSRE-LCM** e **BioChemCore** que me receberam, me acolheram e sempre que possível estavam ali para me ajudar.

Aos meus Professores da Universidade Federal de Rondônia (**UNIR**), da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (**UTFPR**) e do Instituto Politécnico de Bragança (**IPB**) que me ensinaram e me ajudaram a chegar até aqui.

Aos **meus familiares** que com palavras, recursos financeiros e até puxões de orelhas, sempre me apoiaram e me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos.

Aos **meus amigos** da UTFPR dos diferentes campus que foram minha família aqui em Bragança, meu obrigado por todas as conversas, risadas e momentos passados

juntos. Aos **colegas** que fiz no Instituto Politécnico de Bragança que tornaram os momentos aqui melhores.

As instituições de ensino UTFPR e IPB que por meio do **programa Dupla Diplomação** me proporcionaram não somente a oportunidade de um intercâmbio, mas de adquirir mais conhecimentos, estabelecer relações com outras culturas e desta maneira obter mais experiências de mundo.

E a **todos** que de forma direta ou indireta contribuíram para que esse trabalho pudesse ser realizado.

Este trabalho foi em parte financiado pelo:

Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - Laboratório Associado LSRE-LCM - financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT); Projeto NORTE-01-0145-FEDER-000006.

Projeto UID/AGR/00690/2013 – Centro de Investigação da Montanha – financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER), através do COMPETE2020 – Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI) e por fundos nacionais através da Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT).



ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	V
AGRADECIMENTOS.....	VII
ÍNDICE	IX
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ABREVIATURAS	XVII
RESUMO.....	XIX
ABSTRACT.....	XXI
1. INTRODUÇÃO	3
1.1. MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS	4
1.2. ESTRUTURA DA DISSERTAÇÃO	5
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	7
2.1 ALIMENTOS E BEBIDAS FUNCIONAIS	8
2.1.1. <i>Definições</i>	8
2.1.2. <i>Aspectos de Regulamentação e Segurança</i>	9
2.1.3. <i>Análise de Mercado</i>	11
2.1.4. <i>Perspectivas Futuras</i>	13
2.2. INCORPORAÇÃO DE BIOATIVOS NATURAIS.....	14
2.2.1. <i>Incorporação de compostos naturais versus compostos sintéticos</i>	14
2.2.2. <i>Desafio para a sua obtenção, comercialização e utilização</i>	15
2.2.3. <i>Casos de sucesso de alimentos funcionais com bioativos naturais</i>	16
2.3. OS MICOESTERÓIS COMO BIOATIVOS	16
2.3.1. <i>Aspectos químicos e fontes de micoesteróis</i>	16
2.3.2. <i>Propriedades bioativas do ergosterol</i>	18
2.3.3. <i>Potencial de utilização em bebidas funcionais por comparação com fitoesteróis</i>	19
2.4. ESTRATÉGIAS E METODOLOGIAS PARA VIABILIZAR O USO DE BIOATIVOS NATURAIS NO SETOR ALIMENTAR.....	20

2.4.1. Microencapsulação e libertação controlada	20
2.4.2. Técnicas de microencapsulação	22
2.4.3. Técnicas de caracterização.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. AMOSTRAS DE <i>AGARICUS BISPORUS</i>	28
3.2. PADRÕES E REAGENTES	28
3.3. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	29
3.4. QUANTIFICAÇÃO DE ERGOSTEROL	29
3.5. AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES BIOATIVAS.....	30
3.5.1. Atividade captadora de radicais DPPH	30
3.5.2. Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais humanas	30
3.5.3. Atividade citotóxica em células não tumorais.....	31
3.6. INCORPORAÇÃO EM IOGURTES	32
3.7. ANÁLISE DAS PROPRIEDADES QUÍMICAS, NUTRICIONAIS E BIOATIVAS DOS IOGURTES.....	33
3.7.1. Composição centesimal	33
3.7.2. Açúcares livres	34
3.7.3. Ácidos gordos	34
3.7.4. Propriedades bioativas	35
3.8. ESTUDOS DE MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO DE <i>A. BISPORUS</i> COM ERGOSTEROL E DO ERGOSTEROL 98%	35
3.8.1. Determinação do pH para obtenção de um melhor rendimento de encapsulação	35
3.8.2. Otimização do processo de microencapsulação utilizando a metodologia de superfície de resposta em função da temperatura e da razão P/Q	36
3.8.3. Otimização da quantidade de ergosterol que pode ser microencapsulada	38
3.8.4. Microscopia ótica.....	38
3.8.5. Rendimento do processo de encapsulação (Y_1)	38
3.8.6. Eficiência de Encapsulação (Y_2)	39
3.8.7. Carga em ergosterol (Y_3).....	39
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40

3.9.1. Incorporação em iogurtes	40
3.9.2. Estudos de microencapsulação utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1. PROPRIEDADES BIOATIVAS DO EXTRATO DE <i>A. BISPORUS</i> E MONITORIZAÇÃO DA QUANTIDADE DE ERGOSTEROL	44
4.2. INCORPORAÇÃO DO EXTRATO DE <i>A. BISPORUS</i> EM IOGURTES	45
4.2.1. Conteúdo de ergosterol nas amostras	45
4.2.2. Efeitos nos macronutrientes e na energia	46
4.2.3. Efeitos nos açúcares solúveis	48
4.2.4. Efeitos nos ácidos gordos	49
4.2.5. Efeitos na atividade antioxidante	52
4.2.6. Efeitos sobre as propriedades citotóxicas	53
4.3. ESTUDOS DE MICROENCAPSULAÇÃO DO EXTRATO DE <i>A. BISPORUS</i> CONTENDO ERGOSTEROL E DE ERGOSTEROL 98%	55
4.3.1. Determinação do pH para obtenção de maior quantidade de cápsulas	55
4.3.2. Otimização do processo de microencapsulação utilizando a metodologia de superfície de resposta em função da temperatura e da razão P/Q	57
4.3.3. Otimização da quantidade de ergosterol encapsulada	65
5. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
A PRESENTE DISSERTAÇÃO DEU ORIGEM A:	89
7. ANEXOS	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do ergosterol.....	17
Figura 2. Principais estruturas que são formadas na microencapsulação. a) Estrutura de uma microcápsula; b) estrutura de uma microesfera. Adaptado de Lembo & Cavalli, (2010).....	21
Figura 3. Esquemática do ensaio realizado.....	38
Figura 4. Médias Marginais Estimadas (MME) para a gordura.....	47
Figura 5. Médias Marginais Estimadas (MME) para a sacarose.....	49
Figura 6. Médias Marginais Estimadas (MME) para a atividade captadora de DPPH.	53
Figura 7. Microscopia ótica (400X) das microesferas formadas com diferentes pHs e diferentes razões P/Q. a) pH 5,0 3:1. b) pH 5,0 5:1. c) pH 5,5 3:1 d) pH 5,5 5:1.	56
Figura 8. Representação gráfica dos resultados obtidos para a microencapsulação do ergosterol presente no extrato para 3 variáveis respostas: Y_1 demonstra a percentagem de microesferas formadas durante o processo; Y_2 apresenta a eficiência de microencapsulação e; Y_3 demonstra a percentagem de ergosterol inserida nas microesferas formadas.....	62
Figura 9. Representação gráfica dos resultados obtidos para a microencapsulação do ergosterol 98% para 3 variáveis respostas: Y_1 demonstra a percentagem de microesferas formadas durante o processo; Y_2 que apresenta a eficiência de microencapsulação e; Y_3 demonstra a percentagem de ergosterol inserida nas microesferas formadas.....	63
Figura 10. Representações gráficas em 2D das variáveis resposta (Y_1 , Y_2 e Y_3). A linha mais clara representa o ergosterol 98% e a linha mais escura representa o extrato.	64
Figura 11. Representação gráfica dos resultados obtidos para a microencapsulação com o aumento da concentração de ext e erg para as respostas Y_1 , Y_2 e Y_3	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Alguns compostos que apresentam “propriedade funcional” aprovados pela ANVISA.	10
Tabela 2. Alguns compostos que apresentam “propriedade funcional” aprovados pelo Regulamento (UE) nº432/2012.....	11
Tabela 3. Exemplos de alimentos em que foram incorporadas substâncias bioativas. Livres (L) ou Microencapsuladas (M).	17
Tabela 4. Concentrações de ergosterol (mg/100 g ms) em espécies de cogumelos comestíveis (BARREIRA <i>et al.</i> , 2014).	18
Tabela 5. Informação da quantidade de extratos ou ergosterol incorporados nos iogurtes.	33
Tabela 6. Ensaio de microencapsulação do ergosterol ou extrato em função da temperatura e da razão proteína:quitosano (P/Q).	36
Tabela 7. Propriedades bioativas do extrato de <i>A. Bisporus</i> (ext) e do ergosterol (erg).....	44
Tabela 8. Conteúdo de ergosterol presente nas amostras.	45
Tabela 9. Perfil nutricional e energético das amostras de iogurte analisadas.	46
Tabela 10. Composição em açúcares solúveis das amostras de iogurte analisadas.	48
Tabela 11. Composição em ácidos gordos maioritários das amostras de iogurte analisadas.	51
Tabela 12. Atividade antioxidante das amostras de iogurte analisadas.....	52
Tabela 13. Propriedades citotóxicas das amostras de iogurte analisadas.....	54
Tabela 14. Rendimento de formação de coacervato (com e sem adição de extrato).	55
Tabela 15. Resultados médios obtidos do plano experimental para as variáveis respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 alterando os parâmetros de $T (X_1)$ e $P/Q (X_2)$	57

- Tabela 16.** Resultados paramétricos do PCC com 5 níveis para o efeito combinado da T (x_1) e relação P/Q (x_2) nas respostas testadas (Y_1 , Y_2 e Y_3) de acordo com a equação [6]. Análise do significado dos parâmetros ($\alpha= 0,05$) são apresentados em valores percentuais e naturais (entre parêntesis). Além disso, a informação estatística do procedimento de ajuste ao modelo é apresentada.....60
- Tabela 17.** Valores de condições ótimas de microencapsulação de ergosterol obtidas para o extrato e o ergosterol 98% nas variáveis respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 alterando os parâmetros de Temperatura (T) (X_1) e razão P/Q (X_2).....61
- Tabela 18.** Microesferas obtidas para ext e erg nas diferentes condições analisadas (imagens com ampliação de 400X).65
- Tabela 19.** Resultados do plano experimental obtido para as variáveis respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 alterando a massa de ergosterol a ser encapsulada (X_3).....67
- Tabela 20.** Microesferas obtidas para ext e erg do processo de otimização da quantidade de ergosterol a ser encapsulada (imagens com ampliação de 400X). ...69

LISTA DE ABREVIATURAS

Parâmetros matemáticos, de equações e siglas utilizadas neste trabalho

ACR	Atividade Captadora de Radicais.
cf	Massa de cápsulas formadas.
E	Energia.
e	Massa de ergosterol ou extrato.
ene	Massa de ergosterol não encapsulado.
erg	Ergosterol 98%.
ext	Extrato de <i>A. bisporus</i> .
et	Massa de ergosterol teórica.
fp	Massa total no final do processo.
g	Massa de gordura.
hc	Massa de hidratos de carbono.
ICN	logurte controlo negativo.
ICP	logurtes controlo positivo.
ip	Massa total no início do processo.
IERG1	logurtes com a incorporação de 0,075 g de ergosterol com pureza de 98%.
IERG2	logurtes com a incorporação de 2 g de ergosterol com pureza de 98%.
IEXT	logurtes com a incorporação de 2 g de extrato de <i>A. bisporus</i> .
(L)	Livre.
(M)	Microencapsulada.
m/m	Massa/massa.
MME	Médias Marginais Estimadas.
ms	Massa seca.
MSR	Metodologia de Superfície de resposta.
ni	Não identificado.
ns	Não significativo.
P/Q	Razão Proteína:Quitosano.
p	Massa de proteína.
PCC	Planeamento composto central.
q	Massa de quitosano.
T	Temperatura.
T0:	Tempo inicial (após a incorporação nos iogurtes).
T1	Tempo 1 (7 dias após a incorporação nos iogurtes).
TA	Tempo de armazenamento.
TI	Tipo de incorporação.
v/v	Volume/volume.
X₁	Variável que representa a temperatura.
X₂	Variável que representa a razão P/Q.
X₃	Variável que representa a massa de ergosterol.
Y₁	Percentagem de rendimento de encapsulação
Y₂	Percentagem de ergosterol encapsulado.
Y₃	Percentagem de ergosterol encapsulado referente as cápsulas formadas.

Reagentes, padrões e linhas celulares

DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> – “Meio Eagle modificado por Dulbecco”.
DMSO	Dimetilsulfóxido.
DPPH	2,2 Difenil-1-picril-hidrazilo.
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i> “Soro Fetal Bovino”.
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> - “Solução Salina Equilibrada de Hank”.
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical.

HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular.
LPS	Lipopolissacárido.
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma de mama.
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão.
PLP2	<i>Porcine liver primary culture</i> – “cultura primária de células de fígado de porco”.
SRB	Sulforrodamina B.
Tris	Trisaminometano.
TROLOX	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.

Outros

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
CD	Ciclodextrina.
EC₅₀	Concentração responsável por 50% da atividade captadora de radicais DPPH.
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i> – “Coleção Europeia de Cultura de células.
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i> - “Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar”.
EUA	Estados Unidos da América.
FUFOSE	<i>European Commission’s Concerted Action on Functional Food Science in Europe</i> – “Comissão europeia sobre ciência dos Alimentos Funcionais na Europa”.
GRAS	<i>Generally Recognized as Safe</i> – “Compostos geralmente reconhecidos como seguros”.
HPLC	<i>High-performance Liquid Chromatography</i> – “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”.
IC₅₀	Concentração responsável por 50% da inibição do crescimento celular.
ILSI - IR	<i>International Life Science Institute</i> – “Instituto Internacional de Ciência da vida”. Índice de refração.
ITAL	Instituto de Tecnologia de Alimentos.
MEV	Microscopia eletrônica de varrimento.
MFA	Microscopia de Força atômica.
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos monoinsaturados”.
MO	Microscopia ótica.
PARNUTS	<i>Foods for Particular Nutritional Uses</i> – “Alimentos para usos nutricionais particulares”.
pl	Ponto isoelétrico.
pK_a	Logaritmo negativo da constante de acidez.
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> – “ácidos gordos polinsaturados”.
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada.
SFA	<i>Saturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos saturados”.
UE	União Europeia.
UV	Ultra Violeta.
WPI	<i>Whey Protein Isolate</i> – “Isolado protéico de soro”.

RESUMO

Além de ser o cogumelo mais consumido no mundo, *Agaricus bisporus* é um dos cogumelos mais ricos em ergosterol, representando esta molécula quase 90% da sua fração de esteróis. Vários estudos têm atribuído ao ergosterol diferentes bioatividades, incluindo efeitos hipocolesterolémicos semelhantes aos exibidos pelos fitoesteróis. Isto torna o ergosterol uma molécula interessante para ser estudada como composto nutracêutico. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial de utilização dos extratos de *A. bisporus* ricos em ergosterol na produção de bebidas lácteas funcionais. Para o efeito, foram realizados testes de incorporação do extrato e do ergosterol puro em iogurtes que se compararam com bebidas lácteas funcionais comerciais (aditivadas com fitoesteróis).

As amostras de *A. bisporus* foram submetidas a uma extração assistida por ultrassons e os extratos obtidos (IEXT), bem como a molécula de ergosterol em diferentes concentrações (IERG1 e IERG2), foram incorporados em iogurtes, e comparadas com amostras controlo (amostras de iogurte sem aditivos) (ICN) e iogurtes comerciais contendo fitoesteróis (ICP). Todas as amostras foram analisadas imediatamente após a incorporação (T0), e após sete dias de armazenagem a 4°C (T1), em relação aos parâmetros nutricionais, atividade antioxidante e propriedades citotóxicas em linhas celulares tumorais humanas e numa cultura primária de células de fígado de porco (não tumoral) para avaliação da toxicidade. O teor de ergosterol incorporado na forma pura, ou presente nos extratos, foi monitorizado por HPLC-UV.

Adicionalmente, foi realizado um estudo de microencapsulação utilizando a técnica de coacervação, tendo o quitosano e o isolado proteico de soro como materiais encapsulantes. Num ensaio preliminar determinou-se o pH conducente a um maior rendimento de encapsulação e, seguidamente, verificou-se a influência da razão proteína:quitosano (P/Q) e da temperatura utilizada, no rendimento de encapsulação (Y_1), na eficiência de encapsulação (Y_2) e na carga (teor de ergosterol nas microesferas) (Y_3). Posteriormente, o estudo foi realizado baseando-se nas melhores condições para encapsular ergosterol, sendo também avaliadas as respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 .

As bebidas funcionalizadas com o extrato (IEXT) e com ergosterol na mesma concentração existente no extrato (IERG1) revelaram uma atividade antioxidante similar às bebidas comerciais com fitoesteróis. No entanto, as bebidas com ergosterol na mesma concentração do extrato de *A. bisporus* e de fitoesteróis (IERG2) revelaram uma atividade antioxidante superior. Além disso, apenas IEXT, IERG1 e IERG2 apresentaram um aumento na atividade antioxidante de T0 para T1, com destaque para a atividade exibida por IERG2, significando que o ergosterol e os extratos foram capazes de proteger a bebida láctea da oxidação, aumentando a vida de prateleira do produto. IERG2 foi a amostra que revelou a maior citotoxicidade para as linhas celulares tumorais, enquanto as bebidas com fitoesteróis mostraram a menor atividade, sem diferenças significativas entre T0 e T1. Os estudos de microencapsulação revelaram ainda que a técnica de coacervação permite obter cápsulas de distintos tamanhos e que as condições ótimas do processo ocorrem a pH 5,5, com temperatura de 55°C e razão P/Q de 0,5, com um menor rendimento de encapsulação, mas com uma maior carga em ergosterol.

Este trabalho contribuiu para o estudo do potencial da utilização de extratos de *A. bisporus* com ergosterol no desenvolvimento de novas bebidas funcionais. Constituiu um primeiro passo que necessita de estudos subsequentes relacionados com a avaliação da viabilidade da sua utilização ao nível industrial e demonstração clara da sua bioatividade *in vivo*.

ABSTRACT

Besides being the most consumed mushroom in the world, *Agaricus bisporus* is one of the richest mushroom species in ergosterol, constituting this molecule almost 90% of its sterols fraction. Several studies have attributed different bioactivities to ergosterol, including cholesterol-lowering effects, similar to those exhibited by phytosterols, which makes this molecule interesting to be studied as a nutraceutical compound. This work aimed to evaluate the potential use of extracts of *A. bisporus* rich in ergosterol in the production of functional dairy drinks. For this purpose, it was performed tests of extract and pure ergosterol incorporation in yoghurts that were compared to commercial milk products (added with phytosterols).

A. bisporus samples were subjected to ultrasound assisted extraction and the obtained extracts (IEXT), as well as pure ergosterol, at different concentrations (IERG1 and IERG2), were incorporated into yogurts, and further compared with control samples (yogurts with no additives) (ICN) and commercial yogurts with phytosterols (ICP). All samples were analyzed immediately after incorporation (T0) and after seven days of storage at 4°C (T1) in terms of nutritional parameters, antioxidant activity and cytotoxic properties against human tumor cell lines and a porcine liver primary culture (non-tumor) for toxicity evaluation. The incorporated ergosterol content, either as a pure molecule or included in extracts, was monitored by HPLC-UV. Microencapsulation studies were also carried out using the coacervation technique and chitosan and protein isolated from whey as the wall materials. In a preliminary test it was determined the pH leading to the higher encapsulation yield, followed by the study of the influence of the protein ratio: chitosan (P/Q) and the used temperature in the yield of encapsulation (Y_1), encapsulation efficiency (Y_2) and encapsulation load (ergosterol content in the microspheres) (Y_3). Afterwards, the study was conducted based on the best conditions to encapsulate ergosterol, and Y_1 , Y_2 and Y_3 were also evaluated.

The yogurts functionalized with the extract (IEXT), and the ergosterol at an equivalent concentration as the one present in the extract (IERG1), showed antioxidant activity similar to the one of commercial beverages with phytosterols. However, samples with ergosterol at the same concentration of the *A. bisporus* extract and of phytosterols

(IERG2) revealed the highest antioxidant activity. Moreover, only IEXT, IERG1 and IERG2 showed an increase in the antioxidant activity from T0 to T1, highlighting the activity displayed by IERG2, which means that ergosterol and the extracts were able to protect the yogurt from oxidation, increasing product shelf life. IERG2 was the sample showing the highest cytotoxicity to tumor cell lines, while yogurts with phytosterols showed lower activity without significant differences between T0 and T1. The study also revealed that microencapsulation by the coacervation technique allowed obtaining capsules with different sizes and that the process optimum conditions occur at pH 5.5, with 55°C temperature and at a ratio P/Q of 0.5, with a lower yield of encapsulation but with a higher load in ergosterol.

This work contributed to evaluate the potential of using of *A. bisporus* extracts with ergosterol in the development of new functional beverages. It was a first step which needs subsequent studies the check the feasibility of its use at industrial level and to clear demonstrate their bioactivity *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO



1.1. Motivação e Objetivos

A seleção da espécie de cogumelo *Agaricus bisporus* baseia-se no facto de este ser descrito na literatura como apresentando diversas bioatividades, para além de ser um dos cogumelos mais cultivados em todo o mundo e ser uma espécie comestível muito apreciada do ponto de vista nutricional e organolético. Das moléculas presentes neste cogumelo, destaca-se o ergosterol, descrito como apresentando diversas propriedades bioativas nomeadamente, atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e hipocolesterolémica. Por outro lado, os produtos lácteos, onde se inclui o iogurte, são consumidos em grande quantidade e genericamente por toda a população. Desta forma, a incorporação de um extrato rico em ergosterol num iogurte pode levar à obtenção de um novo produto funcional e alternativo aos que existem já no mercado mas que incorporam esteróis de origem vegetal (fitoesteróis) e não micoesteróis (e.g., ergosterol).

Numa perspectiva futura, se os produtos desenvolvidos forem bem aceites pela indústria e consumidores, a utilização de micoesteróis em iogurte pode contribuir para o desenvolvimento económico da região onde se desenrolou este trabalho, nomeadamente através dos produtores de cogumelos que podem encontrar alternativas de valor acrescentado para o material que produzem e/ou para resíduos gerados (biomassa que não esteja em condições de ir para o mercado em fresco).

Objetivo geral:

- Avaliar o potencial de utilização dos extratos de *A. bisporus* ricos em ergosterol na produção de bebidas lácteas funcionais e sua comparação com iogurtes comerciais aditivados com fitoesteróis.

Objetivos específicos:

- Obtenção de extratos ricos em micoesteróis, a partir de *Agaricus bisporus*, utilizando extração assistida por ultrassons em condições previamente otimizadas;

- Caracterização dos extratos obtidos quanto à atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória;
- Incorporação dos extratos em iogurtes e estudos comparativos com iogurtes aditivados com fitoesteróis;
- Avaliação do impacto do uso dos extratos no valor nutricional e propriedades bioativas dos iogurtes obtidos;
- Seleção de um método de microencapsulação para viabilizar a proteção dos extratos e que seja compatível com a indústria alimentar, nomeadamente incorporação em iogurtes;
- Otimização do método de microencapsulação estudando diferentes variáveis do processo (pH, razão P/Q e temperatura) no rendimento de encapsulação (Y_1), eficiência de encapsulação (Y_2) e na carga (teor de ergosterol nas microesferas) (Y_3).

1.2. Estrutura da Dissertação

A dissertação encontra-se organizada em 5 capítulos principais; neste primeiro Capítulo é abordada a motivação para a execução deste trabalho e, além disso, apresentam-se os objetivos gerais e específicos do trabalho.

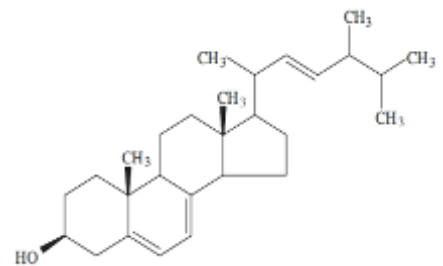
No Capítulo 2 “**Revisão Bibliográfica**” foi realizada uma revisão da literatura sobre os seguintes temas de estudo: (i) Alimentos e Bebidas Funcionais; (ii) Incorporação de bioativos naturais; (iii) Os micoesteróis como bioativos e; (iv) Estratégias e metodologias para viabilizar o uso de bioativos naturais no setor alimentar.

No Capítulo 3 “**Material e métodos**” é descrito quais os materiais utilizados para a realização das experiências, abordando também as metodologias necessárias para a sua execução.

No Capítulo 4 “**Resultados e discussão**” são mostrados os resultados obtidos nas diversas experiências, assim como, se apresenta uma discussão dos resultados obtidos fundamentada na teoria relacionada com a temática em causa.

Por fim, no Capítulo 5 “**Conclusão e Trabalho futuro**” são apresentadas as principais conclusões obtidas da realização do presente trabalho, apresentando-se também sugestões para trabalhos futuros.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



2.1 Alimentos e bebidas funcionais

Os alimentos com benefícios para a saúde sempre estiveram presentes nas nossas vidas. Mesmo por superstições ou misticismo, as populações utilizavam principalmente plantas para “curar” ou aliviar algum mal que lhes era causado. O que é relativamente novo, é o conceito que deu nome a este tipo de alimentos, os chamados alimentos funcionais, que surgiram no Japão por volta de 1980.

De 1980 até os dias de hoje, apesar de ainda não terem uma definição universalmente aceita, o mercado de alimentos funcionais cresceu exponencialmente assim como as pesquisas relacionadas com as substâncias que apresentam benefícios para a saúde.

2.1.1. Definições

O termo “alimentos funcionais” foi introduzido pela primeira vez pelo governo japonês em meados de 1980, uma vez que o país queria desenvolver alimentos saudáveis para uma população que apresentava uma diminuta esperança de vida (BIGLIARDI & GALATI, 2013; ZERAIK *et al.*, 2010). Atualmente os alimentos funcionais tornaram-se cada vez mais populares por garantirem ou melhorarem a saúde, trazendo com o seu consumo, benefícios a uma dada função fisiológica alvo (HO, 2015; SIEGRIST *et al.*, 2015).

Na Europa, o interesse pelos alimentos funcionais iniciou-se por volta de 1990 (CORBO *et al.*, 2014). A Comunidade Europeia, mais precisamente a *European Commission's Concerted Action on Functional Food Science in Europe* (FuFoSE), coordenada pelo *International Life Science Institute (ILSI) Europe*, considera o alimento funcional como sendo aquele que afeta de maneira satisfatória uma ou mais funções do organismo, promovendo uma melhoria no estado de saúde e bem-estar e/ou uma redução do risco de doença (HOWLETT, 2008) . Já Ford *et al.* (2007) consideram o alimento funcional como sendo aquele que além de ter a capacidade de nutrir apresenta outros atributos que promovem a saúde e o bem estar de quem os consome.

No Brasil, não existe uma definição oficial para o termo. No entanto, a resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) nº 18, de 30 de Abril de 1999,

declara que o alimento que receber a denominação de alimento funcional deve promover além das funções nutricionais básicas, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999).

O conceito de alimento funcional provém da constatação de que os componentes específicos da dieta têm a capacidade de contribuir, para além dos benefícios na nutrição básica, para corrigir distúrbios metabólicos, resultando numa redução do risco de doença e na manutenção da saúde. Tal é conseguido por combinação de produtos comestíveis com moléculas biologicamente ativas (BINNS & HOWLETT, 2009; PIRES *et al.*, 2015). Apesar de apresentarem benefícios para a saúde, estes alimentos não podem ser considerados fármacos/medicamentos, por terem um carácter de redução do risco de doenças e não um carácter terapêutico (ROBERFROID, 2002).

Em suma, os alimentos funcionais não fornecem apenas nutrientes, mas também benefícios para a saúde de quem os consome; o seu consumo implica uma redução de custos diretos e indiretos com a saúde, nomeadamente ao nível da prevenção de várias doenças crónicas prevalentes como diabetes, cancro e doenças coronárias (DAS *et al.*, 2010).

2.1.2. Aspetos de Regulamentação e Segurança

No Brasil, quem regulamenta se o alimento pode ser considerado funcional ou não, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que preconiza que não serão aprovadas alegações para ingredientes ou componentes dos alimentos, mas sim para o produto final que tenha esse(s) ingrediente(s) ou componente(s). Desta forma, um alimento só poderá conter no rótulo “Alimento Funcional” após prévia avaliação deste órgão federal como descrito na RDC 278 de 22 de setembro de 2005 (ANVISA, 2005).

A Tabela 1 descreve alguns dos compostos que têm a alegação a propriedades funcionais aprovada pela ANVISA.

Tabela 1. Alguns compostos que apresentam “propriedade funcional” aprovados pela ANVISA.

CLASSE	COMPOSTO	ALEGAÇÃO
Ácidos Gordos	- Ómega 3	- O seu consumo auxilia na manutenção de níveis saudáveis de triglicérides.*
Carotenóides	- Licopeno - Luteína - Zeaxantina	- Apresentam ação antioxidante que protege as células contra os radicais livres.
Fibras Alimentares	- Beta glucana - Dextrina resistente - Goma Guar parcialmente hidrolisada - Lactulose - Polidextrose	- Auxiliam na redução da absorção de colesterol.* - Auxiliam o funcionamento do intestino.*
	- Frutooligossacarídeo (FOS) - Inulina	- Contribuem para o equilíbrio da flora intestinal.*
	- Psillium - Quitosano	- Auxiliam na redução da absorção de gordura.* - Auxiliam na redução da absorção de gordura e colesterol.*
Fitoesteróis	- Fitoesteróis	- Auxiliam na redução da absorção de colesterol.*
Polióis	- Manitol - Xilitol - Sorbitol	- Não produzem ácidos que danificam os dentes.
Probióticos		- Contribuem para o equilíbrio da flora intestinal.*
Proteína de soja		- O consumo de no mínimo 25 gramas pode ajudar a reduzir o colesterol.*

*O consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis.

Na União Europeia os produtos que contenham componentes nutracêuticos, ou seja substâncias que podem prevenir e/ou atuar no tratamento de uma doença, e os alimentos funcionais, devem seguir as exigências gerais da diretiva de rotulagem dos alimentos e as exigências da categoria dos alimentos designado PARNUTS “*Foods for Particular Nutritional Uses*” (CENCIC & CHINGWARU, 2010; CHEFTEL, 2005). Essa legislação é um bom exemplo, pois considera a avaliação científica dos riscos, a proteção ao consumidor, a responsabilidade do produtor e a inovação de mercado de maneira proporcional (COPPENS *et al.*, 2006).

O Regulamento (UE) nº432/2012 estabelece que as alegações de saúde na rotulagem de alimentos são proibidas, exceto se forem autorizadas pela Comissão, e desde que, estejam em conformidade com as condições estabelecidas no anexo

deste regulamento. Alguns exemplos de substâncias aprovados neste regulamento estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2. Alguns compostos que apresentam “propriedade funcional” aprovados pelo Regulamento (UE) nº432/2012.

NUTRIENTE/SUBSTÂNCIA	ALEGAÇÃO*
Ácido alfa-linolénico	Contribui para a manutenção de níveis normais de colesterol no sangue.
Ácido docosa-hexaenóico	Contribui para a manutenção de uma visão normal.
Ácido linoleico	Contribui para a manutenção de níveis normais de colesterol no sangue.
Ácido pantoténico	Contribui para uma síntese e um metabolismo normais das hormonas esteróides, da vitamina D e de alguns neurotransmissores.
Beta-glucanos	Contribuem para a manutenção de níveis normais de colesterol no sangue.
Betaína	Contribui para o normal metabolismo da homocisteína.
Biotina	Contribui para o normal funcionamento do sistema nervoso.
Colina	Contribui para o normal metabolismo dos lípidos.
Creatina	Aumenta o desempenho físico durante exercícios repetidos de curta duração e alta intensidade.
Culturas vivas em iogurte	Melhoram a digestão da lactose destes produtos em indivíduos com dificuldades de digestão da lactose.
Enzima Lactase	Melhora a digestão da lactose em indivíduos com dificuldades de digestão da lactose.
Esteróis em vegetais e estanois vegetais	Contribuem para a manutenção de níveis normais de colesterol no sangue.
Niacina	Contribui para uma normal função psicológica.
Polifenóis do azeite	Contribuem para a proteção dos lípidos do sangue contra as oxidações indesejáveis.
Vitamina D	Contribui para níveis normais de cálcio no sangue.

*Estas alegações só são aceites com condições específicas discriminadas no Regulamento (UE) nº432/2012.

2.1.3. Análise de Mercado

Devido à falta de uma definição internacionalmente aceite de alimentos funcionais é muito difícil obter dados sobre esse mercado. No entanto, é evidente que este mercado é uma tendência na indústria alimentar estando em contínua expansão (CORBO *et al.*, 2014). Assim, torna-se difícil chegar a um número sobre o mercado de alimentos funcionais na Europa, no entanto as estimativas para a faixa de mercado da UE situam-se entre os 6 e 20 bilhões de euros, ocupando o terceiro

lugar no mercado de alimentos (BECH-LARSEN & SCHOLDERER, 2007; SIEGRIST *et al.*, 2008; STEIN & RODRÍGUEZ-CEREZO, 2008). Adicionalmente, a Europa juntamente com Japão e Estados Unidos contribuem com mais de 90% do total de vendas desses produtos (SIRÓ *et al.*, 2008). Os países europeus que mais contribuem para esse mercado são Alemanha, França, Reino Unido e países Baixos (ANNUNZIATA & VECCHIO, 2011; GRANATO *et al.*, 2010; MENRAD, 2003; SIRÓ *et al.*, 2008).

O mercado de alimentos funcionais tem um crescimento estimado em 10% ao ano. Neste segmento, o setor que regista maior crescimento é o de bebidas funcionais (*Functional Beverages*) (CORBO *et al.*, 2014). As bebidas funcionais, nomeadamente as bebidas lácteas com características funcionais, tiveram um crescimento de 2,5% entre 2008 e 2011 na América Latina (PIRES *et al.*, 2015). Na Alemanha, os produtos lácteos com características funcionais tiveram um crescimento muito significativo, 5 milhões de dólares em 1995 para mais de 300 milhões de dólares em 2000 (SIRÓ *et al.*, 2008). Para 2015, há uma previsão de 130 bilhões de dólares para as vendas globais de alimentos e bebidas funcionais (SLOAN, 2012).

O setor de bebidas funcionais tem crescido de maneira heterogénea dependendo das características socioculturais, sociodemográficas e da percepção da aceitação por parte dos consumidores (CORBO *et al.*, 2014). A procura de alimentos funcionais na União Europeia varia de país para país dependendo principalmente da herança cultural e das tradições alimentares de cada país. No entanto, há um maior interesse nesses produtos por parte dos habitantes do norte e do centro, quando comparados com os países do mediterrâneo (ANNUNZIATA & VECCHIO, 2011; MENRAD, 2003; SIRÓ *et al.*, 2008).

No Brasil, em 2009, o mercado de alimentos funcionais movimentou mais de 500 milhões de reais (1,7 bilhão de dólares em valores atuais), devido ao facto de uma grande parte das indústrias ter criado alimentos sensorialmente agradáveis e ter desenvolvido uma significativa estratégia de marketing para esses alimentos (GIANEZINI *et al.*, 2012; GRANATO *et al.*, 2010). Até 2019 este mercado deve movimentar 108,5 bilhões (ABENUTRI, 2015).

2.1.4. Perspectivas Futuras

A consciencialização por parte da população em relação ao consumo de alimentos que contenham substâncias que auxiliam na promoção de saúde, e no estado nutricional, tem vindo a aumentar nos últimos anos. Os alimentos funcionais são a nova tendência do mercado alimentar e novos produtos com essa alegação são lançados continuamente (RAUD, 2008; SIEGRIST *et al.*, 2015).

De uma maneira geral, há uma preocupação para que os rótulos dos alimentos funcionais apresentem informações que possam ser compreendidas pelo consumidor; além disso, estes produtos não requerem apenas atenção no que diz respeito ao seu conteúdo nutricional e alegações de saúde, mas também, no que concerne à tecnologia envolvida na sua produção (PIRES *et al.*, 2015). O sucesso dos alimentos funcionais depende de vários fatores, sobretudo da aceitação desses produtos por parte do consumidor, devendo este estar convencido que aquele produto trará benefícios à sua saúde (GRANATO *et al.*, 2010).

Segundo o Instituto de Tecnologia de Alimentos do Brasil (ITAL) existe uma tendência para que a alimentação futura esteja cada vez mais relacionada, entre outros fatores, com produtos funcionais (ITAL, 2010). Isto porque os consumidores estão a modificar os seus hábitos de consumo e a fazer escolhas mais saudáveis, para dar resposta ao envelhecimento da população e às descobertas científicas que vinculam a doença a uma determinada dieta, além da vida nas grandes cidades (GRANATO *et al.*, 2010; ITAL, 2010).

O site da Portugal Foods (<http://www.portugalfoods.org>) descreve que o público que mais consome alimentos funcionais, em Portugal, são as donas de casa com mais de 50 anos, representando 47% das vendas. O site descreve ainda que novos produtos são lançados constantemente, e que há uma tendência para que isso se mantenha por mais alguns anos (Portugal Foods, [s.d.]) Da mesma maneira o Brasil Food Trends também prevê que, pelo menos até 2020, esse mercado continue a crescer (ITAL, 2010).

Os alimentos funcionais constituem uma das mais interessantes áreas de investigação e inovação, tendo-se verificado, desde 2000, o aparecimento de um

número de patentes crescente neste setor (BIGLIARDI & GALATI, 2013; PIRES *et al.*, 2015).

2.2. Incorporação de bioativos naturais

A utilização de alimentos com fins terapêuticos e medicinais é uma prática já muito antiga. No entanto, as grandes guerras e a preocupação do homem com a falta de alimentos incentivaram a produção em larga escala de compostos sintéticos para serem utilizados pelas indústrias alimentares. Nos últimos anos, com as pesquisas associando certas doenças com uma determinada dieta, e estando estas, muitas vezes relacionadas com compostos sintéticos, surge a necessidade da sua redução desses, e concomitantemente, o aumento da utilização dos compostos naturais.

2.2.1. Incorporação de compostos naturais versus compostos sintéticos

Nos últimos anos surgiu uma preocupação cada vez maior sobre a utilização de compostos sintéticos em alimentos, na sequência de alguns estudos publicados em revistas científicas que abordam alguns problemas de toxicidade associados a esses compostos (CAROCHO *et al.*, 2014). Desta maneira, os aditivos alimentares naturais vêm conquistando cada vez mais o interesse dos consumidores e dos fabricantes, por desempenharem as mesmas ações dos compostos de origem sintética e ainda poderem trazer benefícios para a saúde (CAROCHO *et al.*, 2015; OCHOA & AYALA, 2004).

Assim, têm surgido alimentos incorporados com substâncias naturais que lhes conferem propriedades bioativas e/ou efeitos nutracêuticos (CAROCHO *et al.*, 2014). Têm também sido realizados vários estudos em compostos antioxidantes naturais com possíveis aplicações na indústria alimentar (GARCIA *et al.*, 2012). Tal como os antioxidantes, existe também uma tendência na substituição dos corantes sintéticos pelos corantes de origem natural (OCHOA & AYALA, 2004). Além destes, outros casos de alimentos com substâncias bioativas incorporadas estão descritos na secção 2.2.3.

2.2.2. Desafio para a sua obtenção, comercialização e utilização

Apesar do interesse na utilização de compostos naturais por serem potencialmente mais benéficos para a saúde, relativamente aos compostos sintéticos, ainda existe um impasse significativo na sua utilização. Isto ocorre principalmente devido à dificuldade de obtenção destes compostos. De uma forma geral, os compostos bioativos com potencial aplicação em alimentos são obtidos por técnicas de extração sólido-líquido onde parâmetros como, tipo e concentração de solvente, temperatura, tempo de contato são muitas vezes modificados, conduzindo a extratos com diferentes concentrações dos compostos de interesse (GIL-CHÁVEZ *et al.*, 2013; MENESES *et al.*, 2013). Desta maneira, a otimização da metodologia de extração torna-se importante dado que influencia a composição química específica do extrato obtido, que sofre diferentes interações dependendo das condições aplicadas no processo (ANDREO & JORGE, 2006).

Neste contexto, nos últimos anos, têm sido desenvolvidas várias metodologias visando diminuir o tempo de processo, reduzir/eliminar o uso de solventes orgânicos, e aumentar a eficiência da extração, de forma a reduzir os custos associados à obtenção de compostos bioativos e, simultaneamente, diminuir o impacto ambiental (HUANG *et al.*, 2013). Assim, técnicas emergentes como extração assistida por ultrassons e por micro-ondas estão cada vez mais a ser utilizadas, pois diminuem o tempo de processamento e a quantidade de solventes orgânicos utilizados (HELENO *et al.*, 2015a).

A utilização dos compostos bioativos em alimentos, na sua forma livre é dependente de alguns fatores nomeadamente, o processamento, a biodisponibilidade e as características organolépticas (DIAS *et al.*, 2015). Algumas das substâncias ativas após serem extraídas apresentam uma vida útil limitada, devido à exposição a luz, oxigénio e humidade. No entanto, a sua vida útil pode ser aumentada com a utilização de tecnologias de micro- e nanoencapsulação que protegem a substância do ambiente externo. Assim, a microencapsulação pode ser uma alternativa para a proteção dessas substâncias (RIBEIRO *et al.*, 2015; SERVAT *et al.*, 2010).

2.2.3. Casos de sucesso de alimentos funcionais com bioativos naturais

Dentre as substâncias bioativas uma das mais destacadas são as substâncias antioxidantes. Estas substâncias podem ser extraídas de frutas, sementes, vegetais e cogumelos (OLIVEIRA *et al.*, 2009). As plantas são uma fonte natural de compostos bioativos eficazes, que podem ter ação anti-inflamatória, digestiva, antinecrótica, neuroprotetora e hepatoprotetora (LOŽIENĚ *et al.*, 2007). Além das plantas, os cogumelos também são ricos em compostos bioativos podendo apresentar diferentes bioatividades nomeadamente, atividade antioxidante, anticancerígena e antimicrobiana (HELENO *et al.*, 2015a). São apreciados em todo o mundo não apenas pelo seu aroma e textura, mas principalmente pelas suas propriedades medicinais e nutricionais (FERREIRA *et al.*, 2009; HELENO *et al.*, 2015b; KALAČ, 2009). O tema dos micoesteróis, dado a sua importância para o trabalho aqui apresentado, será alvo de discussão numa secção em separado.

No que diz respeito à utilização de substâncias ativas e incorporação em alimentos existem diversos casos descritos na literatura, alguns dos quais já utilizam técnicas de microencapsulação. A Tabela 3 apresenta alguns exemplos em que foram utilizadas substâncias bioativas para incorporação em alimentos.

2.3. Os micoesteróis como bioativos

2.3.1. Aspectos químicos e fontes de micoesteróis

Os esteróis apresentam uma estrutura de 4 anéis tetracíclicos ligados entre si, sendo três deles o ciclo-hexano e o outro um ciclopentano; podem ainda possuir na sua maioria grupos metilo nos carbonos C₁₀ e C₁₃, podendo também estar presente uma cadeia alquilo no carbono C₁₇ (BARREIRA & FERREIRA, 2015; NELSON & COX, 2002). Estas moléculas podem ser obtidas de diferentes matrizes; designam-se por fitoesteróis, zooesteróis e micoesteróis quando obtidas a partir de plantas, animais e fungos/leveduras, respetivamente (BARREIRA & FERREIRA, 2015).

Entre os micoesteróis, o ergosterol (5,7,22-ergostatrien-3 β -ol; Figura 1) que se encontra nas membranas de várias espécies fúngicas é descrito como o principal esterol (TEICHMANN *et al.*, 2007). Além do ergosterol, os compostos fungisterol, ergosta-5,7-dienol, 24-metilcolesterol e metilenocolesterol foram também

identificados em fungos (MATTILA *et al.*, 2002). A Tabela 4 apresenta a composição em ergosterol de alguns cogumelos comestíveis.

Tabela 3. Exemplos de alimentos em que foram incorporadas substâncias bioativas. Livres (L) ou Microencapsuladas (M).

ALIMENTO	COMPOSTO	REFERÊNCIA
Biscoitos	Resveratrol (L)	(GUAMÁN-BALCÁZAR <i>et al.</i> , 2016)
	Extrato fenólico de <i>Rubus ulmifolius</i> Schoot (L) e (M)	(MARTINS <i>et al.</i> , 2014)
logurte	<i>Lactobacillus gasseri</i> e <i>Bifidobacterium longum</i> (L)	(NISHIHIRA <i>et al.</i> , 2014)
Bolo	Inulina e Povidextrose (L)	(MOTA <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Lactobacillus casei</i> (M)	(LIMA <i>et al.</i> , 2014)
Queijo	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (M)	(MIRZAEI <i>et al.</i> , 2012)
	Extrato fenólico de <i>Agaricus blazei</i> (L)	(SILVA <i>et al.</i> , 2009)
Óleo de soja	Extrato fenólico de semente de limão (<i>Citrus Limon</i>) (L)	(LUZIA & JORGE, 2009)
Sorvete	<i>Lactobacillus casei</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i> (M)	(HOMAYOUNI <i>et al.</i> , 2008)

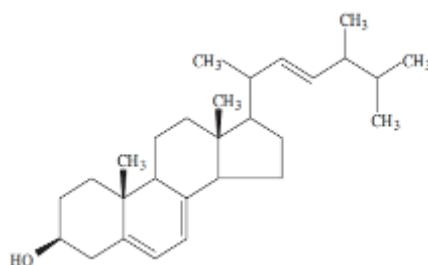


Figura 1. Estrutura molecular do ergosterol.

Uma das espécies de cogumelos comestíveis mais populares e mais amplamente consumidas no mundo é o *Agaricus bisporus* L., com uma produção de 4 milhões de toneladas em 2009 (LEIVA *et al.*, 2015), e cujo consumo ocorre principalmente na América do Norte e na Europa ocidental (BARMON *et al.*, 2012). Esta produção e consumo elevados podem ser explicados não somente pelo seu sabor agradável, mas também pelos diversos estudos que lhes atribuem propriedades terapêuticas como capacidade antioxidante (ELMASTAS *et al.*, 2007; LIU *et al.*, 2013; ÖZTÜRK *et al.*, 2011), antimicrobiana (BARROS *et al.*, 2008; ÖZTÜRK *et al.*, 2011), anti-

inflamatória (RUTHES *et al.*, 2013) e antitumoral (AHMAD *et al.*, 2013). *A. bisporus* contém diversas substâncias bioativas (AHMAD *et al.*, 2013), entre as quais se pode citar o ergosterol, um micoesterol que representa aproximadamente 90% da fração de esteróis desse cogumelo (BARREIRA *et al.*, 2014).

Sendo o mais importante dos micoesteróis, o ergosterol pode ser encontrado nos cogumelos em duas formas principais: livre e esterificada. A concentração de ambas as formas depende da espécie de cogumelo e, na mesma espécie, a sua quantidade pode variar com a maturidade e com a parte do tecido selecionada (SIO *et al.*, 2000; YUAN *et al.*, 2007).

Tabela 4. Concentrações de ergosterol (mg/100 g ms) em espécies de cogumelos comestíveis (BARREIRA *et al.*, 2014).

ESPÉCIES	ERGOSTEROL (mg/100 g ms)
<i>Agaricus bisporus</i>	352±1
<i>Agaricus bisporus Portobello</i>	77±1
<i>Amanita caesarea</i>	231±1
<i>Boletus edulis</i>	234±2
<i>Cantharellus cibarius</i>	129±1
<i>Fistulina hepatica</i>	108±1
<i>Flammulina velutipes</i>	189±2
<i>Lactarius deliciosus</i>	55±1
<i>Lentinus edodes</i>	217±2
<i>Macrolepiota procera</i>	118±2
<i>Pleurotus eryngii</i>	187±1
<i>Pleurotus ostreatus</i>	104±1

2.3.2. Propriedades bioativas do ergosterol

Estudos recentes indicam que o ergosterol e os produtos da sua peroxidação apresentam propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antitumorais (BARREIRA & FERREIRA, 2015; SHAO *et al.*, 2010; VILLARES *et al.*, 2012). A atividade antitumoral desta molécula pode ser devida à sua capacidade de inibição da angiogénese induzida por tumores sólidos (KANG *et al.*, 2015; TAKAKU *et al.*, 2001).

Na presença de luz ultravioleta, o ergosterol é convertido em ergocalciferol (vitamina D₂) que é a mais importante das pró-vitaminas, reconhecida pelo seu papel na regulação dos níveis de cálcio e fósforo (SHAO *et al.*, 2010).

2.3.3. Potencial de utilização em bebidas funcionais por comparação com fitoesteróis

Até abril de 2014 existiam dois alimentos funcionais no mercado, aprovados pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA), com a alegação de saúde “capaz de reduzir os níveis de colesterol” apresentando um deles fitoesteróis na sua composição (GIL-RAMÍREZ *et al.*, 2014).

O consumo de alimentos ricos em fitoesteróis pode auxiliar na redução do colesterol; o consumo de 2 g por dia pode resultar numa redução de até 9% do colesterol (ALEMANY-COSTA *et al.*, 2012).

Os fitoesteróis são conhecidos por reduzir a absorção do colesterol; para além destes, o ergosterol pode atuar reduzindo a absorção do colesterol por incorporação em micelas formadas durante a digestão intestinal (GIL-RAMIREZ *et al.*, 2011). O ergosterol é absorvido no trato digestivo, acumulando-se nas glândulas suprarrenais e noutros órgãos, podendo ser metabolizado *in vivo* para gerar novos produtos bioativos, tais como, o 17 α , 24-di-hidroxi-ergosterol, que mostrou capacidade de inibir a proliferação de células da pele, queratinócitos humanos e de linhas celulares de melanoma (SLOMINSKI *et al.*, 2005).

Num estudo realizado por Gil-Ramírez *et al.* (2014), concluiu-se que o ergosterol assim como os extratos obtidos de *A. bisporus*, podem ser utilizados como ingredientes em alimentos destinados a pessoas que sofrem de colesterol alto, e que o seu mecanismo de ação é similar ao dos fitoesteróis.

A utilização de ergosterol em iogurte, por exemplo, pode ser uma boa alternativa para as empresas uma vez que o ergosterol é o esterol encontrado em maior concentração nos cogumelos (TEICHMANN *et al.*, 2007). O cogumelo que tem este composto em maior quantidade é o *A. bisporus*, uma das espécies comestíveis mais populares e mais amplamente consumidas (BARREIRA *et al.* 2014; LEIVA *et al.*, 2015).

2.4. Estratégias e metodologias para viabilizar o uso de bioativos naturais no setor alimentar

2.4.1. Microencapsulação e liberação controlada

Desenvolvida há cerca de 60 anos, a técnica de microencapsulação pode ser definida como um processo através do qual uma dada substância, no estado sólido, líquido ou gasoso, é protegida por um material secundário (matriz, revestimento, parede ou agente encapsulante) permitindo a liberação do seu conteúdo a taxas controladas e sob condições específicas (CORREDIG, 2009; FANG & BHANDARI, 2010; GAONKAR *et al.*, 2014; KWAK, 2014). Essa tecnologia é utilizada essencialmente por três grandes motivos: (i) proteger o ingrediente em si, (ii) melhorar o produto acabado ou (iii) facilitar um processo de produtivo (FIB, 2013).

A utilização da microencapsulação na indústria de alimentos é relativamente recente, sendo que o seu primeiro uso nas indústrias deste género foi motivada pela necessidade de mascarar aromas/odores indesejáveis e conseguir uma liberação controlada de substâncias alvo (CORREDIG, 2009; FIB, 2013). No entanto esta é uma tecnologia que se está expandindo de forma muito rápida, oferecendo vários benefícios na sua aplicação à indústria alimentar, como por exemplo, proporcionar o aumento da estabilidade de óleos, flavorizantes e vitaminas (GOUIN, 2004; KWAK, 2014).

Os compostos bioativos estão sendo cada vez mais utilizados para a produção de alimentos dado os efeitos benéficos que esses apresentam para a saúde, porém sua aplicação direta nos alimentos apresenta ainda problemas principalmente devido à sua elevada instabilidade (HOLKEM *et al.*, 2015). Uma alternativa para a sua viabilização consiste na encapsulação que permite proteger os compostos contra o ambiente envolvente e a degradação química, além de aumentar a estabilidade e a biodisponibilidade do composto por períodos mais longos (DIAS *et al.*, 2015; HOLKEM *et al.*, 2015). Assim, a microencapsulação está sendo cada vez mais utilizada na indústria de alimentos não só para proteger, mas também para controlar a liberação de certos ingredientes funcionais, nomeadamente bioativos (CORREDIG, 2009).

Do processo de microencapsulação resultam diferentes morfologias de micropartículas, sendo no entanto definidas duas formas mais comuns: as microcápsulas e as microesferas (Figura 2) (GAONKAR *et al.*, 2014). As chamadas microcápsulas apresentam um núcleo interno contendo o agente ativo que está recoberto por uma camada de um material, normalmente polimérico, de espessura variável. Em síntese, estas micropartículas apresentam uma morfologia do núcleo e da parede bem definidas (FIB, 2013; GAONKAR *et al.*, 2014). Já as microesferas são constituídas por uma matriz polimérica, onde a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular (FIB, 2013). Esta matriz poderá, em alguns casos, ser recoberta por uma membrana protetora.

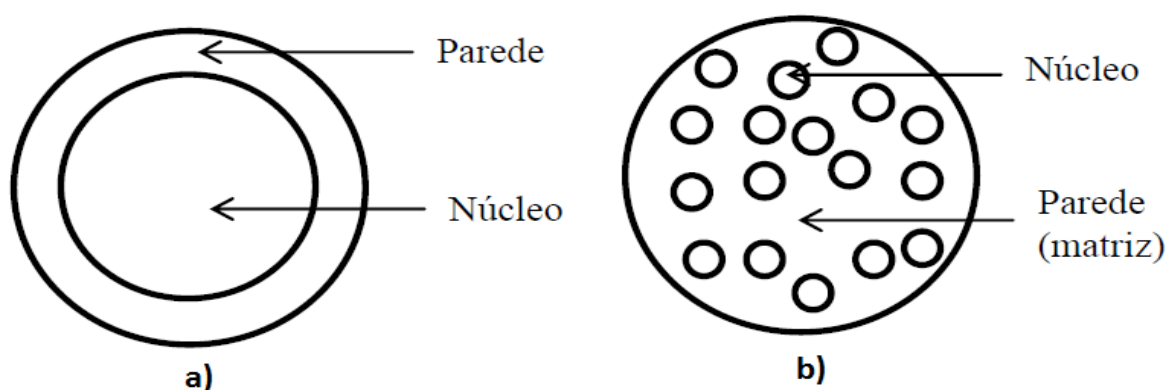


Figura 2. Principais estruturas que são formadas na microencapsulação. a) Estrutura de uma microcápsula; b) estrutura de uma microesfera. Adaptado de Lembo & Cavalli, (2010).

Na microencapsulação, a seleção dos materiais utilizados para proteger o composto ativo é muito importante dado que este formará a barreira que irá “defender” o composto ativo dos efeitos decorrentes da presença de oxigênio, pressão, calor, luz e água (BANSODE *et al.*, 2010; GAONKAR *et al.*, 2014). Assim, a escolha do material adequado para a microencapsulação do ingrediente alimentar deverá considerar as propriedades físicas e químicas do composto ativo (MADENE *et al.*, 2006; MAHDAVI *et al.*, 2016), sendo também essencial que os materiais selecionados tenham excelentes propriedades de barreira e boa capacidade de formação de filme (GAONKAR *et al.*, 2014).

Adicionalmente, quando se trata de aplicações na área alimentar, os materiais encapsulantes selecionados devem ser seguros para o consumo humano, e desta

forma integrar a lista dos compostos geralmente reconhecido como seguros (GRAS) (GAONKAR *et al.*, 2014; NEDOVIC *et al.*, 2011).

Existem diferentes tipos de materiais que podem ser utilizados na microencapsulação de compostos para aplicação alimentar, entre estes podemos citar polissacarídeos como amido, maltodextrina, celulose, alginato, gomas e pectinas, proteínas como gelatina, caseína e soro de leite e diversos lípidos (MAHDAVI *et al.*, 2016; MUNIN & EDWARDS-LÉVY, 2011).

2.4.2. Técnicas de microencapsulação

Após a escolha do material de parede a etapa seguinte consiste na definição da técnica de produção das micropartículas. De acordo com Villena *et al.*, (2009) os métodos para a produção de microcápsulas podem ser divididos em físicos, químicos ou físico-químicos, já para Gaonkar *et al.*, (2014) os métodos só se dividem em físicos e químicos. Adicionalmente, os processos de microencapsulação podem ser classificados de acordo com o mecanismo de formação, o método de consolidação e, muitas vezes, com o equipamento utilizado (DIAS *et al.*, 2015). De facto, a existência de uma enorme variedade de métodos de microencapsulação, e o contínuo desenvolvimento de novas técnicas, dificulta a existência de uma classificação universalmente aceite.

A escolha do método mais adequado depende do tipo de material a encapsular, da aplicação final e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação (FIB, 2013). De entre as várias possibilidades existentes, as técnicas mais comumente utilizadas consistem na coacervação e no *spray drying* (FIB, 2013; KWAK, 2014).

Seguidamente faz-se uma descrição sucinta das técnicas mais usadas para microencapsulação:

Spray drying: é uma técnica onde a substância ativa é solubilizada ou emulsionada numa solução contendo o agente encapsulante. Esta solução/emulsão é atomizada para uma câmara de secagem, onde se dá a evaporação da água permitindo que as partículas se formem. Esta é uma técnica de baixo custo, sendo uma das mais usadas na indústria farmacêutica e alimentar, pois além de ser económica fornece

microesferas de boa qualidade e apresenta-se como um processo muito versátil (DIAS *et al.*, 2015; KWAK, 2014).

Coacervação: Depois do *spray drying* esta é a técnica mais utilizada. Consiste na deposição do polímero sobre o agente ativo a ser protegido mediante alterações das características físico-químicas do meio, tais como a temperatura, a força iônica, o pH ou a polaridade. Este método pode ser dividido em coacervação simples e complexa, sendo que a coacervação complexa consiste basicamente na combinação de duas soluções de hidrocolóides de cargas opostas ocorrendo a interação e precipitação do complexo formado (FIB, 2013; SHOJI *et al.*, 2013).

Co-cristalização: Nesse processo a estrutura cristalina da sacarose é modificada passando de cristais perfeitos para aglomerados destes. Este processo ocorre de forma espontânea a temperaturas de 120°C e em condições de humidade baixa. A estrutura formada possui uma configuração porosa sendo o princípio ativo distribuído pelos espaços vazios formados. Este processo apresenta como vantagens a melhoria da solubilidade e estabilidade dos materiais encapsulados (ASTOLFI-FILHO *et al.*, 2005; FANG & BHANDARI, 2010).

Inclusão molecular: Neste tipo de técnica de microencapsulação usam-se geralmente as ciclodextrinas como material encapsulante (CDs). As ciclodextrinas são muito adequadas para microencapsulação de substâncias hidrofóbicas, pois apresentam um centro hidrofóbico e um exterior hidrofílico sendo portanto solúveis em água e capazes de reter no seu centro hidrofóbico moléculas com a mesma natureza (FANG & BHANDARI, 2010; MATIOLI & RODRIGUEZ-AMAYA, 2003).

Lipossomas: Os lipossomas são partículas microscópicas compostas por uma bicamada lipídica que engloba um volume aquoso no seu interior, isto é, de natureza idêntica ao meio em que estão dispersas. Estes são formados por moléculas que possuem sítios hidrofóbicos e hidrofílicos. Este tipo de sistema destaca-se pela sua capacidade de encapsular materiais hidrofóbicos, hidrofílicos e anfifílicos, e também pelas suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, sendo constituídos por fosfolípidos, comumente presentes nas membranas celulares (MORAIS *et al.*, 2003; VILLENA *et al.*, 2009). Além disso, esta técnica apresenta alta

eficiência de encapsulação, alta estabilidade sendo de fácil produção (DIAS *et al.*, 2015).

Técnicas baseadas na formação de emulsões: a formação de emulsões consiste num método alternativo para a formação de gotículas num sistema líquido de duas fases. Esta tecnologia pode ser utilizada para a encapsulação de agentes bioativos em soluções aquosas que poderão ser aplicadas posteriormente na forma líquida ou ser sujeitas a um processo de secagem, tipo *spray drying* (FANG & BHANDARI, 2010; GAONKAR *et al.*, 2014; SILVA-BUZANELLO *et al.*, 2015). A preparação de uma emulsão é uma etapa que pode anteceder vários processos de microencapsulação. Desta maneira, os processos que envolvem a formação de emulsões são comumente usados na encapsulação para aplicação em alimentos (DIAS *et al.*, 2015).

Além das técnicas apresentadas anteriormente estão a surgir continuamente inovações decorrentes da necessidade de utilização de novos materiais encapsulantes e da necessidade de proteger novos princípios ativos. Estes podem requerer processos específicos para sua microencapsulação (FIB, 2013).

2.4.3. Técnicas de caracterização

Após realizado o processo de microencapsulação é necessário analisar as micropartículas formadas. As caracterizações comumente utilizadas são as seguintes: determinação do tamanho da partícula, distribuição do tamanho da partícula, potencial zeta, análise da morfologia, fluidez, eficiência de encapsulação e estabilidade (KWAK, 2014).

O tamanho da partícula, bem como a sua distribuição são parâmetros importantes a aferir no processo de microencapsulação de compostos ativos uma vez que, dependendo do tamanho da partícula, é possível obter perfis de libertação diferentes, afetar a atividade do composto, bem como interferir na viscosidade do alimento onde as partículas são incorporadas (KWAK, 2014; PRISCO & MAURIELLO, 2016).

A distribuição do tamanho de partículas expressa a frequência com que cada tamanho ocorre. É normalmente medida em número ou volume (OLSON, 2011).

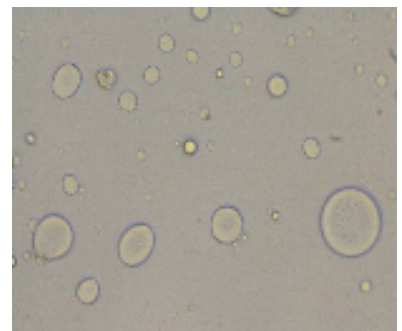
O potencial zeta é definido como o potencial eletrostático entre duas camadas existentes, a compacta com cargas fortemente ligadas à superfície da partícula e a difusa, pouco compacta associada a iões (KWAK, 2014). Este parâmetro dá uma ideia da estabilidade das partículas em suspensão (KIRBY & HASSELBRINK, 2004), de maneira que um potencial zeta superior a 30mV e inferior a -30mV é, em geral, associado a dispersões estáveis (AZEVEDO *et al.*, 2014). Este é um fator chave para a preparação ou desestabilização de dispersões coloidais (KWAK, 2014).

A morfologia da partícula é verificada através de métodos de microscopia, como por exemplo a microscopia electrónica de varrimento (MEV) e microscopia ótica (MO). Esta análise é importante para aferir as propriedades globais dos sistemas coloidais, nomeadamente a forma das partículas, por exemplo formato esférico, de disco, de haste ou de bobina (KWAK, 2014). Adicionalmente, a MO é um método simples que pode ser muito útil na monitorização do processo de microencapsulação. Outra técnica, complementar a estas, é a microscopia de força atómica (MFA) que nos permite fazer uma análise morfológica e topográfica à escala nano.

A eficiência de encapsulação é uma medida da percentagem de composto que foi encapsulado sendo dada pela razão entre a quantidade de composto efetivamente encapsulado relativamente ao valor teórico (este calculado com base na formulação usada) multiplicado por 100.

Neste trabalho foi utilizado uma técnica de coacervação para a microencapsulação sendo que foram utilizados como materiais de encapsulantes a proteína do soro de leite e o quitosano. Para a caracterização foram utilizados a microscopia ótica para verificação da morfologia das cápsulas tendo-se quantificado ainda os valores do rendimento de encapsulação, eficiência de encapsulação e carga em ergosterol.

3. MATERIAL E MÉTODOS



3.1. Amostras de *Agaricus bisporus*

As amostras de *Agaricus bisporus* L. foram cedidas por uma empresa de produção de cogumelos locais "Mogarius Cogumelos - Sociedade Unipessoal Ltda". Correspondiam a exemplares com características visuais menos apelativas constituindo bioresíduos para a empresa. As amostras foram pesadas, congeladas, liofilizadas (liofilizador Freezezone 4.5 modelo 7.750.031, Labconco, Kansas City, MO, EUA) e reduzidas a pó (20 mesh).

3.2. Padrões e reagentes

O metanol e o acetonitrilo utilizados são da Fisher Scientific (Lisboa, Portugal) e possuem grau de pureza HPLC. Os padrões de esteróis (ergosterol e colecalciferol) foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA).

O 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) foi obtido a partir de Alfa Aesar (Ward Hill, EUA).

O trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), o lipopolissacárido (LPS), a dexametasona, a sulforrodamina B (SRB), o azul de tripano, o ácido tricloroacético, o Trisaminometano (Tris) e a elipticina foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Saint. Louis, MO, EUA). O meio RPMI-1640 foi adquirido na HyClone (Logan, EUA).

O meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), a solução salina equilibrada de Hank (HBSS), o soro fetal bovino (FBS), a L-glutamina, a tripsina-EDTA e a solução de penicilina/estreptomicina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente) foram obtidos na Gibco Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, Califórnia, EUA).

O Kit Griess Reagent System foi obtido na Promega (Madison, WI, EUA).

A proteína isolada do soro de leite (*Whey protein isolate* - WPI) foi cedida da Glanbia Nutritionals (Kilkenny, Irlanda) tendo um grau de pureza em base seca >92% sendo comercialmente vendida com a denominação Provon 295. O quitosano de baixa massa molecular, com nome comercial Chitosan 90/200/A1, com um grau de desacetilação de 93,1% foi adquirido na empresa BioLog-Heppe (Landsberg, Alemanha).

A água foi tratada com um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Sistemas de água pura, Greenville, SC, EUA). Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram adquiridos a fornecedores Portugueses.

3.3. Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos por extração assistida com ultrassons num equipamento da QSonica modelo CI-334 (Newtown, CT, EUA). Este equipamento contém uma fonte de ultrassons capaz de operar na gama entre 100 e 500 W de potência a uma frequência de 20 kHz e está equipado com um temporizador digital. As extrações foram realizadas de acordo com o procedimento otimizado por Heleno *et al.* (2015a). Em cada extração, pesou-se aproximadamente 3 g de amostra, que foi diluída com 100 mL de etanol. As condições utilizadas foram 375 W e 15 min para a potencia e tempo, respetivamente. Antes da extração adicionou-se um volume adequado de colecalciferol (padrão interno).

Decorridos os 15 minutos de extração, os extratos foram filtrados com a utilização de filtros Whatman nº4 e, em seguida, evaporou-se o solvente sob pressão reduzida. Os resíduos obtidos (designados no trabalho por extratos de *Agaricus bisporus* com ergosterol) foram utilizados para: quantificação do ergosterol, avaliação da bioatividade, incorporação em iogurtes e estudos de microencapsulação.

3.4. Quantificação de ergosterol

Para quantificação do ergosterol por HPLC-UV (cromatografia líquida de alta eficiência com detecção UV), o extrato foi redissolvido em metanol de forma a obter uma concentração de 10 mg/mL e filtrado com um filtro de nylon de 0,2 µm, seguindo o procedimento descrito por Barreira *et al.* (2014). Utilizou-se um cromatógrafo constituído por um sistema integrado composto por uma bomba (Knauer, sistema Smartiline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartiline manager 5000) e um injetor automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD, EUA), acoplado a um detector de UV (Knauer Smartline 2500). A separação cromatográfica foi obtida 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), a um fluxo de 1 mL/min, e

o volume de injeção foi de 20 µL. A detecção foi realizada a 280 nm. Quantificou-se o ergosterol por comparação da área do pico com a sua curva de calibração obtida a partir de um padrão comercial. A quantificação foi realizada usando o método do padrão interno, neste caso o colecalciferol. Os dados foram analisados usando o Software Clarity 2.4 (DataApex).

3.5. Avaliação de propriedades bioativas

3.5.1. Atividade captadora de radicais DPPH

Para análise da atividade captadora de DPPH, o extrato foi redissolvido em metanol de forma a obter uma concentração de 50 mg/mL e submetido a diluições sucessivas numa gama de concentrações de 0,39 mg/mL até 50 mg/mL. Utilizou-se um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e, colocou-se nos poços da microplaca as diferentes soluções da amostra em estudo (30 µL) e uma solução metanólica (270 µL) contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi deixada em repouso durante 30 min no escuro e, seguidamente, realizou-se a leitura da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada utilizando a equação [1]:

$$\%ACR = \left[\frac{A_{DPPH} - A_A}{A_{DPPH}} \right] \times 100 \quad [1]$$

Onde, A_A é a absorvância da solução contendo a amostra em avaliação e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. Os resultados foram posteriormente convertidos em valores de EC_{50} , correspondentes a 50% de ACR, a partir dos gráficos da percentagem de ACR em função da concentração da amostra (Heleno *et al.*, 2009). Utilizou-se trolox como padrão.

3.5.2. Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais humanas

Para análise da atividade citotóxica em linhas celulares tumorais, o extrato foi redissolvido numa mistura dimetilsulfóxido: água (DMSO:água, 50:50, v/v) de forma a obter uma concentração de 8 mg/mL sendo esta submetida a diluições sucessivas numa gama de concentrações de 1,56 µg/mL até 400 µg/mL. Foram utilizadas as seguintes linhas celulares humanas: MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460

(carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) todas obtidas no DSMZ- Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). As células foram mantidas rotineiramente como culturas de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de FBS inativado pelo calor e glutamina a 2 mM (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), a 37°C, numa incubadora de ar humidificado contendo 5% de CO₂.

Para avaliar a citotoxicidade, realizou-se o ensaio de Sulforodamina B (SRB) de acordo com um procedimento previamente descrito (ABREU *et al.*, 2011). Para isso, as linhas celulares foram colocadas em microplacas de 96 poços, com diferentes concentrações da amostra em avaliação, a uma densidade adequada (7,5 x 10³ células/poço para MCF-7 e NCI-H460 e 1,0 x 10⁴ células/poço para HeLa e HepG2) e incubadas durante 48 h. Após o período de incubação, as células aderentes foram fixadas por adição de ácido tricloroacético 10% previamente refrigerado (100 µL) e incubadas durante 60 min a 4°C. Decorrido esse tempo, as microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. Em seguida, adicionou-se SRB (0,1% em ácido acético a 1%, 100 µL) em cada poço da microplaca e incubou-se a 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, removeu-se a SRB não aderida utilizando como solução de lavagem ácido acético a 1% e voltou-se a secar a microplaca. A SRB aderida foi solubilizada com Tris 10 mM (200 µL) e a absorbância foi lida a um comprimento de onda de 540 nm, no leitor de microplacas mencionado na secção 3.5.1. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular). A elipticina foi usada como padrão.

3.5.3. Atividade citotóxica em células não tumorais

Para análise da atividade citotóxica em células não tumorais, utilizaram-se as soluções descritas na secção 3.5.2. Preparou-se uma cultura de células a partir de fígado de porco obtido num matadouro local, que se designou por PLP2 (*porcine liver primary culture*; cultura primária de células de fígado de porco). Os tecidos de fígado foram lavados com uma 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 mm³. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25

cm² 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 com atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂. O meio foi mudado a cada dois dias e o crescimento das células foi acompanhado com um microscópio de contraste de fase. As células foram subcultivadas e plaqueadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de 1,0x10⁴ células/poço.

As células foram tratadas durante 48 h com as diferentes soluções das amostras em avaliação e seguiu-se o ensaio da SRB anteriormente descrito, conforme Abreu *et al.* (2011). Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular na cultura primária PLP2) e utilizou-se elipticina como padrão.

3.6. Incorporação em iogurtes

Os iogurtes líquidos base foram adquiridos num supermercado local na cidade de Bragança – Portugal e eram compostos dos seguintes ingredientes: leite parcialmente desnatado, açúcar, xarope de glicose-frutose, proteínas do leite, lactose, morango (1,4%), amido de milho modificado, aromatizantes, fermentos lácteos, conservante (E202) e corante (E120), com a seguinte declaração nutricional por 100 g: de produto: energia: 72 kcal; lipídios: 1,1 g correspondendo a 0,7 g de ácidos gordos saturados; hidratos de carbono: 13 g correspondentes aos açúcares; proteínas: 2,3 g e; sal: 0,13 g. Os iogurtes comerciais com fitoesteróis eram compostos dos seguintes ingredientes: leite magro, os ésteres de esterois vegetal (3,4%) que corresponde a 2% de esteróis livres de plantas, polpa de morango (2,5%), as proteínas do leite e lactose, amido de milho modificado, aromas, fermentos lácticos, adoçantes (E955, E950), conservante (E202) e corante (E120), com a seguinte declaração nutricional por 100 g: a energia: 41 kcal; lipídios: 1,4 g correspondentes a 0,1 g de ácidos graxos saturados (excluindo 2 g do esteróis de plantas que não contribuem para o valor energético); hidratos de carbono: 4,2 g correspondendo a 4,0 g de açúcares; proteínas: 3,0 g e; sal: 0,13 g. No presente trabalho pretendeu-se obter todos os iogurtes tão semelhantes quanto possível e natural, mas como não há iogurtes naturais incorporados com fitoesteróis, todos os iogurtes de base e os iogurtes com fitoesteróis eram de morango.

Assim os iogurtes com fitoesteróis (2 g de fitoesteróis por 100 g de iogurte) foram utilizados como controlos positivos (ICP). Como controlo negativo (ICN), utilizaram-se iogurtes sem qualquer adição de esteróis. Os ensaios de incorporação dos extratos com ergosterol (ext) ou ergosterol a 98% (erg), bem como dos controlos positivo e negativo anteriormente descritos, foram realizados de acordo com os dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Informação da quantidade de extratos ou ergosterol incorporados nos iogurtes.

ENSAIOS	MASSA			
	ERG o EXT (g erg ou g ext)	IOGURTE (g)	TOTAL (g)	
ICN	logurtes controlo negativo	-	100,000	100,000
ICP	logurtes controlo positivo	-	100,000	100,000
IERG1	logurtes com ergosterol (98%)	0,075 g erg*	99,925	100,000
IERG2	logurtes com ergosterol (98%)	2,000 g de erg**	98,000	100,000
IEXT	logurtes com extrato de <i>A. bisporus</i>	2,000 g de ext	98,000	100,000

*correspondente à quantidade de ergosterol existente em 2 g de extrato de *A. bisporus*.

**correspondente à quantidade de fitoesteróis presente no ICP.

As amostras foram analisadas em dois tempos distintos: T0 que corresponde ao tempo inicial onde, logo após a incorporação, as amostras foram imediatamente congeladas e liofilizadas; e T1 a 7 dias de armazenamento a 4°C, período após o qual as amostras foram congeladas e liofilizadas, para posteriores análises.

3.7. Análise das propriedades químicas, nutricionais e bioativas dos iogurtes

3.7.1. Composição centesimal

As amostras de iogurte foram analisadas quanto ao teor em proteínas, hidratos de carbono, gorduras, humidade e cinzas, seguindo os procedimentos oficiais de análise de alimentos (AOAC, 1995). A proteína foi determinada pelo método macro-Kjeldahl e utilizou-se o fator 6,38 para converter o teor de azoto em proteína total. A gordura foi determinada após extração em Soxhlet com éter de petróleo. As cinzas foram determinadas por incineração a 600±15°C. Os hidratos de carbono totais foram obtidos por diferença. A energia foi calculada a partir da equação [2]:

$$E = 4 \times (p + hc) + 9 \times g \quad [2]$$

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.

3.7.2. Açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados no sistema de HPLC descrito na secção 3.4, mas acoplado a um detector de índice de refração (IR) (Knauer Smartiline 2300). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna Eurospher 100-5 NH₂ (5 µm, de 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, Knauer) operando a 35°C. A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) a um fluxo de 1 mL/min (HELENO *et al.*, 2009). Os açúcares foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos nas amostras com os picos dos padrões. A quantificação baseou-se no sinal do detetor de índice de refração aplicando o método do padrão interno (rafinose). Os dados obtidos foram analisados usando o *software* mencionado na secção 3.4. Os resultados obtidos foram expressos em g por 100 g de iogurte.

3.7.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados na gordura bruta obtida por Soxhlet e após um processo de trans-esterificação, tal como descrito por Heleno *et al.* (2009), utilizando um cromatógrafo gasosos (DANI 1000, Contone, Suíça) equipado com um injetor *split/splitless* e um detector de ionização de chama (GC-FID a 260°C). Utilizou-se uma coluna Macherey-Nagel (Düren, Alemanha) (50% cianopropilmetilo, 50% *fenilmetilpolisiloxano* 30 m x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 mm *df*). O forno teve a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial de 50°C, mantida durante 2 minutos, rampa de 30°C/min até 125°C, rampa de 5°C/min até 160°C, rampa de 20°C/min até 180°C, rampa de 3°C/min até 200°C, rampa de 20°C/min até 220°C e mantida durante 15 min. O fluxo do gás de arraste, hidrogénio, foi 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50°C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250°C. A identificação dos ácidos gordos foi feita por comparação dos tempos de retenção dos picos das amostras com os picos dos padrões (FAME). Os resultados foram gravados e processados usando o *software* CSW 1.7 (DataApex1.7, Praga,

República Checa). Os resultados foram expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.7.4. Propriedades bioativas

Para análise das propriedades bioativas dos iogurtes, estes foram submetidos ao mesmo procedimento de extração assistida por ultrassons aplicado à obtenção dos extratos de *A. bisporus* e descrito na secção 3.3. Para avaliação da atividade antioxidante prepararam-se soluções com metanol:clorofórmio (50:50, v/v) na gama de 3,125 mg/mL até 200 mg/mL de acordo com o protocolo descrito na secção 3.5.1. Para avaliação da atividade citotóxica em células tumorais e não tumorais prepararam-se soluções em DMSO:água (50:50, v/v) na gama de concentrações de 1,56 µg/mL até 400 µg/mL e seguiram-se os protocolos descritos nas secções 3.5.2 e 3.5.3, respetivamente.

3.8. Estudos de microencapsulação do extrato de *A. bisporus* com ergosterol e do ergosterol 98%

A microencapsulação foi realizada tendo por base o trabalho de Kurukji, Norton, & Spyropoulos (2014) com algumas modificações. Realizaram-se testes iniciais para determinar o valor do pH do meio que conduz a um maior rendimento de encapsulação, para definir a melhor razão proteína/quitosano (P/Q), bem como a temperatura de processamento e a quantidade de agente ativo (ergosterol) a ser encapsulado.

3.8.1. Determinação do pH para obtenção de um melhor rendimento de encapsulação

A primeira parte do estudo de microencapsulação consistiu em verificar as melhores condições de pH para obtenção das cápsulas. Para o efeito prepararam-se 2 soluções de quitosano a 1%, em solução tampão de acetato de sódio para os valores de pH de 5,0 e 5,5. Estas ficaram em agitação a 55°C por 24 horas.

Decorridas as 24 horas prepararam-se soluções de isolado proteico de soro em tampões de acetato de sódio (pHs 5,0 e 5,5), tendo-se testado diferentes razões de P/Q (3:1, 5:1, 10:1 e 25:1, m/m). Das soluções proteicas preparadas retiraram-se 5

mL que foram transferidos para tubos de Falcon que continham já 5 mL da solução de quitosano 1% no pH pretendido. Após mistura, os tubos de Falcon foram levados ao vórtex para agitação durante 1 minuto e deixados em repouso durante 24 horas.

Após as 24 horas retirou-se uma amostra para ser analisada ao microscópio ótico. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 5000 rpm durante 5 min, recolhidas e secas para cálculo do rendimento de formação de coacervato.

Repetiu-se o ensaio com as duas melhores razões de P/Q (3:1 e 5:1), para os pHs 5,0 e 5,5, com a introdução do extrato numa proporção de 12,5% em relação a massa de isolado proteico de soro (WPI) utilizada. O extrato utilizado no ensaio foi dissolvido numa solução tampão e levado ao Ultra-Turrax durante 20 minutos para promover a sua dissolução.

3.8.2. Otimização do processo de microencapsulação utilizando a metodologia de superfície de resposta em função da temperatura e da razão P/Q

A partir dos dados obtidos para o melhor rendimento em função do pH realizaram-se diferentes estudos que estão resumidos na Tabela 6, tanto para o extrato como para o ergosterol 98%, alterando a razão P/Q e a temperatura. Foi garantido que a concentração de ergosterol era 108 µg/mL.

Tabela 6. Ensaio de microencapsulação do ergosterol ou extrato em função da temperatura e da razão proteína:quitosano (P/Q).

VALORES CODIFICADOS	VALORES UTILIZADOS NOS ENSAIOS	
	$X_1: T (^{\circ}\text{C})$	$X_2: P/Q$
-2	55	0,5
-1	65	3
0	75	5,5
+1	85	8
+2	95	10,5

A metodologia utilizada nos ensaios de microencapsulação está representada de forma esquemática na Figura 3. Foram seguidos os seguintes passos:

- 1- Dissolveu-se uma massa específica de extrato ou ergosterol em solução tampão acetato de sódio com pH 5,5 de forma a obter as concentrações necessárias para a realização do ensaio;

- 2- A solução preparada foi levada ao Ultra-Turrax durante 20 min;
- 3- Desta solução retiraram-se 7,5 mL que foram transferidos para um gobelé contendo a massa da proteína determinada para a razão P/Q pretendida tendo-se procedido seguidamente à sua agitação até dissolução da proteína com o auxílio de um agitador magnético;
- 4- Posteriormente, adicionaram-se 7,5 mL de solução de quitosano 1%, tendo-se colocado esta solução final num banho termostatizado à temperatura desejada; a solução foi mantida à temperatura em estudo durante 5 min;
- 5- Decorrido esse tempo a solução foi transferida para um tubo de Falcon e colocado num banho de gelo durante 20 min para arrefecimento;
- 6- Seguidamente os tubos foram guardados no frigorífico (4°C);
- 7- Após 24 horas recolheram-se amostras dos diferentes ensaios para análise por microscopia ótica;
- 8- As amostras foram então centrifugadas a 6000 rpm durante 45 min, retirou-se o sobrenadante e fizeram-se 6 lavagens do coacervato obtido utilizando 5 mL de solvente em cada uma (3 foram feitas com a solução tampão e as outras 3 com metanol). Após cada lavagem fez-se a centrifugação a 6000 rpm durante 45 min;
- 9- Os 15 mL obtidos nas 3 lavagens com metanol foram evaporados, para serem então ressuspensos de forma a ter 10 mg de extrato/mL de metanol.
- 10- As amostras foram injetadas no HPLC-UV.
- 11- O ergosterol foi quantificado através das áreas dos picos e dos tempos de retenção com base numa reta de calibração obtida com padrão comercial. Das análises efetuadas verificou-se que não existia ergosterol no tampão utilizada nas primeiras três lavagens. Assim, o método de quantificação do ergosterol não encapsulado baseou-se apenas na análise do metanol utilizado nas lavagens.

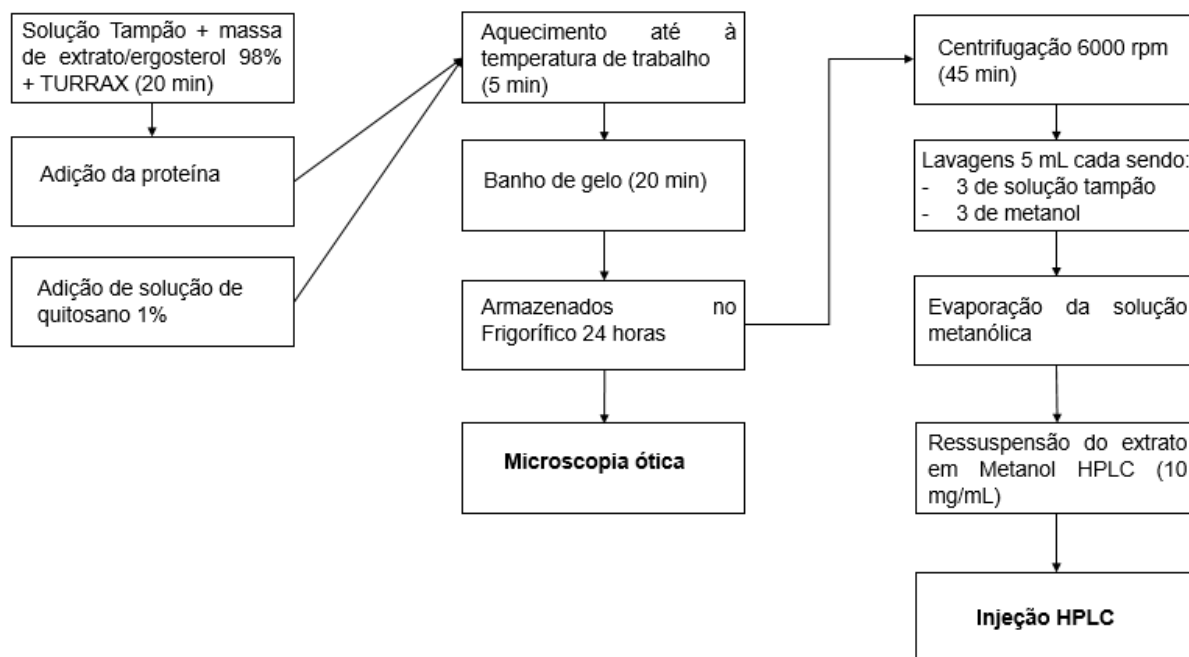


Figura 3. Esquematização do ensaio realizado.

3.8.3. Otimização da quantidade de ergosterol que pode ser microencapsulada

A partir dos resultados obtidos na secção 3.8.2 escolheram-se duas condições para continuar os ensaios:

- Temperatura de 55°C e razão P/Q de 0,5:1, e;
- Temperatura de 95°C e razão P/Q de 10,5:1.

A metodologia utilizada foi a descrita anteriormente, utilizando-se uma gama de concentrações de 45 a 1440 µg de ergosterol/mL para o ergosterol e de 1,25 a 40 mg/mL para o extrato (extrato equivalente a 45 a 1440 µg de ergosterol/mL).

3.8.4. Microscopia ótica

As microesferas foram analisadas através de microscopia ótica (MO) com recurso a um microscópio da marca Nikon equipado com câmara digital para aquisição de dados. Foram adquiridas imagens com a ampliação de 40, 100, e 400X. As cápsulas foram analisadas 24 horas após o término do processo de coacervação.

3.8.5. Rendimento do processo de encapsulação (Y_1)

O rendimento de encapsulação (Y_1) foi determinado a partir da equação [3]:

$$Y_1 = \frac{p_f + q_f + e_f}{p_i + q_i + e_i} \times 100 = \frac{fp}{ip} \times 100 \quad [3]$$

Onde **p** se refere à massa de proteína, **q** à massa de quitosano, **e** à massa de extrato ou ergosterol, conforme o ensaio em causa, **fp** refere-se à massa total no final do processo e **ip** refere-se à massa total no início do processo e os subíndices **i** e **f**, referem-se ao início e ao fim do processo, respetivamente. A massa inicial foi obtida pela soma dos reagentes utilizados no processo de microencapsulação e a massa do final foi obtida por pesagem do coacervato após centrifugação e secagem em estufa a 37°C até massa constante.

3.8.6. Eficiência de Encapsulação (Y_2)

A eficiência de encapsulação (Y_2) foi determinada pela equação [4]:

$$Y_2 = \frac{et - ene}{et} \times 100 \quad [4]$$

Onde **et** é a massa de ergosterol teórica adicionada no processo de encapsulação e **ene** é a massa de ergosterol não encapsulada determinada no fim do processo. De notar que no caso da encapsulação ter sido realizada diretamente com o extrato, a eficiência de encapsulação também foi expressa em termos de ergosterol.

A massa de ergosterol não encapsulada, **ene**, foi obtida por HPLC-UV (ver secção 3.4). O valor de ergosterol foi obtido conforme o item 11 da secção 3.8.2.

3.8.7. Carga em ergosterol (Y_3)

O conceito de carga (*load*) em ergosterol (Y_3) é utilizado para expressar o teor de ergosterol nas microcápsulas produzidas, sendo um parâmetro de grande utilidade para o cálculo da quantidade a incorporar em produtos finais. Este parâmetro foi calculado através da equação [5]:

$$Y_3 = \frac{et - ene}{cf} \times 100 \quad [5]$$

Onde **et** é a massa de ergosterol teórica; **ene** é a massa de ergosterol não encapsulada e **cf** a massa de cápsulas formadas. A massa de ergosterol não encapsulada, **ene**, foi obtida por HPLC-UV conforme descrito na secção 3.8.6.

3.9. Análise Estatística

3.9.1. Incorporação em iogurtes

As incorporações nos iogurtes foram realizadas em duplicado e todas as análises foram realizadas em triplicado. Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou média \pm amplitude. Para uma melhor interpretação dos resultados, foi realizada a análise de variância (ANOVA) com o tipo III soma de quadrados utilizando o *software* SPSS, versão 23.

As variáveis dependentes foram analisadas com base num modelo linear geral multivariado, através de uma ANOVA 2-way ANOVA com 2 variáveis independentes: o Tempo de armazenamento (TA), compreendeu dois tempos, T0 e T1, que se referem a 0 e 7 dias, respetivamente; e o tipo de incorporação (TI), que compreendeu iogurtes controlo (ICN), iogurtes com fitoesteróis (ICP), iogurtes com adição de ergosterol 98% IERG1 e IERG2 e iogurtes com adição do extrato de *A. bisporus* (IEXT).

Quando se detetou uma interação significativa para os dois fatores (TAxTI), indicando que as amostras são influenciadas por ambos os fatores, estes foram avaliados simultaneamente, tendo-se obtido algumas tendências gerais através das Médias Marginais estimadas (MME). Por outro lado, quando não se detetou nenhuma interação estatística, as médias foram comparadas pelo teste *t* de Student (para TA) ou pelo teste de comparação múltipla de Tukey (para TI), com base num teste prévio de Levene para verificar a homogeneidade de variâncias. Todos os testes foram realizados com um nível de significância de 5%.

3.9.2. Estudos de microencapsulação utilizando a Metodologia de Superfície de Resposta

A metodologia de superfície de resposta (MSR) foi utilizada para a construção do modelo e análise dos problemas em que a resposta de interesse é influenciada por

diversas variáveis. Desta forma, testaram-se os efeitos combinados de T e P/Q na formação de microcápsulas com a utilização do planeamento composto central (PCC), com três repetições para cada condição. A estrutura do PCC implica 5 valores de combinações para cada fator. Foram escolhidos ensaios experimentais aleatoriamente de maneira a minimizar os efeitos da variabilidade nas respostas observadas. As condições das variáveis independentes estudadas estão indicadas na Tabela 6, onde se indica também a codificação das variáveis e as condições experimentais utilizadas.

O modelo de superfície de resposta foi construído por meio do cálculo de mínimos quadrados utilizando a seguinte equação do desenho de Box-Behnken:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{\substack{j=2 \\ j>i}}^n b_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^n b_{ii} X_i^2 \quad [6]$$

onde **Y** é a variável dependente (variável de resposta), **X_i** e **X_j** definem as variáveis independentes, **b₀** é um coeficiente constante, **b_i** é o coeficiente de efeito linear, **b_{ij}** é o coeficiente do efeito interativo entre as variáveis, **b_{ii}** o coeficiente de efeito quadrático e **n** o número de variáveis.

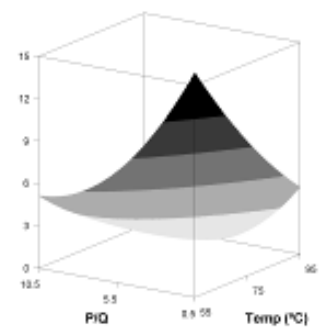
Todos os procedimentos de estimativas dos coeficientes e cálculos estatísticos foram realizados usando Microsoft Excel. A análise estatística dos resultados experimentais obtidos com as equações propostas foram realizadas em quatro fases:

- Coeficientes de determinação: as estimativas paramétricas foram obtidas pela minimização da soma das diferenças quadráticas entre os valores observados e os valores previstos pelo modelo, utilizando o método dos mínimos quadrados (quasi-Newton) que está disponível no Microsoft Excel na macro Solver (KEMMER & KELLER, 2010), permitindo um teste rápido de hipóteses e suas consequências (MURADO & PRIETO, 2013).
- Coeficientes de significância: a determinação dos intervalos de confiança paramétricos foi realizado usando o 'SolverAid' (PRIKLER, 2009). O modelo

foi simplificado, removendo os termos que não foram estatisticamente significativos para um *p*-valor ($p > 0,05$).

- Consistência do modelo: Foi utilizado o teste F de Fisher ($\alpha = 0,05$) para determinar se os modelos construídos foram adequados para descrever os dados observados (SHI & TSAI, 2002).
- Outros critérios de avaliação estatística: Para voltar a verificar a uniformidade do modelo foram aplicados os seguintes critérios: a) A macro 'SolverStat' foi utilizada para a avaliação dos parâmetros e para prever incertezas do modelo (COMUZZI, *et al.*, 2003); b) R^2 , interpretado como a percentagem de variabilidade da variável dependente explicada pelo modelo; c) Coeficiente de determinação múltipla ajustado (R^2_{adj}), que é uma correção efetuada a R^2 , que leva em conta o número de variáveis utilizadas no modelo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO



4.1. Propriedades bioativas do extrato de *A. bisporus* e monitorização da quantidade de ergosterol

Dos resultados obtidos, verificou-se que a quantidade de ergosterol no extrato de *A. bisporus* foi de $36,72 \pm 0.01$ mg/g de extrato.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos referentes às propriedades bioativas avaliadas para o extrato de *A. bisporus* (ext) e para o ergosterol (erg).

Os valores obtidos para a atividade antioxidante estão expressos em EC_{50} , que representa a concentração necessária para ocorrer 50% de atividade captadora de radicais livres de DPPH. Os valores obtidos demonstram que o extrato de *A. bisporus* apresenta uma atividade antioxidante inferior (i.e., valor superior de EC_{50} , 3,99 mg extrato/mL) à obtida para o ergosterol (0,46 mg/mL), que é descrito por Shao *et al.*, (2010) como sendo a principal molécula presente nos extratos de cogumelos que contribui para a sua atividade antioxidante.

Tabela 7. Propriedades bioativas do extrato de *A. Bisporus* (ext) e do ergosterol (erg).

Amostra	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	ATIVIDADE CITOTÓXICA				
	EC_{50} (mg/mL)	GI_{50} (μ g/mL)				
		Linhas celulares humanas tumorais				Células não tumorais
	Ativ.captadora de DPPH	MCF-7	NCI-H460	HeLa	HepG2	PLP2
ext	$3,99 \pm 0.04$	84 ± 5	123 ± 9	$97,0 \pm 0.4$	95 ± 2	>400
erg	$0,46 \pm 0.01$	30 ± 2	49 ± 4	38 ± 2	34 ± 3	$89,54 \pm 3,29$

Os resultados são expressos como média \pm desvio padrão.

A Tabela 7 também reúne os resultados da atividade citotóxica que foi analisada para quatro linhas celulares tumorais humanas após 48 horas de exposição contínua: adenocarcinoma da mama (MCF-7), adenocarcinoma de pulmão (NCI-H460), carcinoma cervical (HeLa) e carcinoma hepatocelular (HepG2). Os valores estão expressos em termos de GI_{50} que é a concentração responsável por 50% de inibição do crescimento celular. Verificou-se que nas quatro linhas de células testadas o valor de GI_{50} do extrato foi quase três vezes superior (e, portanto, a citotoxicidade inferior) ao valor encontrado para o ergosterol. Deve realçar-se o facto de que extrato não apresentou toxicidade para células não tumorais (cultura primária

de células de fígado de porco- PLP2; $GI_{50} > 400 \mu\text{g/mL}$). Por sua vez o ergosterol apresentou toxicidade na concentração de $89,54 \pm 3,29 \mu\text{g/mL}$.

4.2. Incorporação do extrato de *A. bisporus* em iogurtes

O extrato de *A. bisporus* foi incorporado em iogurtes visando avaliar se este poderia ser uma fonte de micoesteróis para produtos alimentares. Para isso, foi realizada uma análise detalhada dos ensaios descritos na Tabela 5 tendo-se verificado se as suas propriedades bioativas se mantinham quando incorporados no iogurte e se havia, ou não, alteração no perfil nutricional dos produtos finais nomeadamente ao nível de macronutrientes, energia, açúcares solúveis e ácidos gordos.

4.2.1. Conteúdo de ergosterol nas amostras

Com o objetivo de comprovar que a quantidade teórica adicionada ao iogurte era detetada e quantificada de forma correta na análise de HPLC previu-se a verificação do conteúdo de ergosterol utilizando o procedimento de HPLC descrito na secção 3.4. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 8 onde se verifica que as amostras controlo (ICP e ICN) não apresentaram ergosterol, tal como esperado dado que este (ou o extrato contendo ergosterol) não foi adicionado. Comprova-se que as quantidades teóricas adicionadas (2 g) são bem determinadas para IERG2, uma vez que se obtiveram valores de 1,952 e 1,968 g para 100 g de iogurte; e para IERG1 e IEXT (quantidade teórica 0,075 g) tendo sido detetados valores entre 0,063 e 0,061 g para 100 g de iogurte.

Tabela 8. Conteúdo de ergosterol presente nas amostras.

AMOSTRA	CONTEÚDO DE ERGOSTEROL (g/100 g)	
	T0	T1
ICN	ni	ni
ICP	ni	ni
IERG1	$0,062 \pm 0,01$	$0,063 \pm 0,01$
IERG2	$1,952 \pm 0,03$	$1,968 \pm 0,02$
IEXT	$0,061 \pm 0,01$	$0,062 \pm 0,01$

ni. não identificado

4.2.2. Efeitos nos macronutrientes e na energia

A Tabela 9 representa os perfis nutricionais e energéticos das amostras de iogurte estudadas. Tal como esperado para iogurtes, a humidade foi o parâmetro com o valor mais elevado (variando entre 78 e 87 g/100 g). Nutricionalmente, os hidratos de carbono foram os macronutrientes mais abundantes variando entre 5,7 e 14,4 g/100 g, seguidos das proteínas (3,6 a 4,2 g/100 g).

Tabela 9. Perfil nutricional e energético das amostras de iogurte analisadas.

		HUMIDADE	GORDURA	PROTEÍNAS	CINZAS	H. CARB.	ENERGIA
		g/100 g					kcal/100 g
Tempo de Armazenamento (TA)	T0	81±3	1,5±0,4	4,1±0,4	1,19±0,04	12±3	329±41
	T1	81±3	1,6±0,5	3,9±0,3	1,1±0,1	12±4	333±45
p-valor (n=30)	Teste T de Student	0,44	0,003	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tipo de Incorporação (TI)	ICN	80,0±0,1	0,99±0,02	3,75±0,03	1,19±0,03	14,0±0,1	335±2
	ICP	86,7±3	2,3±0,2	4,11±0,05	1,1±0,1	5,7±0,3	251±1
	IERG1	80,2±0,7	1,41±0,05	4,2±0,6	1,13±0,04	13,07±0,9	342±11
	IERG2	79,3±0,9	1,5±0,2	3,6±0,1	1,10±0,06	14,4±0,9	361±17
	IEXT	78,7±0,1	1,46±0,06	4,2±0,2	1,19±0,05	14,4±0,3	367±4
p-valor (n=12)	Teste HSD de Tukey's	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TAxTI (n=60)	p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Os resultados são expressos como média ± amplitude.

H. CARB. São hidratos de carbono.

Dos iogurtes estudados, as amostras com fitoesteróis incorporados (ICP) apresentaram um perfil de ácidos gordos e de açúcares solúveis diferente dos demais, o que pode estar relacionado com o facto deste iogurte ter ingredientes diferentes dos restantes, de acordo com a informação disponibilizada no rótulo (não foi possível encontrar no mercado nenhuma marca que tivesse iogurtes com e sem fitoesteróis contendo os mesmos ingredientes). A amostra ICP, como pode ser verificado na Tabela 9, apresentou valores superiores no que diz respeito ao teor de gordura e inferiores no que diz respeito aos teores de hidratos de carbono e energia. Para todos os ensaios, verificou-se uma interação significativa entre TA e TI, portanto, podendo-se tirar algumas conclusões das MME.

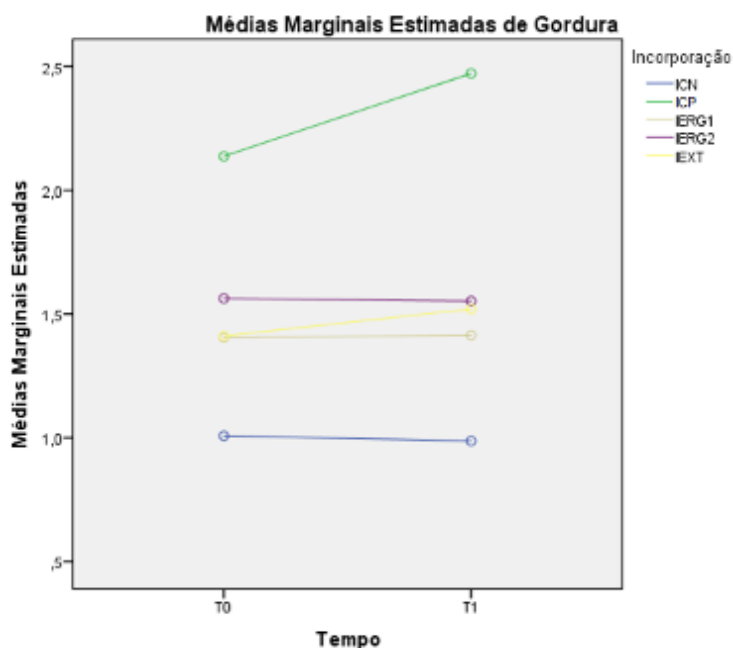


Figura 4. Médias Marginais Estimadas (MME) para a gordura.

Na Figura 4 são apresentadas as MME para a gordura. Pode-se observar que, apesar de não existirem diferenças significativas, o teor de gordura foi mais influenciado pelo tipo de incorporação do que pelo tempo de armazenamento. A análise das MME, demonstra que os iogurtes que continham o extrato de *A. bisporus* (IEXT) e os que apresentam fitoesteróis na sua composição (ICP) apresentaram uma maior preservação do teor de gordura ao longo do tempo de armazenamento, o que pode indicar uma atividade antioxidante do extrato. (Figura 4). O extrato de *A. bisporus* também parece ter preservado a fração de proteína dos iogurtes (MME não apresentada), o que é um aspeto favorável uma vez que a degradação das proteínas em alimentos não é desejável, pois geralmente altera as características sensoriais do produto.

Em termos gerais, o perfil nutricional dos iogurtes não foi significativamente alterado pelo tipo de incorporação (TI). Além disso, tendo os iogurtes sido armazenados em condições adequadas, seriam espectáveis alterações pouco significativas no que se refere ao tempo de armazenamento (TA).

4.2.3. Efeitos nos açúcares solúveis

Foram identificados seis açúcares solúveis na análise por HPLC acoplado com um detector de índice de refração. Nomeadamente, foi detetada glucose, frutose, sacarose, lactose, galactose e manitol (Tabela 10). O manitol só foi detectado nos iogurtes com extrato de *A. bisporus* (IEXT), tendo sido quantificado juntamente com galactose, por apresentarem tempos de retenção muito próximos. Este comportamento era previsível já que o extrato apresenta na sua composição manitol.

Tabela 10. Composição em açúcares solúveis das amostras de iogurte analisadas.

		FRUTOSE	GLUCOSE	SACAROSE	LACTOSE	GALACTOSE	TOTAL
		g/100 g					
Tempo de Armazenamento (TA)	T0	0,3±0,1	0,97±0,06	4±2	2±1	0,6±0,4	8±3
	T1	0,15±0,09	0,98±0,07	5±3	3±2	0,5±0,4	10±4
p-valor (n=30)	Teste T de Student	<0,001	0,241	<0,001	<0,001	0,03	<0,001
	Tipo de Incorporação (TI)	ICN	0,31±0,02	1,00±0,01	4,5±0,3	3,5±0,6	0,23±0,06 ^b
ICP		-	0,90±0,02	0,031±0,002	0,099±0,002	1,02±0,02 ^d	2,05±0,05
IERG1		0,2±0,1	0,97±0,05	6±1	3,8±0,8	0,15±0,04 ^{a,b}	11±2
IERG2		0,25±0,09	1,00±0,08	6±1	3,7±0,7	0,24±0,02 ^{c,b}	11±2
IEXT		0,24±0,07	1,02±0,05	6,0±0,6	3,8±0,6	*1,1±0,3 ^e	12±1
p-valor (n=12)	Teste HSD de Tukey's	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	TAxTI (n=60) p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,346	<0,001

Os resultados são expressos como média ± amplitude.

*Galactose + Manitol

Podemos perceber que o açúcar que está em maior concentração nas amostras analisadas é a sacarose, com valores entre 0,031 e 6 g/100 g, seguindo-se a lactose com valores entre 0,099 e 3,8 g/100 g. Na amostra que contém fitoesteróis (ICP) não foi detectada frutose; além disso, possui menor quantidade de sacarose e lactose o que pode estar relacionado com diferenças no processo de fermentação. Para todos os açúcares solúveis, excluindo a galactose ($p>0,05$), houve uma interação significativa entre TA e TI ($p<0,001$). No caso da galactose todas as amostras foram significativamente diferentes entre si, sendo que o maior valor obtido foi para IEXT (não esquecendo que este valor está quantificado juntamente com manitol), e o menor valor foi encontrado para os iogurtes com ergosterol incorporado na mesma concentração da presente no extrato de *A. bisporus* (IERG1).

Verifica-se também um aumento no teor de lactose de 2 g/100 g no tempo 0 para 3 g/100 g no T1, facto que pode ser explicado pela combinação entre glucose e galactose que constituem este dissacarídeo.

Na Figura 5 são apresentadas as MME para a sacarose, podendo-se concluir que apenas os iogurtes do controlo negativo (ICN) apresentaram redução da sacarose ao longo do tempo, enquanto que para as amostras IERG1, IERG2 e IEXT houve um aumento do teor de sacarose; já para ICP a quantidade manteve-se.

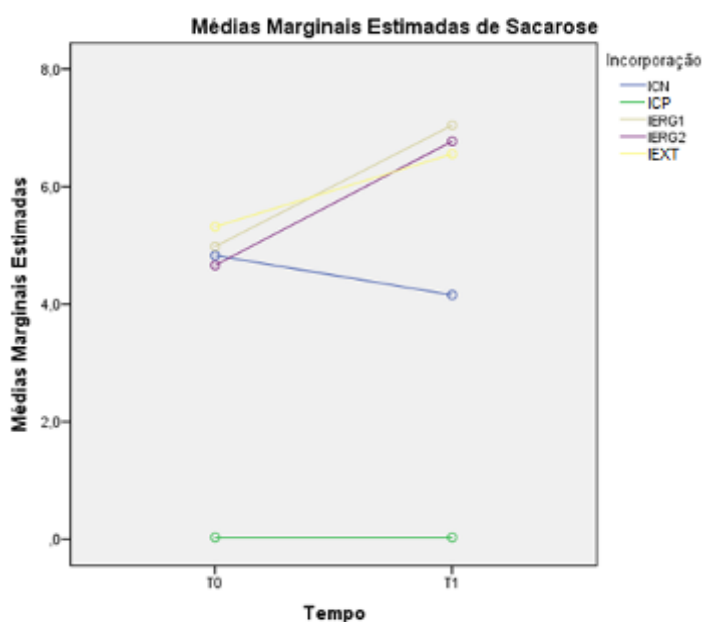


Figura 5. Médias Marginais Estimadas (MME) para a sacarose.

4.2.4. Efeitos nos ácidos gordos

A Tabela 11 mostra o perfil em ácidos gordos (expresso em percentagem relativa) obtidos por cromatografia gasosa com um detector de ionização de chama. São apresentados apenas os ácidos gordos mais abundantes uma vez que estes são os que têm maior contribuição para o perfil nutricional e organoléptico. São apresentadas também as percentagens de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA).

Dos ácidos apresentados, o ácido oleico (C18:1) e o ácido palmítico (C16:0) foram os mais abundantes com valores na gama 20,8-52,8% e 6,27-28,9%, respetivamente. Em geral, podemos verificar que a fração de ácidos gordos

saturados foi a mais elevada com valores variando entre 12,9 e 69,6%, seguindo-se a de ácidos gordos monoinsaturados (22,9 a 54,3%) e, por último, a fração dos polinsaturados (7,3 a 32,8%). Entre os ácidos gordos identificados, o mais abundante foi o ácido oleico que é conhecido por apresentar propriedades benéficas para a saúde (DEGIROLAMO, SHELNESS, & RUDEL, 2008; JONES *et al.*, 2015; MELCHIOR *et al.*, 2013).

As mostras ICP foram as que apresentaram menor quantidade de SFA (12,9%) e maior quantidade dos ácidos oleico (52,8%), linoleico (C18:2) (21,43%) e linolénico (C18:3) (11,30%).

Houve interação significativa ($p < 0,001$) para todos os ácidos gordos (Tabela 10). Além disso, foram observadas poucas alterações, tal como esperado, uma vez que os iogurtes apresentam na sua constituição um conservante (E202, sorbato de potássio) e foram mantidos sob refrigeração durante 7 dias, para que não ocorresse peroxidação lipídica. Isto impediu a ocorrência de alterações significativas. No entanto, a não observação de fenómenos de peroxidação lipídica destaca também os benefícios da incorporação de extrato de *A. bisporus*, que apresentam atividade antioxidante.

Tabela 11. Composição em ácidos gordos maioritários das amostras de iogurte analisadas.

		C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	C18:3	SFA	MUFA	PUFA
		Expresso em percentagem relativa								
Tempo de Armazenamento (TA)	T0	8±4	24±9	9±4	28±12	10±6	2±4	58±23	30±12	12±10
	T1	9±4	24±9	9±4	27±13	10±6	2±4	58±23	29±13	13±10
p-valor (n=30)	Teste T de Student	<0,001	<0,001	0,001	<0,001	<0,001	<0,001	0,006	<0,001	<0,001
Tipo de Incorporação (TI)	ICN	10,2±0,1	28,9±0,4	12,7±0,1	20,8±0,2	7,1±0,2	0,35±0,02	69,6±0,3	22,9±0,4	7,4±0,2
	ICP	0,79±0,1	6,27±0,05	2,1±0,1	52,8±0,5	21,43±0,06	11,30±0,05	12,9±0,4	54,3±0,4	32,80±0,05
	IERG1	10,68±0,08	27,8±0,3	10,9±0,4	21,1±0,6	7,0±0,4	0,30±0,08	69,2±0,3	23,1±0,6	7,3±0,5
	IERG2	10,8±0,7	28,8±0,6	11,0±0,4	21,4±0,6	7,53±0,07	0,31±0,03	68,7±0,5	23,4±0,6	7,8±0,1
	IEXT	10,8±0,5	28,3±0,4	10,4±0,3	21,2±0,5	7,2±0,4	0,38±0,03	68,5±0,8	23,2±0,4	7,6±0,4
p-valor (n=12)	Teste HSD de Tukey's	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TA×TI (n=60)	p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Os resultados são expressos como média ± amplitude.

Ácido mirístico (C14:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1); Ácido linoleico (C18:2); Ácido linolénico (C18:3); SFA saturated fatty acids (ácidos gordos saturados); MUFA monounsaturated fatty acids (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA polyunsaturated fatty acids (ácidos gordos poliinsaturados).

A diferença para os 100% corresponde a outros 11 ácidos gordos menos abundantes no caso do ICN, IERG1, IERG2 e IEXT e a outros 15 no caso do ICP (dados não apresentados).

4.2.5. Efeitos na atividade antioxidante

Na Tabela 12 apresentam-se os valores da atividade antioxidante baseados na atividade captadora de radicais de DPPH. Como se pode observar a amostra que teve a maior atividade antioxidante foi IERG2 (iogurtes que apresentam concentração em ergosterol equivalente à dos fitoesteróis nos iogurtes comerciais), tendo sido necessárias 52 mg/mL para captar 50% dos radicais DPPH. O segundo melhor resultado foi obtido para IEXT (iogurtes com 2 g de extrato de *A. bisporus*) correspondendo a um valor de EC₅₀ de 93 mg/mL. Apesar de IEXT e IERG1 apresentarem teoricamente os mesmos valores de ergosterol, a IEXT apresentou maior atividade do que IERG1. Isto deve-se ao facto do extrato poder apresentar além do ergosterol outras moléculas que podem influenciar na atividade antioxidante. A amostra que teve o pior resultado como era esperado foi ICN que corresponde aos iogurtes sem adição de extrato (EC₅₀=324 mg/mL). Os resultados obtidos na Tabela 7 para a atividade antioxidante foram confirmados pelos valores listados na Tabela 12 tendo-se comprovado a ação antioxidante do ergosterol e do extrato no alimento.

Tabela 12. Atividade antioxidante das amostras de iogurte analisadas.

		VALORES DE EC ₅₀ (mg/mL)
Tempo de Armazenamento (TA)	T0	152±87
	T1	143±104
<i>p</i> -valor (n=30)	Teste T de Student	<0,001
Tipo de Incorporação (TI)	ICN	324±17
	ICP	141±9
	IERG1	126±16
	IERG2	52±9
	IEXT	93±3
<i>p</i> -valor (n=12)	Teste HSD de Tukey's	<0,001
TA×TI (n=60)	<i>p</i> -valor	<0,001

Os resultados são expressos como média ± amplitude.

Assim, os extratos obtidos a partir do cogumelo *A. bisporus* apresentam propriedades bioativas para além da atividade antioxidante podendo ser obtidos a partir de biomassa menos nobre (bioresíduos) disponibilizada por produtores de cogumelos, retornando valor acrescentado aos mesmos num conceito de bioeconomia circular. O procedimento utilizado na extração sendo fácil, barato e evitando passos de purificação, permitirá obter ingredientes funcionais para

alimentos e/ou bebidas, nomeadamente conferir efeitos hipocolesterolémicos como demonstrado por Gil-ramírez *et al.* (2014).

Na análise feita por MME para a atividade captadora de DPPH, demonstrada na Figura 6, podemos perceber que para os iogurtes controlo os valores de EC_{50} aumentaram ao longo do tempo, tendo diminuído para as restantes amostras. Assim, para as amostras incorporadas verificou-se um aumento da atividade ao longo do tempo, eventualmente relacionada com sinergias entre os compostos presentes que se manifestam apenas após alguma interação. Mais uma vez, este resultado é bastante interessante do ponto de vista da manutenção das propriedades nutricionais e organoléticas dos produtos alimentares, uma vez que estes bioativos podem interromper a peroxidação lipídica, conferindo simultaneamente propriedades benéficas ao consumidor, mesmo depois de algum tempo de armazenamento.

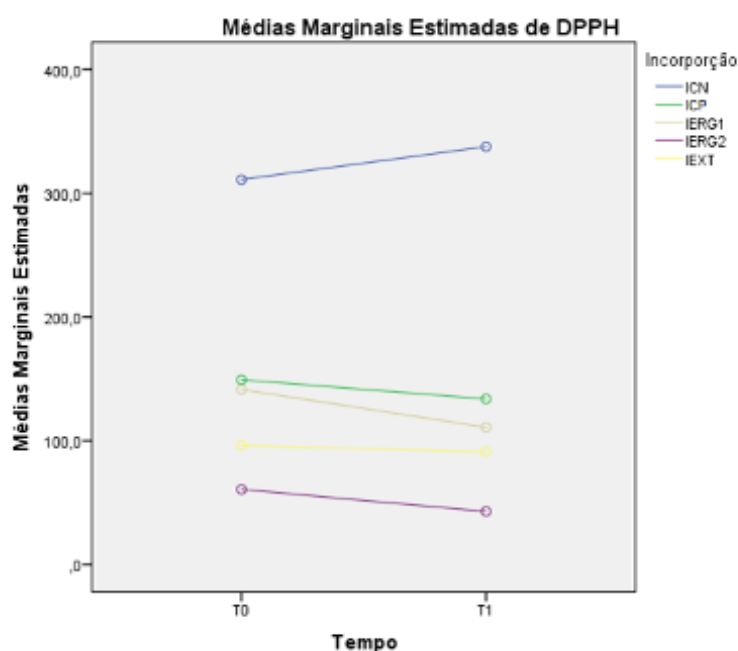


Figura 6. Médias Marginais Estimadas (MME) para a atividade captadora de DPPH.

4.2.6. Efeitos sobre as propriedades citotóxicas

Na Tabela 13 são apresentadas as propriedades citotóxicas das amostras de iogurte analisadas e testadas em 4 linhas celulares tumorais humanas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2) e numa cultura primária de células não tumorais obtida a partir de fígado de porco (PLP2).

Apesar de não ser esperada uma forte atividade antitumoral das amostras de iogurte, uma vez que esta atividade é geralmente associada a moléculas anticancerígenas individuais como é o caso da elipticina, usada como controlo positivo (ver Tabela 13), este ensaio teve por objetivo determinar os potenciais efeitos quimiopreventivos das amostras em estudo.

Como pode ser observado houve interação significativa para todas as linhas celulares tumorais estudadas. Além disso, podemos verificar que a amostra que conduziu a melhores resultados foi a IERG2 (iogurte incorporado com 2 g de ergosterol 98%), tendo os piores resultados sido registados para os iogurtes controlo.

Até à concentração máxima testada (400 µg/mL), somente IERG 2 apresentou hepatotoxicidade em células não tumorais (PLP2, GI₅₀ = 189 µg/mL). Assim, a toxicidade observada para as células não tumorais pode estar relacionada com a presença de ergosterol numa concentração muito elevada (2 g). Quando a concentração de ergosterol é inferior, tal como nas amostras IEXT e IERG1 (0,075 g de ergosterol), não se verificou qualquer hepatotoxicidade. Assim, a escolha de concentrações próximas a este valor pode oferecer toxicidade para células tumorais, mas não para células normais de fígado.

Tabela 13. Propriedades citotóxicas das amostras de iogurte analisadas.

		MCF-7	NCI-H460	HeLa	HepG2	PLP2
		GI ₅₀ (µg/mL)				
Tempo de Armazenamento (TA)	T0	227±137	191±110	190±125	219±131	332±99
	T1	171±111	147±90	143±90	193±120	327±106
p-valor (n=30)	Teste T de Student	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Tipo de Incorporação (TI)	ICN	>400	>400	>400	>400	>400
	ICP	>400	>400	>400	>400	>400
	IERG1	265±27	219±38	217±18	247±22	>400
	IERG2	31±12	33±7	23±3	41±4	189±8
	IEXT	301±49	253±25	261±53	329±15	>400
p-valor (n=12)	Teste HSD de Tukey's	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
TAxTI (n=60)	p-valor	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Elipticina (controlo positivo)		0,91±0,04	0,91±0,11	1,14±0,21	3,22±0,67	3,2±0,70

Os resultados são expressos como média ± amplitude.

4.3. Estudos de microencapsulação do extrato de *A. bisporus* contendo ergosterol e de ergosterol 98%

Seguidamente serão apresentados os resultados obtidos para os estudos de microencapsulação por coacervação que, tal como mencionado anteriormente, é a segunda técnica mais utilizada em processos de microencapsulação. Utilizaram-se como materiais encapsulantes, quitosano e isolado proteico de soro sendo as duas substâncias aprovadas para utilização em fins alimentares; além disso, a proteína de soro já tem vindo a ser introduzida na constituição de iogurtes (PANG *et al.*, 2016).

4.3.1. Determinação do pH para obtenção de maior quantidade de cápsulas

Na Tabela 14 apresentam-se os rendimentos obtidos nos processos de coacervação realizados a diferentes pHs. Como pode ser verificado, os melhores resultados foram obtidos para pH 5,5, facto este também comprovado por Barreto *et al.* (2009).

Tabela 14. Rendimento de formação de coacervato (com e sem adição de extrato).

RAZÃO P/Q	RENDIMENTO (%)			
	SEM EXTRATO		COM EXTRATO	
	pH 5,0	pH 5,5	pH 5,0	pH 5,5
3	7,85	9,18	4,52	5,27
5	8,37	9,03	5,13	5,60
10	7,83	4,71	-	-
25	7,44	4,33	-	-

Os resultados apresentados na Tabela 14 mostram que se obtém melhor rendimento para pH 5,5 utilizando a razão P/Q de 3 e 5, no entanto, para teores superiores de proteína (razões P/Q de 10 e 25) verificamos que ocorre o inverso, ou seja, os melhores valores de rendimento são obtidos para pH 5,0. Ao introduzir o extrato a situação mantém-se, para pH de 5,5 tendo-se obtido valores de rendimento superiores (5,27% e 5,60, para razão P/Q 3 e 5, respetivamente) quando comparados aos obtidos para pH de 5,0 (4,52 e 5,13 para razão P/Q 3 e 5, respetivamente).

O pH é um parâmetro importante no processo de formação do coacervato, sendo que o valor ótimo é obtido quando os dois polímeros apresentam equivalência elétrica, isto ocorre quando temos um pH entre o pK_a do polissacárido e o ponto

isoelétrico (pI) da proteína (GAONKAR *et al.*, 2014; KLEMMER *et al.*, 2012). O maior rendimento é concordante com a literatura, pois o valor encontrado está entre o ponto isoelétrico da proteína (4,7) e o pK_a do quitosano (6,4). Desta maneira o que temos no sistema é o quitosano apresentando carga positiva e a proteína apresentando carga negativa (KURUKJI *et al.*, 2014).

A Figura 7 apresenta as microesferas formadas no processo de coacervação, verificando-se pela análise da imagem uma maior densidade de cápsulas para pH 5,5 e razão de P/Q de 5. Outras figuras desta etapa do processo estão disponíveis em anexo.

A Figura 7 também mostra a variedade de tamanhos de cápsulas encontradas, sendo que em a) obtivemos as cápsulas de maior tamanho e em d) obtiveram-se microesferas com heterogeneidade de tamanhos. Os diferentes tamanhos de partícula e as suas diferentes características podem ser explicados, devido à influência do pH, da força iônica, do tipo de material da matriz, da concentração e da razão P/Q utilizada, para além do tipo de composto a ser microencapsulado (KLASSEN & NICKERSON, 2012; LV *et al.*, 2013).

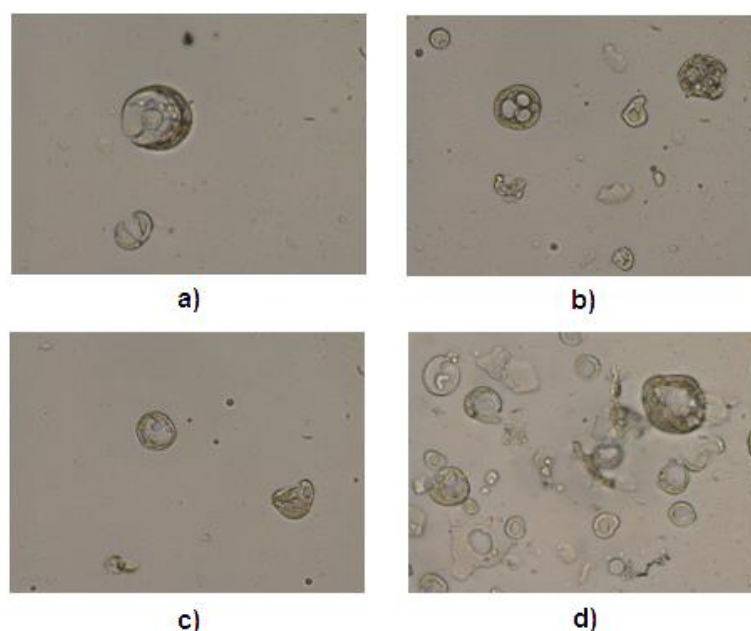


Figura 7. Microscopia ótica (400X) das microesferas formadas com diferentes pHs e diferentes razões P/Q. a) pH 5,0 3:1. b) pH 5,0 5:1. c) pH 5,5 3:1 d) pH 5,5 5:1.

4.3.2. Otimização do processo de microencapsulação utilizando a metodologia de superfície de resposta em função da temperatura e da razão P/Q

Na Tabela 15 são apresentados os resultados médios obtidos no plano experimental descrito na secção 3.8.2. Verifica-se que os valores de Y_1 (rendimento de encapsulação) variam de 3,27 a 61,04% e de 4,24 a 72,51%, para o extrato (ext) e para o ergosterol 98% (erg), respetivamente. O menor valor obtido nos dois casos (para erg e para ext) ocorreu para a temperatura de 65°C e uma razão P/Q de 8, tendo o valor superior ocorrido para 95°C e uma razão P/Q de 5,5. Já para a resposta Y_2 (eficiência de encapsulação) têm-se valores que variam entre 85,99-98,55% e 1,07-99,43%, para erg e ext, respetivamente.

Tabela 15. Resultados médios obtidos do plano experimental para as variáveis respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 alterando os parâmetros de T (X_1) e P/Q (X_2).

VARIÁVEIS		RESPOSTAS					
		EXTRATO (ext)			ERGOSTEROL (erg)		
$X_1: T$ (°C)	$X_2: P/Q$ --	Y_1 (%, m/m)	Y_2 (%, m/m)	Y_3 (%, m/m)	Y_1 (%, m/m)	Y_2 (%, m/m)	Y_3 (%, m/m)
-1(65)	-1(3)	6,95	92,06	6,77	6,67	90,97	8,00
1(85)	-1(3)	22,89	88,97	1,98	38,83	24,29	0,36
-1(65)	1(8)	3,27	98,55	7,31	4,24	98,99	5,99
1(85)	1(8)	32,09	94,50	0,71	48,82	1,07	0,01
-2(55)	0(5,5)	4,46	93,51	6,88	5,36	99,18	6,57
2(95)	0(5,5)	61,04	95,66	0,51	72,51	16,78	0,08
0(75)	-2(0,5)	11,55	94,10	9,00	13,15	94,30	10,93
0(75)	2(10,5)	13,16	92,65	1,36	13,93	65,61	0,95
0(75)	0(5,5)	8,33	89,56	3,51	8,03	83,53	3,71
0(75)	0(5,5)	9,88	89,73	2,97	9,36	73,30	2,80
0(75)	0(5,5)	9,93	85,99	2,82	10,13	99,43	3,50

Foram realizadas duas repetições para cada condição e para cada resposta e o resultado médio é apresentado.

Na resposta Y_2 não se observou o mesmo comportamento para ext e erg; para ext o menor valor obtido ocorreu a 75°C e para uma razão P/Q de 5,5 (85,99%); enquanto que para o erg o menor valor ocorreu para 85°C e uma razão P/Q de 8,0 (1,07%). O mesmo comportamento também não se verifica para os valores máximos onde para o ext ocorre a 65°C e para uma razão P/Q de 8,0 (98,55%) enquanto que para erg o ocorre a 75°C e uma razão P/Q de 5,5 (99,43%).

Para Y_3 (carga em ergosterol) os valores variaram de 0,51 a 9,00% e de 0,01 a 10,93% para ext e erg, respetivamente. O valor máximo obtido, tanto para erg

(10,93%) como para ext (9,00%), ocorre a 75°C e para uma razão P/Q de 0,5. O menor valor para ext ocorre a 95°C e para uma razão P/Q de 5,5 (0,51%); para erg este ocorre a 85°C e uma razão P/Q de 8,0 (0,01%).

A partir das respostas obtidas na **Tabela 16** foram construídos modelos matemáticos utilizando as estimativas dos mínimos quadrados não lineares com base no plano experimental. As equações polinomiais construídas a partir da equação [6] são as apresentadas a seguir:

Para ext temos as seguintes equações:

$$Y_1 = 9,3 + 13,7T + 0,83(P/Q) + 5,9T^2 + 0,85(P/Q)^2 + 2,7TP/Q \quad [7]$$

$$Y_2 = 89,7 + 0,6(P/Q) + 1,28T^2 + 0,98(P/Q)^2 \quad [8]$$

$$Y_3 = 3,1 - 1,9T - 1,3(P/Q) + 0,23T^2 + 0,6(P/Q)^2 - 0,01TP/Q \quad [9]$$

Enquanto que para erg foram obtidas as seguintes equações:

$$Y_1 = 11,9 + 17,5T + 7,3T^2 + 1,1(P/Q)^2 \quad [10]$$

$$Y_2 = 73,8 - 23,1T - 1,97(P/Q) - 5,2T^2 + 0,26(P/Q)^2 - 0,98TP/Q \quad [11]$$

$$Y_3 = 3,1 - 1,9T - 1,8(P/Q) + 0,21T^2 + 0,6(P/Q)^2 - 0,41TP/Q \quad [12]$$

Nem todos os parâmetros presentes no desenho do modelo polinomial de segunda ordem foram utilizados, uma vez que alguns termos não foram considerados significativos (**Tabela 16**).

Apesar dos coeficientes obtidos pelo modelo serem valores empíricos, e desta maneira não poderem ser relacionados com o significado físico ou químico, eles são de suma importância uma vez que podem ser úteis para prever os resultados para condições experimentais não testadas. O sinal do efeito marca o desempenho da resposta, desta forma, quando um fator apresenta um efeito positivo temos uma relação proporcional com a resposta, por outro lado, quando o efeito é negativo o fator apresentará uma relação inversamente proporcional à resposta. Além disso, quanto maior for o valor absoluto de um coeficiente, mais importante é o peso dessa variável na resposta.

Na Tabela 16 também são apresentados os valores dos coeficientes de determinação obtidos para as três variáveis respostas tanto de erg como de ext, onde verificamos que para a resposta Y_1 do ext tivemos o maior coeficiente obtido com um R^2 de 0,9898, e o menor valor obtido foi para a resposta Y_3 do erg onde o valor de R^2 obtido foi de 0,8840. Apesar deste valor ser menor que o anterior também é um valor alto demonstrando que os dados obtidos descrevem de maneira satisfatória a qualidade do ajuste obtido.

As condições ótimas individuais e globais obtidas para a microencapsulação do ext e do erg são apresentadas na Tabela 17. Pode observar-se que a condição ótima obtida (condição ótima global) para a microencapsulação tanto do extrato como do ergosterol ocorre a 55°C com uma razão de P/Q de 0,5.

O aumento da temperatura implica um aumento do rendimento do processo de microencapsulação (Y_1) como pode ser observado tanto na Figura 8 como na Figura 9. À medida que a temperatura aumenta, aumentam também as zonas de ligação disponíveis para a combinação entre o quitosano e a proteína o incrementando a possibilidade de formação das cápsulas (KURUKJI *et al.*, 2014).

Os melhores valores para a carga em ergosterol (Y_3) e eficiência de encapsulação (Y_2) foram observados para temperaturas inferiores a 75°C; possivelmente devido ao facto da proteína do soro de leite ser um composto, na sua maior parte formado por β -lactoglobulina, uma proteína globular termossensível que começa apresentar mudanças reversíveis na sua estrutura a partir de 50°C e irreversíveis a partir dos 70°C com um aumento dos grupos hidrofóbicos expostos. O aumento do número de grupos hidrofóbicos expostos pode permitir uma melhor associação com o ergosterol uma vez que essa molécula também apresenta características hidrofóbicas (IAMETTI, *et al.*, 1996; POPPI, *et al.*, 2010).

O elevado rendimento de encapsulação (Y_1) demonstrado a temperaturas elevadas pode estar relacionado com a ocorrência em grande extensão da desnaturação da proteína, facto este que não acontece a baixas temperaturas. A desnaturação da proteína provoca a sua precipitação podendo facilitar formação da ligação entre proteína e quitosano e facilidade de “aprisionamento” do princípio ativo.

Tabela 17. Valores de condições ótimas de microencapsulação de ergosterol obtidas para o extrato e o ergosterol 98% nas variáveis respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 alterando os parâmetros de Temperatura (T) (X_1) e razão P/Q (X_2).

VARIÁVEIS RESPOSTA	CONDIÇÕES ÓTIMAS DAS VARIÁVEIS		RESPOSTA ÓTIMA
	X_1 : T (°C)	X_2 : P/Q	
A) EXTRATO			
Condições ótimas das variáveis para cada uma das respostas			
Y_1	95,0±8,7 **	10,48±0,97 *	75,02 % (m/m)
Y_2	55,0±3,7 **	10,5±0,85 **	100,00 % (m/m)
Y_3	55,0±9,1 **	0,5±0,02 **	12,78 % (m/m)
Condição ótima global			
Y_1			19,46 % (m/m)
Y_2	55,0±6,9 **	0,5±0,10 **	98,32 % (m/m)
Y_3			12,78 % (m/m)
B) ERGOSTEROL			
Condições ótimas das variáveis para cada uma das respostas			
Y_1	95,0±4,1 **	10,5±0,31 **	92,66 % (m/m)
Y_2	55,0±5,2 **	0,5±0,32 **	100,00 % (m/m)
Y_3	55,0±7,1 **	0,5±0,24 **	15,87 % (m/m)
Condição ótima global			
Y_1			19,19 % (m/m)
Y_2	55,0±8,4 **	0,5±2,2 **	100,00 % (m/m)
Y_3			15,87 % (m/m)

*Condições que levam uma resposta ótima absoluta.

** Condições que levam a uma resposta ótima em relação ao desenho experimental (de -2 para +2).

A elevada eficiência de encapsulação (Y_1) observada para a razão inferior P/Q testada pode estar relacionada com o número de cargas presentes. Quando se aumenta o teor de proteína o número de cargas negativas também aumenta havendo, desta maneira, uma maior repulsão entre as moléculas de proteína presentes. Por outro lado, quando as cargas presentes estão numa concentração ideal facilitam a atração entre as moléculas de proteína e proteína/quitosano facilitando a encapsulação do ergosterol.

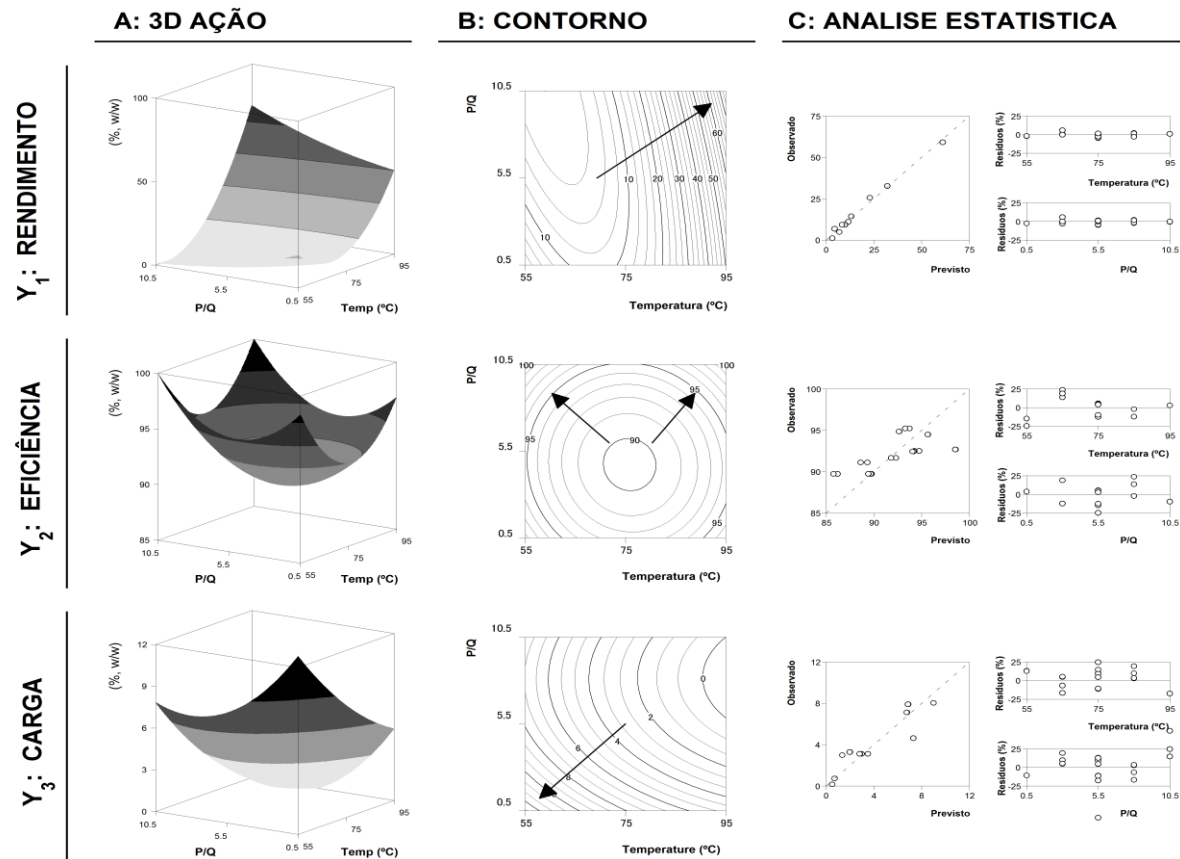


Figura 8. Representação gráfica dos resultados obtidos para a microencapsulação do ergosterol presente no extrato para 3 variáveis respostas: Y_1 demonstra a porcentagem de microesferas formadas durante o processo; Y_2 apresenta a eficiência de microencapsulação e; Y_3 demonstra a porcentagem de ergosterol inserida nas microesferas formadas.

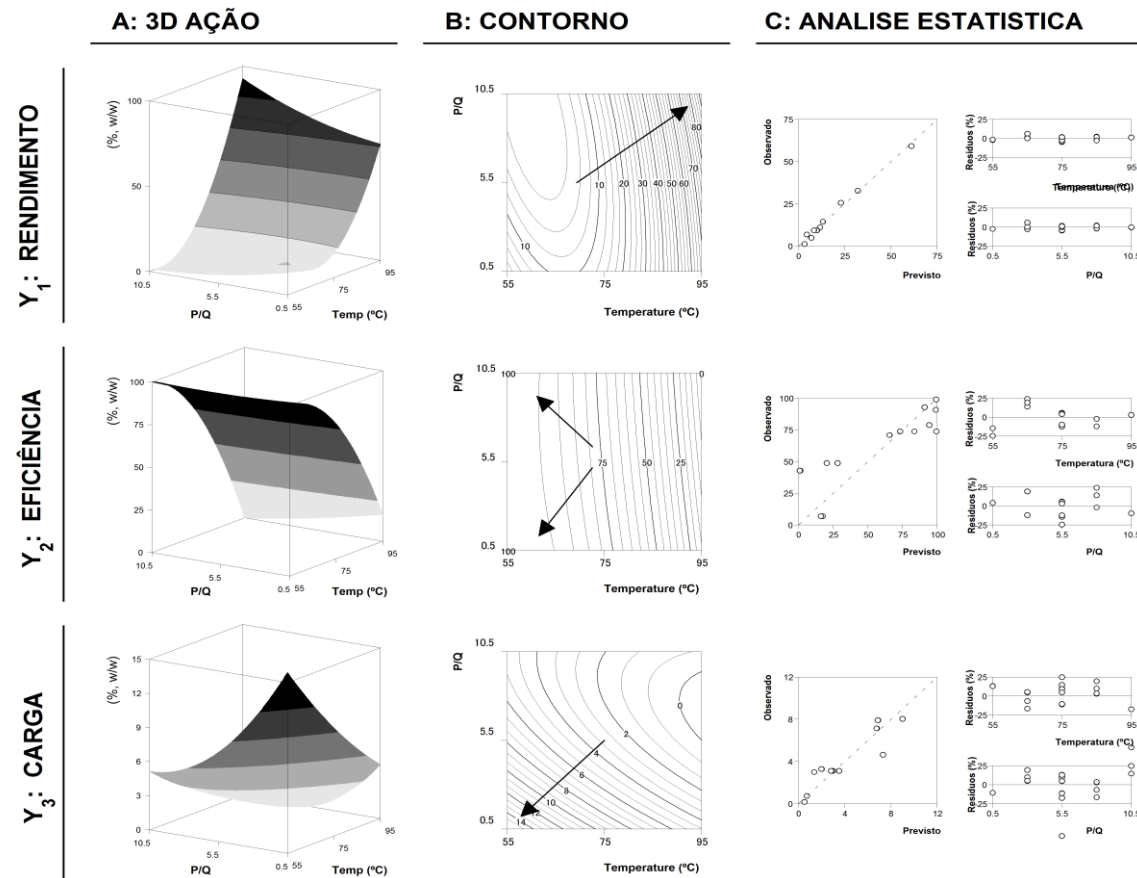


Figura 9. Representação gráfica dos resultados obtidos para a microencapsulação do ergosterol 98% para 3 variáveis respostas: Y_1 demonstra a percentagem de microesferas formadas durante o processo; Y_2 que apresenta a eficiência de microencapsulação e; Y_3 demonstra a percentagem de ergosterol inserida nas microesferas formadas.

Para além das Figura 8 e Figura 9 também é apresentado um gráfico 2D (Figura 10) que demonstra as condições ótimas individuais de cada uma das variáveis para a razão P/Q (gráficos representados à direita da figura) e para a temperatura (gráficos representados à esquerda da figura). A curva mais clara refere-se ao erg e a mais escura ao ext. Esta figura permite verificar um padrão diferente entre o erg e ext, em alguns casos, nomeadamente a situação de maior destaque ocorre para o valor da eficiência de encapsulação (Y_2), onde percebemos que tanto para a temperatura como para a relação P/Q há diferenças entre ext e erg. Verifica-se que quando relacionamos somente a eficiência de encapsulação com a temperatura, o erg mantém o valor à medida que a temperatura aumenta. Contudo, para o ext o aumento da temperatura acaba por reduzir a eficiência de encapsulação. Já para a relação P/Q verifica-se uma tendência contrária, ou seja, enquanto que para o ext se mantém pouco alterado (pouco côncavo), com o aumento da razão P/Q o erg apresenta uma concavidade muito mais acentuada por volta na razão P/Q de 5,5.

Adicionalmente, podemos perceber que as condições ótimas para o ext conduzem sempre a valores superiores aos obtidos para o ergosterol 98%. Tal pode ocorrer porque o extrato além do ergosterol pode conter outras moléculas que influenciam o processo de microencapsulação, favorecendo a encapsulação do ergosterol que incorpora.

A **Tabela 18** apresenta as microesferas obtidas para as diferentes condições testadas, onde fica evidente que a partir de 70 °C as cápsulas começam a apresentar a proteína desnaturada (nuvem escura). As outras condições do testadas estão disponíveis no Anexo.

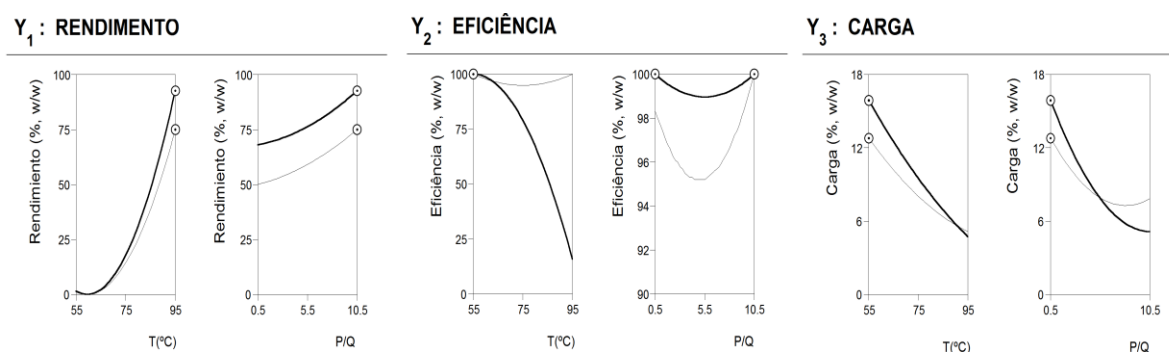
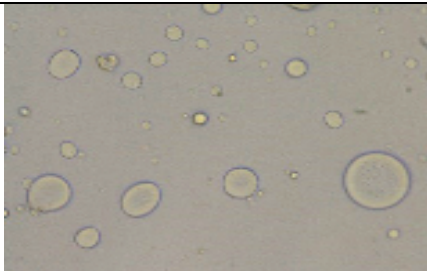
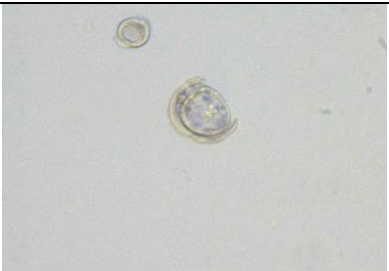
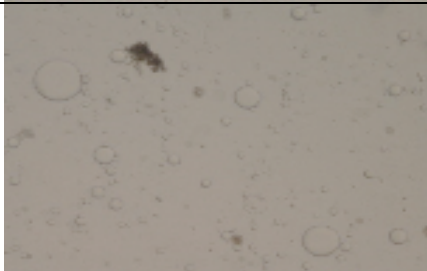
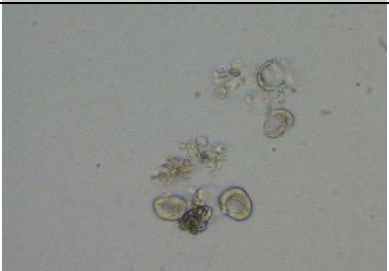
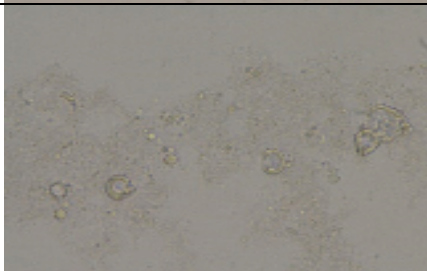
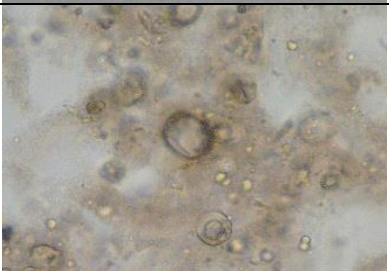
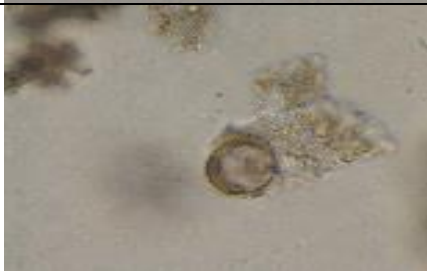
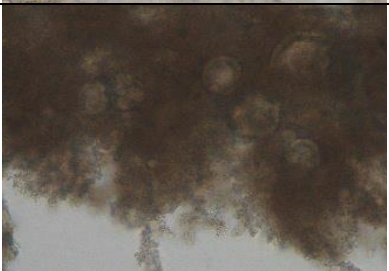
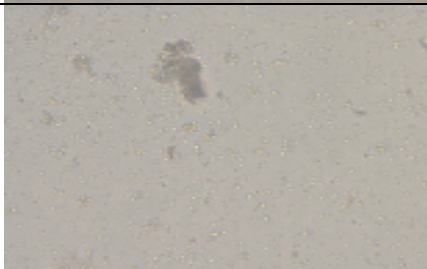
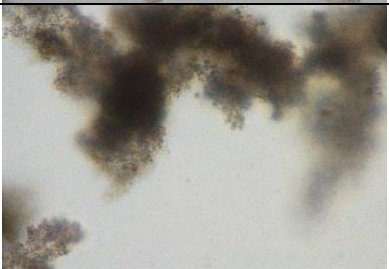


Figura 10. Representações gráficas em 2D das variáveis resposta (Y_1 , Y_2 e Y_3). A linha mais clara representa o ergosterol 98% e a linha mais escura representa o extrato.

Tabela 18. Microesferas obtidas para ext e erg nas diferentes condições analisadas (imagens com ampliação de 400X).

T (°C)	P/Q	EXTRATO	ERGOSTEROL
55	5,5		
65	3		
75	5,5		
85	8		
95	5,5		

4.3.3. Otimização da quantidade de ergosterol encapsulada

Para este estudo escolheu-se duas condições: temperatura de 55°C com razão P/Q de 0,5 e temperatura de 95°C com razão P/Q de 10,5. Esta escolha tem por base a resposta descrita na Tabela 17, onde para a temperatura de 55°C e razão P/Q de

0,5 tivemos uma resposta ótima global e, portanto, o melhor resultado. Por outro lado, a outra condição (95 °C e P/Q de 10,5) foi também considerada uma vez que para esta o rendimento de encapsulação (Y_1) era bastante elevado, sendo que esta variável do ponto de vista produtivo não deve ser desprezada.

Na Tabela 19 são apresentadas as respostas obtidas tanto para o erg como para o ext nas duas condições mencionadas anteriormente. Para a resposta Y_1 o que podemos verificar é que a 55°C o aumento tanto de ergosterol como de extrato interferem no rendimento de encapsulação, facto que já havia sido demonstrado nos resultados apresentados na Tabela 14 onde a introdução de extrato também reduziu o rendimento de encapsulação. Na realidade, o processo de coacervação depende da interação entre as moléculas, neste caso proteína e quitosano; a inserção de novas moléculas pode promover a sua reação individual com o quitosano e proteína em separado evitando que o coacervato se forme. Por outro lado, a 95°C tem-se rendimentos de encapsulação superiores aos obtidos para 55°C, tendo o melhor valor para o rendimento sido encontrado para 2700 e 5400 µg de extrato (em 15 mL de meio reacional). De realçar contudo que com o aumento da temperatura a desnaturação das proteínas ocorre em maior extensão podendo o sólido recuperado não corresponder apenas a coacervato proteína/quitosano (incluir alguma proteína desnaturada).

Para a resposta Y_2 a 55°C é possível detectar uma relação proporcional (excluindo os dois primeiros valores obtidos para o extrato que podem estar relacionados com erros experimentais) entre o aumento da concentração de ext ou erg no sistema. No entanto, para o erg parece que já temos um ótimo, pois ao passar de 16200 para 21600 µg (em 15 mL de meio reacional) há uma resposta inversa. Isso pode corresponder a uma situação de saturação do sistema, que uma vez atingindo este ponto não pode incorporar mais ergosterol sendo, portanto, quantificada uma maior quantidade de moléculas fora das cápsulas.

Para Y_3 observa-se, nas duas condições testadas, tanto para erg como ext, uma relação proporcional. Além disso, verifica-se que a 55°C os valores de carga em ergosterol são muito superiores aos obtidos a 95°C. Como verificado somente uma relação linear entre a concentração de ergosterol e a carga seria possível testar concentrações superiores de forma a encontrar a região assintótica da curva, o

que nos daria como resposta que o aumento da concentração de ergosterol já não teria qualquer efeito no aumento de Y_3 , e portanto, uma resposta ótima da concentração de ergosterol a ser encapsulada.

Tabela 19. Resultados do plano experimental obtido para as variáveis respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 alterando a massa de ergosterol a ser encapsulada (X_3).

VARIÁVEIS	RESPOSTAS					
	55 °C e P/Q 0.5			95 °C e P/Q 10.5		
	X_3 : Erg (ug)	Y_1 (%, m/m)	Y_2 (%, m/m)	Y_3 (%, m/m)	Y_1 (%, m/m)	Y_2 (%, m/m)
A) EXTRATO						
675 (19 mg)	21,45	91,80	2,20	69,75	98,45	0,11
2700 (75 mg)	12,48	90,26	10,41	71,29	98,51	0,40
5400 (150 mg)	8,50	91,82	22,14	74,65	99,24	0,71
10800 (300 mg)	8,39	94,11	29,46	55,91	98,51	1,64
16200 (450 mg)	6,21	94,94	44,07	62,41	98,58	1,95
21600 (600 mg)	5,59	95,27	51,70	48,30	99,06	3,03
B) ERGOSTEROL						
675	27,12	59,74	1,32	76,83	93,28	0,09
2700	26,55	80,37	7,11	85,53	91,11	0,33
5400	25,90	85,90	15,19	74,71	93,97	0,78
10800	24,84	88,74	31,39	73,19	94,57	1,60
16200	23,61	90,46	48,00	73,27	97,12	2,44
21600	22,85	89,60	63,38	73,95	95,22	3,14

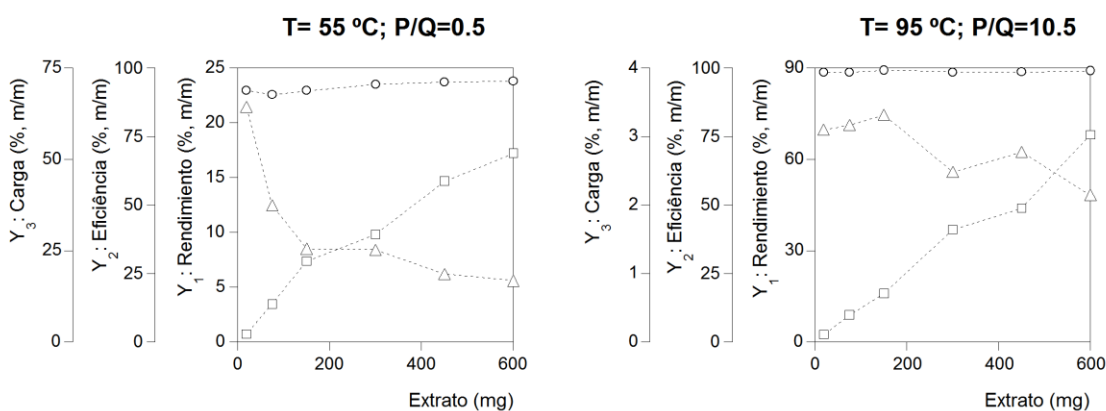
Para melhor visualização dos resultados obtidos na Tabela 19 plotou-se um gráfico disposto na Figura 11 de maneira a deixar evidente a influência do aumento da concentração de ext e erg nas três variáveis de resposta em simultâneo. A parte A da representação gráfica corresponde ao extrato e a parte B ao ergosterol. Além disso os triângulos, os círculos e quadrados representados referem-se as respostas Y_1 , Y_2 e Y_3 respetivamente.

De maneira geral, o que podemos perceber é que o aumento da concentração de ext e erg têm um impacto inversamente proporcional à resposta Y_1 , causa nenhuma variação na resposta Y_2 e tem um efeito proporcional em Y_3 . Portanto espera-se que a introdução de maior quantidade de erg ou ext, relativamente aos valores apresentados, faça com que Y_1 estabilize num valor constante. Para Y_2 a 55°C o patamar já foi atingido e, portanto, à medida que mais erg ou ext é adicionado é esperado um decréscimo dessa resposta. Para 95°C isso não acontece. Já para Y_3

espera-se que a proporcionalidade se mantenha até que o sistema sature; mesmo após a introdução de mais ergosterol não haverá aumento do valor da carga.

A: EXTRATO

○ Y₃: Carga (% m/m) □ Y₂: Eficiência (% m/m) △ Y₁: Rendimento (% m/m)



B: ERGOSTEROL

○ Y₃: Carga (% m/m) □ Y₂: Eficiência (% m/m) △ Y₁: Rendimento (% m/m)

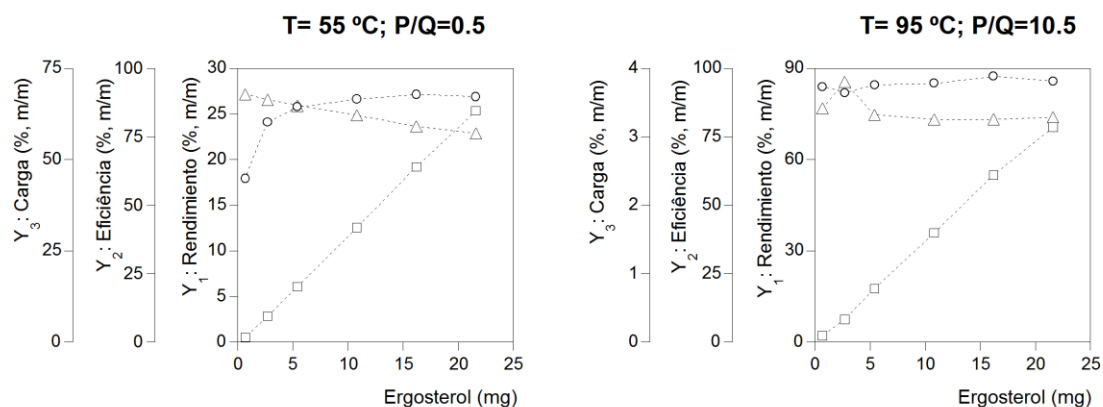

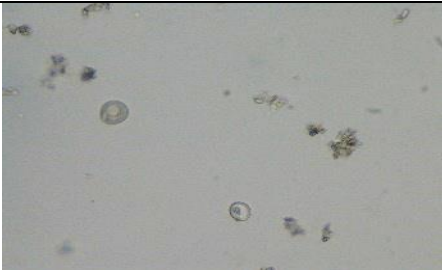

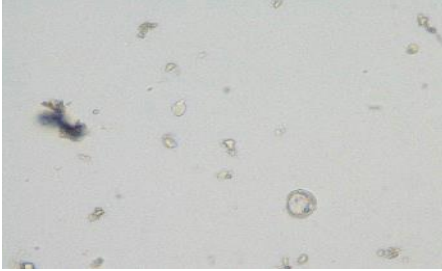


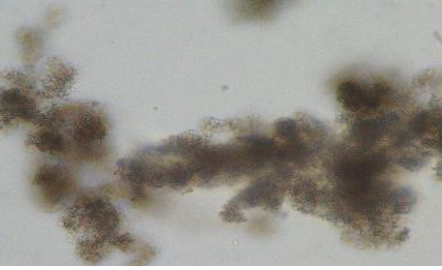



Figura 11. Representação gráfica dos resultados obtidos para a microencapsulação com o aumento da concentração de ext e erg para as respostas Y₁, Y₂ e Y₃.

Na **Tabela 20** são mostradas as microesferas (ampliação de 400X) obtidas para as massas de 5400 µg e 10800 µg (15 mL de meio reacional,) tanto para o erg como para o ext, nas duas condições testadas (as imagens complementares deste ensaio estão disponíveis em anexo).

Com os dados obtidos verifica-se que à medida que se adiciona mais ergosterol, Y₁ diminui, por outro lado, para Y₃ ocorre o inverso. Isto é relevante a nível industrial uma vez que as duas variáveis são importantes: uma grande redução do valor do rendimento de encapsulação implica mais gasto de reagentes sem aproveitamento; por outro lado, um alto valor de rendimento (Y₁) implica a nível industrial uma maior massa a adicionar ao produto alimentar para ter o mesmo efeito desejado uma vez que a carga em ergosterol diminui.

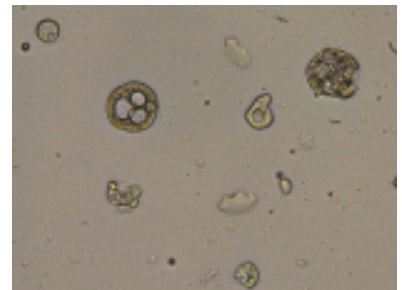
Tabela 20. Microesferas obtidas para ext e erg do processo de otimização da quantidade de ergosterol a ser encapsulada (imagens com ampliação de 400X).

T= 55 °C ; P/Q=0,5		
Erg (µg)	EXTRATO	ERGOSTEROL
5400		
10800		
T= 95 °C ; P/Q=10,5		
Erg (µg)	EXTRATO	ERGOSTEROL
5400		
10800		

Em síntese, verificou-se que a melhor resposta para a encapsulação do ergosterol pelo método de coacervação ocorre a 55°C com P/Q de 0,5 onde apesar de haver um rendimento de encapsulação inferior obtemos uma eficiência de encapsulação superior. Por outro lado, a 95°C, onde se obtém um rendimento de encapsulação elevado, a carga em ergosterol é baixa o que implica que ao nível do

desenvolvimento do produto final seja necessário utilizar uma grande quantidade de cápsulas para obter o mesmo efeito desejado.

5. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO



Este estudo, que utilizou como matéria-prima bioresíduos de *A. bisporus* como fonte de ergosterol, pode contribuir para o desenvolvimento de ingredientes bioativos com aplicação em alimentos e/ou bebidas funcionais que ajudem os consumidores a reduzir o nível de colesterol, entre outras bioatividades nomeadamente, as comprovadas neste estudo (atividade antioxidante e citotóxica para células tumorais).

Sendo *A. bisporus* o cogumelo mais consumido no mundo, a recuperação de biomassa menos nobre desta espécie torna-se extremamente interessante para ser explorada como alternativa aos fitoesteróis cuja alegação funcional está já autorizada pela EFSA e que têm sido amplamente utilizados em bebidas lácteas.

A quantidade efetiva de ergosterol incorporada em iogurtes foi monitorizada por HPLC-UV e demonstrou estar de acordo com os valores incorporados nas bebidas lácteas (iogurtes líquidos) em estudo.

Este trabalho colocou em evidência que o extrato de *A. bisporus*, quando incorporado em iogurtes líquidos (IEXT), preserva as frações proteica e lipídica, devido ao potencial antimicrobiano e antioxidante que possui, o que poderia ser interessante para evitar o desenvolvimento de bactérias proteolíticas e, assim, evitar a peroxidação lipídica em iogurtes ou outras matrizes alimentares.

A análise dos açúcares solúveis demonstrou que a incorporação do extrato tem efeito no aumento da galactose. Já nos ácidos gordos não se verificou praticamente nenhuma alteração.

Os iogurtes com o extrato de *A. bisporus* (IEXT) revelaram maior atividade antioxidante e citotóxica em linhas tumorais, comparativamente com os iogurtes contendo ergosterol puro em concentração equivalente à do extrato (IERG1). Tal pode estar relacionado com a presença na sua composição de outras moléculas que podem contribuir também para essas atividades. Além disso, a incorporação de ergosterol nessa quantidade (0.075 g) para 100 g de iogurte, não têm efeito hepatotóxico, ao contrário do que acontece quando se aumenta a quantidade incorporada para 2 g por 100 g de iogurte (IERG2).

A encapsulação do ergosterol utilizando um coacervato formado por quitosano e proteína pode ser bem aceite pela indústria alimentar uma vez que a proteína isolada do soro já é utilizada para incorporação em iogurte, sendo considerada como um resíduo industrial produzindo-se quantidades elevadas desse produto. Por outro lado, tanto a proteína como o quitosano são substâncias geralmente reconhecidas como seguras (GRAS).

Este estudo revelou que o pH de 5,5 é o que conduz a melhores resultados para obtenção de um maior rendimento de encapsulação. As condições ótimas globais para a encapsulação do ergosterol ocorrem a 55°C para uma razão P/Q de 0,5. Observou-se ainda que o ergosterol presente no extrato parece ser encapsulado de maneira mais eficaz do que o ergosterol 98%, facto que pode estar associado à presença de outras moléculas no extrato que favorecem a sua encapsulação.

A quantidade de ergosterol utilizada no processo revelou que o seu aumento pode diminuir o rendimento de encapsulação, mas por outro lado, conduz uma maior carga em ergosterol obtida.

Para trabalhos futuros sugere-se:

- Aumentar a quantidade de extrato a ser encapsulada e realizar estudos de incorporação em iogurtes;
- Nas amostras incorporadas, estudar a libertação controlada do ergosterol em condições que simulem o trato gastrointestinal;
- Após incorporação das cápsulas nos produtos finais (neste caso em iogurte) efetuar estudos reológicos e análise de textura, para verificar se existe ou não alteração nestas propriedades. Além disso realizar análises sensoriais para verificar se são percebidos sabores ou odores estranhos resultantes da incorporação do extrato no iogurte, nomeadamente perceber a vantagem de utilizar sistemas encapsulados *versus* sistemas livres;
- Comprovar as bioatividades em estudos *in vivo*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



- Abenutri. (2015). Principal encontro latino-americano da indústria de ingredientes alimentícios, de 25 a 27 de agosto. Retrieved February 2, 2016, from <http://www.abenutri.org/fisa-2015/>
- Abreu, R. M. V, Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., ... Queiroz, M. J. R. P. (2011). 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*, 46(12), 5800–5806.
- Ahmad, M. S., Ahmad, S., Gautam, B., & Afzal, M. (2013). Antigenotoxic and anticlastogenic potential of *Agaricus bisporus* against MMS induced toxicity in human lymphocyte cultures and in bone marrow cells of mice. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 14(4), 395–402.
- Alemanya-Costa, L., González-Larena, M., García-Llatas, G., Alegria, A., Barberá, R., Sánchez-Siles, L. M., & Lagarda, M. J. (2012). Sterol stability in functional fruit beverages enriched with different plant sterol sources. *Food Research International*, 48(1), 265–270.
- Andreo, D., & Jorge, N. (2006). Antioxidantes naturais: técnicas de extração. *B. CEPPA*, 24(2), 319–336.
- Annunziata, A., & Vecchio, R. (2011). Functional foods development in the European market: A consumer perspective. *Journal of Functional Foods*, 3(3), 223–228.
- Anvisa. (1999). Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. *D.O.U. - Diário Oficial Da União; Poder Executivo, de 03 de Maio de 1999*.
- ANVISA. (2005). Resolução RDC n 278, de 22 de setembro de 2005. *D.O.U. - Diário Oficial Da União; Poder Executivo, de 23 de Setembro de 2005*.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (1995). Official methods of analysis. Washington: the Institute.
- Astolfi-filho, Z., Souza, A. C., Reipert, É. C. D., & Telis, V. R. N. (2005). Encapsulação de suco de maracujá por co-cristalização com sacarose : cinética de cristalização e propriedades físicas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 25(4), 795–801.

- Azevedo, M. A., Bourbon, A. I., Vicente, A. A., & Cerqueira, M. A. (2014). Alginate/chitosan nanoparticles for encapsulation and controlled release of vitamin B2. *International Journal of Biological Macromolecules*, 71, 141–146.
- Bansode, S. S., Banarjee, D. D., Gaikwad, D. D., Jadhav, S. L., & Thorat, R. M. (2010). Microencapsulation: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2(1), 38–43.
- Barmon, B. K., Sharmin, I., Abbasi, P. K., & Mamun, A. (2012). Economics of Mushroom (*Agaricus bisporus*) Production in a Selected Upazila of Bangladesh. *The Agriculturalists*, 10(November), 77–89.
- Barreira, J. C. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Steroids in natural matrices: Chemical features and bioactive properties. In *Biotechnology of Bioactive Compounds: Sources and Applications*. (First Edit).
- Barreira, J. C. M., Oliveira, M. B. P. P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. *Food Analytical Methods*, 7, 217–223.
- Barreto, B. N., Andrade, C. T., Souza, H. K. S., & Gonçalves, M. D. P. F. (2009). Formação De Coacervatos Complexos De Quitosana E Proteínas Do Soro Do Leite E Obtenção de Microcápsulas. *Anais Do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros*, 8.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. F. R. (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, 46, 2742–2747.
- Bech-Larsen, T., & Scholderer, J. (2007). Functional foods in Europe: consumer research, market experiences and regulatory aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 18(4), 231–234.
- Bigliardi, B., & Galati, F. (2013). Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. *Trends in Food Science & Technology*, 31(2), 118–129.
- Binns, N., & Howlett, J. (2009). Functional foods in Europe: international developments in science and health claims. *European Journal of Nutrition*, 48(S1), 3–13.

- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Adding molecules to food, pros and cons: A review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 377–399.
- Carocho, M., Morales, P., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Natural food additives: Quo vadis? *Trends in Food Science & Technology*, 45(2), 284–295.
- Cencic, A., & Chingwaru, W. (2010). The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. *Nutrients*, 2(6), 611–625.
- Cheftel, J. C. (2005). Food and nutrition labelling in the European Union. *Food Chemistry*, 93(3), 531–550.
- Comuzzi, C., Polese, P., Melchior, A., Portanova, R., & Tolazzi, M. (2003). SOLVERSTAT: a new utility for multipurpose analysis. An application to the investigation of dioxygenated Co (II) complex formation in dimethylsulfoxide solution. *Talanta*, 59(1), 67–80.
- Coppens, P., da Silva, M. F., & Pettman, S. (2006). European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: A framework based on safety. *Toxicology*, 221(1), 59–74.
- Corbo, M. R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F. P., & Sinigaglia, M. (2014). Functional Beverages: The Emerging Side of Functional Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(6), 1192–1206.
- Corredig, M. (2009). Dairy-derived ingredients Food and nutraceutical uses (CRC Press, p. 738). New York - USA.
- Das, D., Vimala, R., & Das, N. (2010). Functional foods of natural origin- An overview. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 1(2), 136–142.
- Degirolamo, C., Shelness, G. S., & Rudel, L. L. (2008). LDL cholesteryl oleate as a predictor for atherosclerosis: evidence from human and animal studies on dietary fat. *The Journal of Lipid Research*, 50(Supplement), S434–S439.
- Dias, M. I., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2015). Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food Funct.*, 6(4), 1035–1052.

- Elmastas, M., Isildak, O., Turkekul, I., & Temur, N. (2007). Determination of antioxidant activity and antioxidant compounds in wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3-4), 337–345.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols – a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21(10), 510–523.
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., & Abreu, R. M. V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12), 1543–1560.
- FIB. (2013). A microencapsulação a serviço da indústria alimentícia. *Revista Food Ingredients Brasil*, 30–36.
- Foods, P. (n.d.). Portugal Foods: Potencial de crescimento de mercado. Retrieved November 19, 2015, from <http://www.portugalfoods.org/produtosfuncionais/analise-de-mercado/caracterizacao-do-mercado/potencial-de-mercado>
- Ford, K., Konishi, Y., Rajalahti, R., & Pehu, E. (2007). *Health Enhancing Foods. Country case Studies of China and India. agricultural and Rural Development (The World)*. Washington.
- Gaonkar, A., Vasisht, N., Khare, A., & Sobel, R. (2014). *Microencapsulation in the Food Industry A Practical Implementation Guide* (Elsevier). San Diego USA.
- Garcia, C. E. R., Bolognesi, V. J., Dias, J. F. G., Miguel, O. G., & Costa, C. K. (2012). Carotenoides bixina e norbixina extraídos do urucum (*Bixa orellana* L.) como antioxidantes em produtos cárneos. *Ciencia Rural, Santa Maria*, 42(8), 1510–1517.
- Gianezini, M., Alves, A. B., Techemayer, C. A., & Révillion, J. P. P. (2012). Diferenciação de produto e inovação na indústria agroalimentar: a inserção de alimentos funcionais no Brasil. *Revista de Administração, Contabilidade E Economia*, 11(1), 9–25.
- Gil-Chávez, G. J., Villa, J. A., Ayala-Zavala, J. f., Heredia, J. B., Sepulveda, D., Yahia, E. M., & González-Aguilar, G. A. (2013). Technologies for Extraction and Production of Bioactive Compounds to be Used as Nutraceuticals and Food Ingredients: An Overview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food*

- Safety*, 12(1), 5–23.
- Gil-ramirez, A., Clavijo, C., Palanisamy, M., Soler-rivas, C., Ruiz-rodriguez, A., Marín, F. R., ... Pérez, M. (2011). Edible Mushrooms As Potential Sources of New Hypocholesterolemic Compounds. *ICMBMP7*, 110–119.
- Gil-ramírez, A., Ruiz-rodríguez, A., Marín, F. R., Reglero, G., & Soler-rivas, C. (2014). Effect of ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. *Journal of Functional Foods*, 11, 589–597.
- Gouin, S. (2004). Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15, 330–347.
- Granato, D., Branco, G. F., Nazzaro, F., Cruz, A. G., & Faria, J. a F. (2010). Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development: Trends, Concepts, and Products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(3), 292–302.
- Guamán-balcázar, M. C., Setyaningsih, W., Palma, M., & Barroso, C. G. (2016). Ultrasound-assisted extraction of resveratrol from functional foods : Cookies and jams. *Applied Acoustics*, 103, 207–213.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2009). Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, 93(2), 195–199.
- Heleno, S. A., Diz, P., Prieto, M. A., Barros, L., Rodrigues, A., Barreiro, M. F., & Ferreira, I. C. F. R. (2015a). Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus* L. by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. *Food Chemistry*, 197, 1054–1063.
- Heleno, S. A., Ferreira, R. C., Antonio, A. L., Queiroz, M.-J. R. P., Barros, L., & Ferreira, I. C. F. R. (2015b). Nutritional value, bioactive compounds and antioxidant properties of three edible mushrooms from Poland. *Food Bioscience*, 11, 48–55.

- Ho, C.-T. (2015). Editorial overview: Functional foods and nutrition. *Current Opinion in Food Science*, 2, vi–vii.
- Holkem, A. T., Codevilla, C. F., & Menezes, C. R. (2015). Emulsificação/gelificação iônica interna: Alternativa para microencapsulação de compostos bioativos. *Ciência E Natura*, 37, 116–124.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111(1), 50–55.
- Howlett, J. (2008). *Functional Foods From Science To Health and Claims*. ILSI Europe (ILSI Europ). Brussels.
- Huang, H.-W., Hsu, C.-P., Yang, B. B., & Wang, C.-Y. (2013). Advances in the extraction of natural ingredients by high pressure extraction technology. *Trends in Food Science & Technology*, 33(1), 54–62.
- Iametti, S., De Gregori, B., Vecchio, G., & Bonomi, F. (1996). Modifications occur at different structural levels during the heat denaturation of beta-lactoglobulin. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 237(1), 106–12.
- ITAL. (2010). *Brasil food trends 2020* (Instituto). São Paulo.
- Jones, P. J. H., MacKay, D. S., Senanayake, V. K., Pu, S., Jenkins, D. J. A., Connelly, P. W., ... Rudel, L. L. (2015). High-oleic canola oil consumption enriches LDL particle cholesteryl oleate content and reduces LDL proteoglycan binding in humans. *Atherosclerosis*, 238(2), 231–238.
- Kalač, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: A review. *Food Chemistry*, 113(1), 9–16.
- Kang, J.-H., Jang, J.-E., Mishra, S. K., Lee, H.-J., Nho, C. W., Shin, D., ... Oh, S. H. (2015). Ergosterol peroxide from Chaga mushroom (*Inonotus obliquus*) exhibits anti-cancer activity by down-regulation of the β -catenin pathway in colorectal cancer. *Journal of Ethnopharmacology*, 173, 303–312.
- Kemmer, G., & Keller, S. (2010). Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nat. Protocols*, 5(2), 267–281.

- Kirby, B. J., & Hasselbrink, E. F. (2004). Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*, 25(2), 187–202.
- Klassen, D. R., & Nickerson, M. T. (2012). Effect of pH on the formation of electrostatic complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International*, 46(1), 167–176.
- Klemmer, K. J., Waldner, L., Stone, A., Low, N. H., & Nickerson, M. T. (2012). Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry*, 130(3), 710–715.
- Kurukji, D., Norton, I., & Spyropoulos, F. (2014). Fabrication of sub-micron protein-chitosan electrostatic complexes for encapsulation and pH-Modulated delivery of model hydrophilic active compounds. *Food Hydrocolloids*.
- Kwak, H.-S. (2014). *Nano and Microencapsulation for foods*. Wiley Blackwell. Chennai - India.
- Leiva, F. J., Saenz-Díez, J. C., Martínez, E., Jiménez, E., & Blanco, J. (2015). Environmental impact of *Agaricus bisporus* mycelium production. *Agricultural Systems*, 138, 38–45.
- Lembo, D., & Cavalli, R. (2010). Review Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*, 21(2), 53–70.
- Lima, J. R., Locatelli, G. O., Finkler, L., & Luna-finkler, C. L. (2014). Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. *Revista Ciência & Saúde*, 7(1), 27–34.
- Liu, J., Jia, L., Kan, J., & Jin, C. (2013). In vitro and in vivo antioxidant activity of ethanolic extract of white button mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food and Chemical Toxicology*, 51, 310–316.
- Ložienė, K., Venskutonis, P. R., Šipailienė, A., & Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103(2), 546–559.

- Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (2009). Atividade antioxidante do extrato de sementes de limão (citrus limon) adicionado ao óleo de soja em teste de estocagem acelerada. *Quimica Nova*, 32(4), 946–949.
- Lv, Y., Zhang, X., Zhang, H., Abbas, S., & Karangwa, E. (2013). The study of pH-dependent complexation between gelatin and gum arabic by morphology evolution and conformational transition. *Food Hydrocolloids*, 30(1), 323–332.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1–21.
- Mahdavi, A. S., Jafari, S. M., Assadpoor, E., & Dehnad, D. (2016). Microencapsulation optimization of natural anthocyanins with maltodextrin, gum Arabic and gelatin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 85, 379–385.
- Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & Function*, 5(6), 1091–1100.
- Matioli, G., & Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). Microencapsulação do licopeno com ciclodextrinas. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 23, 102–105.
- Mattila, P., Lampi, A.-M., Ronkainen, R., Toivo, J., & Piironen, V. (2002). Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. *Food Chemistry*, 76(3), 293–298.
- Melchior, J. T., Sawyer, J. K., Kelley, K. L., Shah, R., Wilson, M. D., Hantgan, R. R., & Rudel, L. L. (2013). LDL particle core enrichment in cholesteryl oleate increases proteoglycan binding and promotes atherosclerosis. *Journal of Lipid Research*, 54(9), 2495–503.
- Meneses, N. G. T., Martins, S., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2013). Influence of extraction solvents on the recovery of antioxidant phenolic compounds from brewer's spent grains. *Separation and Purification Technology*, 108, 152–158.
- Menrad, K. (2003). Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of*

- Food Engineering*, 56(2-3), 181–188.
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., & Homayouni, A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*, 132(4), 1966–1970.
- Morais, H. A., Barbosa, S., Delvivo, F. M., Silva, V. D. M., Mansur, H. S., Oliveira, M. C., & Silvestre, M. P. C. (2003). Estabilidade e Avaliação Sensorial de Lipossomas Contendo Hidrolisados de Caseína. *Brazilian Journal of Food Technology*, 6(2), 213–220.
- Mota, M. C., Clareto, S. S., Azeredo, E. M. C. de, Almeida, D. M. de, & Moraes, A. L. L. (2011). Bolo light, diet e com alto teor de fibras: elaboração do produto utilizando polidextrose e inulina. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 70(3), 268–275.
- Munin, A., & Edwards-Lévy, F. (2011). *Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. Pharmaceutics* (Vol. 3).
- Murado, M. A., & Prieto, M. A. (2013). Dose-Response Analysis in the Joint Action of Two Effectors. A New Approach to Simulation, Identification and Modelling of Some Basic Interactions. *PLoS ONE*, 8(4), e61391.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., & Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806–1815.
- Nelson, D. L., & Cox, M. (2002). Lipids, Lipoproteins, and membranes. In Sarvier (Ed.), *Lehninger - Principios de Bioquímica* (3ª ed., p. 1009). São Paulo: Sarvier.
- Nishihira, J., Kagami-Katsuyama, H., Tanaka, A., Nishimura, M., Kobayashi, T., & Kawasaki, Y. (2014). Elevation of natural killer cell activity and alleviation of mental stress by the consumption of yogurt containing *Lactobacillus gasseri* SBT2055 and *Bifidobacterium longum* SBT2928 in a double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Journal of Functional Foods*, 11, 261–268.
- Ochoa, C., & Ayala, A. (2004). Los Flavonoides : Apuntes Generales y su Aplicación en la Industria de Alimentos. *Ingeniería Y Competitividad*, 6(2), 93–104.

- Oliveira, A. C. De, Valentim, I. B., Goulart, M. O. F., Silva, C. A., Bechara, E. J. H., & Trevisan, M. T. S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Química Nova*, 32(3), 689–702.
- Olson, E. (2011). Blending of Log Normal Particle Size Distribution data from multiple image analyses into a single continuous data set. *Journal of Validation Technology*, 70–80.
- Öztürk, M., Duru, M. E., Kivrak, S., Dogan, N. M., Türkoglu, A., & Özler, M. A. (2011). In vitro antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activity studies on three *Agaricus* species with fatty acid compositions and iron contents : A comparative study on the three most edible mushrooms. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 1353–1360.
- Pang, Z., Deeth, H., Prakash, S., & Bansal, N. (2016). Development of rheological and sensory properties of combinations of milk proteins and gelling polysaccharides as potential gelatin replacements in the manufacture of stirred acid milk gels and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 169, 27–37.
- Pires, E. A., Ferreira, M. A., Vieira, R. B., Barbosa, C. A., & Santos, F. L. (2015). Perfil dos documentos de patente referentes a tecnologias e produtos probióticos, prebióticos e simbióticos na América Latina. *Cadernos de Prospecção*, 8(1), 142–149.
- Poppi, F. A., Costa, M. de R., De Rensis, C. V. B., & Sivieri, K. (2010). Soro de Leite e Suas Proteínas : Composição e Atividade Funcional Whey and its Proteins : Composition and Functional Activity. *UNOPAR Científica Ciências Biológicas E Da Saúde*, 12(2), 31–37.
- Prikler, S. (2009). *Advanced Excel for scientific data analysis* (2nd ed). Robert de Levie Ed.
- Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 27–39.
- Raud, C. (2008). Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da Danone e da Nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. *Revista de Sociologia E Política*, 16(31), 85–100.

- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J. C., Dias, M. M., Barros, L., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. *Food Chemistry*, *188*, 612–618.
- Roberfroid, M. (2002). Functional food concept and its application to prebiotics. *Digestive and Liver Disease*, *34*, S105–S110.
- Ruthes, A. C., Rattmann, Y. D., Malquevicz-Paiva, S. M., Carbonero, E. R., Córdova, M. M., Baggio, C. H., ... Iacomini, M. (2013). *Agaricus bisporus* fucogalactan: structural characterization and pharmacological approaches. *Carbohydrate Polymers*, *92*(1), 184–91.
- Servat, L., Spindola, H. M., Rodrigues, R. A. F., & Foglio, M. A. (2010). Microencapsulação: uma alternativa promissora para preservação de produtos naturais. *Revista Fitos*, *5*(2), 52–57.
- Shao, S., Hernandez, M., Kramer, J. K. G., Rinker, D. L., & Tsao, R. (2010). 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*, *58*, 11616–11625.
- Shi, P., & Tsai, C.-L. (2002). Regression Model Selection: A Residual Likelihood Approach. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Statistical Methodology)*, *64*(2), pp. 237–252.
- Shoji, A. S., Oliveira, A. C., Balieiro, J. C. C., Freitas, O., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., ... Favaro-Trindade, C. S. (2013). Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and Bioproducts Processing*, *91*(2), 83–88.
- Siegrist, M., Shi, J., Giusto, A., & Hartmann, C. (2015). Worlds apart. Consumer acceptance of functional foods and beverages in Germany and China. *Appetite*, *92*, 87–93.
- Siegrist, M., Stampfli, N., & Kastenholz, H. (2008). Consumers' willingness to buy functional foods. The influence of carrier, benefit and trust. *Appetite*, *51*(3), 526–9.

- Silva, A. C., Oliveira, M. C., Ré, P. V. D., & Jorge, N. (2009). Utilização de extrato de cogumelo como antioxidante natural em óleo vegetal. *Ciênc. Agrotec.*, 33(4), 1103–1108.
- Silva-Buzanello, R. A. Da, Ferro, A. C., Bona, E., Cardozo-Filho, L., Araújo, P. H. H. De, Leimann, F. V., & Gonçalves, O. H. (2015). Validation of an Ultraviolet-visible (UV-Vis) technique for the quantitative determination of curcumin in poly(l-lactic acid) nanoparticles. *Food Chemistry*, 172, 99–104.
- Sio, F., Laratta, B., Giovane, A., Quagliuolo, L., Castaldo, D., & Servillo, L. (2000). Analysis of free and esterified ergosterol in tomato products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3), 780–784.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B., & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. *Appetite*, 51(3), 456–67.
- Sloan, E. (2012). Beverage trends in 2012 and beyond. *Agro Food*, 23, 8–12.
- Slominski, A., Semak, I., Zjawiony, J., Wortsman, J., Gandy, M. N., Li, J., ... Tuckey, R. C. (2005). Enzymatic metabolism of ergosterol by cytochrome p450scc to biologically active 17alpha,24-dihydroxyergosterol. *Chemistry & Biology*, 12(8), 931–9.
- Stein, A. J., & Rodríguez-Cerezo, E. (2008). *Functional Food in the European Union*. Seville: JRC Europe Comission.
- Takaku, T., Kimura, Y., & Okuda, H. (2001). Isolation of an antitumor compound from *Agaricus blazei* Murill and its mechanism of action. *The Journal of Nutrition*, 131(5), 1409.
- Teichmann, A., Dutta, P. C., Staffas, A., & Jägerstad, M. (2007). Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. *LWT - Food Science and Technology*, 40(5), 815–822.
- Villares, A., García-Lafuente, A., Guillamón, E., & Ramos, Á. (2012). Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber* spp. truffles. *Journal of Food Composition and Analysis*, 26, 177–182.

- Villena, M. M. J., Hernández, M. M. E., Lara, G. V., & Martínez, R. M. A. (2009). Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular. *Ars Pharmaceutica*, 50, 43–50.
- Yuan, J.-P., Wang, J.-H., & Liu, X. (2007). Distribution of free and esterified ergosterols in the medicinal fungus *Ganoderma lucidum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 159–65.
- Zeraik, M. L., Pereira, C. a M., Zuin, V. G., & Yariwake, J. H. (2010). Maracujá: Um alimento funcional? *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(March), 459–471.

A presente dissertação deu origem a:

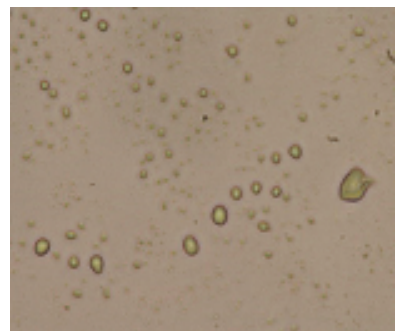
1 Publicação numa revista científica indexada à ISI:

Sandrina A. Heleno, Adenilson Rudke, Ricardo C. Calhelha, Márcio Carcho, Lillian Barros, Odinei H. Gonçalves, Maria Filomena Barreiro, Isabel C.F.R. Ferreira. Development of dairy beverages functionalized with pure ergosterol and mycosterol extracts: an alternative to phytosterol based beverages. 2016, Submetido à Food Chemistry.

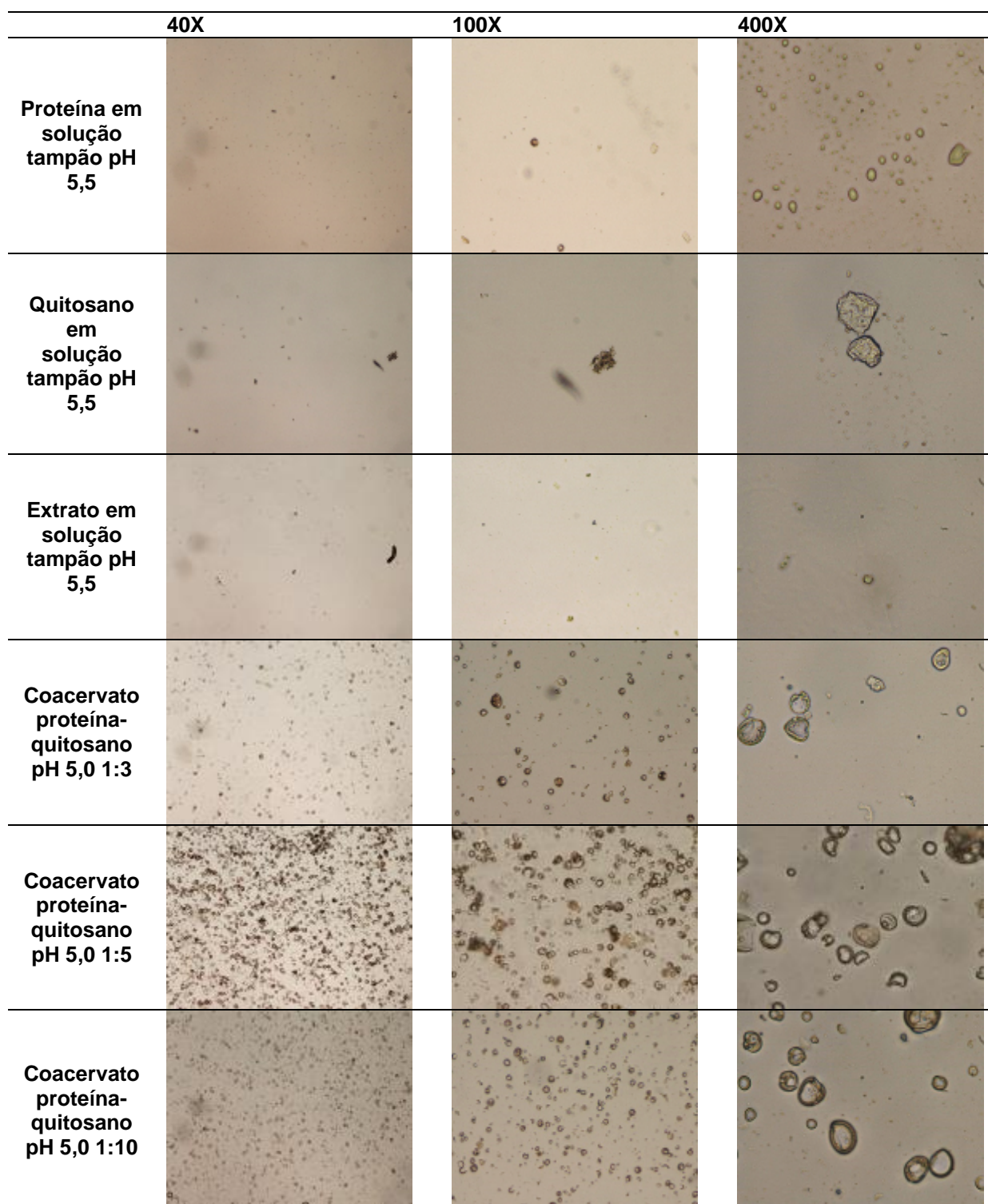
1 Comunicação oral num congresso internacional:


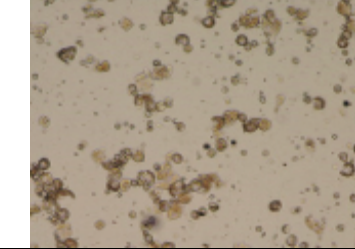
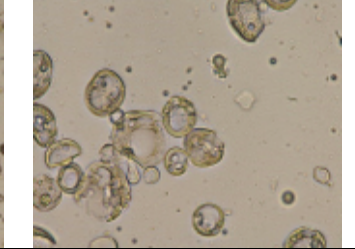

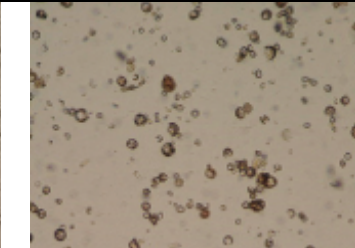


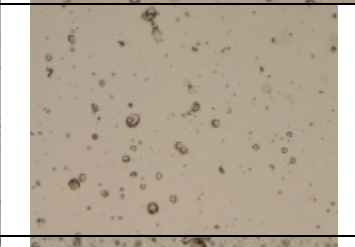
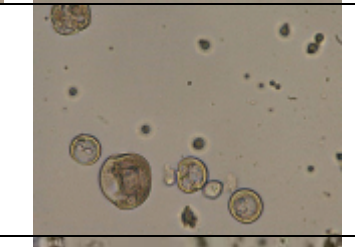

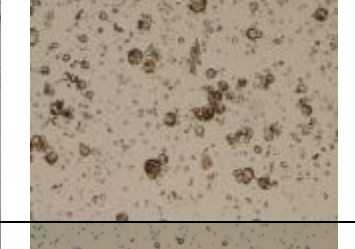


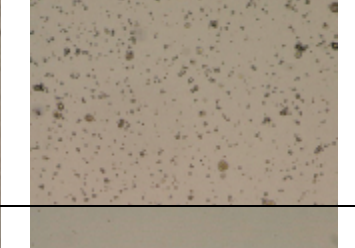
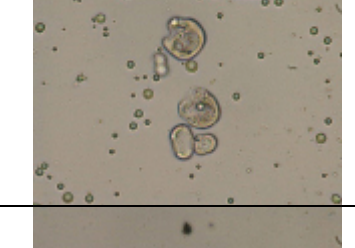
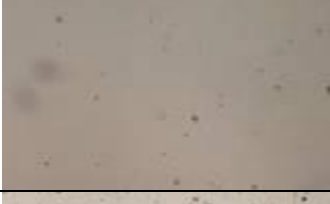
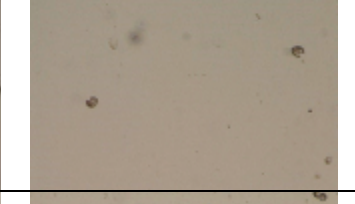
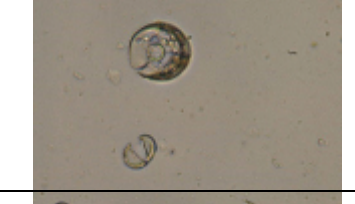

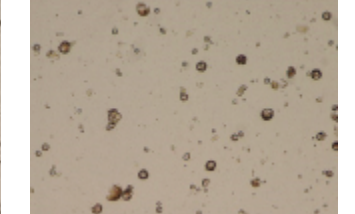
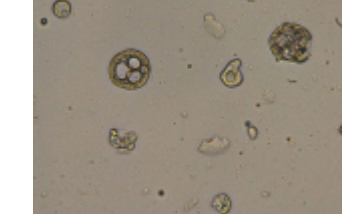
Sandrina A. Heleno, Adenilson Rudke, Ricardo C. Calhelha, Lillian Barros, Odinei H. Gonçalves, Alírio Rodrigues, Maria Filomena Barreiro, Isabel C.F.R. Ferreira. Bioactive properties of dairy beverages functionalized with pure ergosterol and mycosterol extracts: a comparative study with phytosterol counterparts. I International Conference on Research for Sustainable development in Mountain Regions, 5-7 October 2016, Bragança, Portugal.

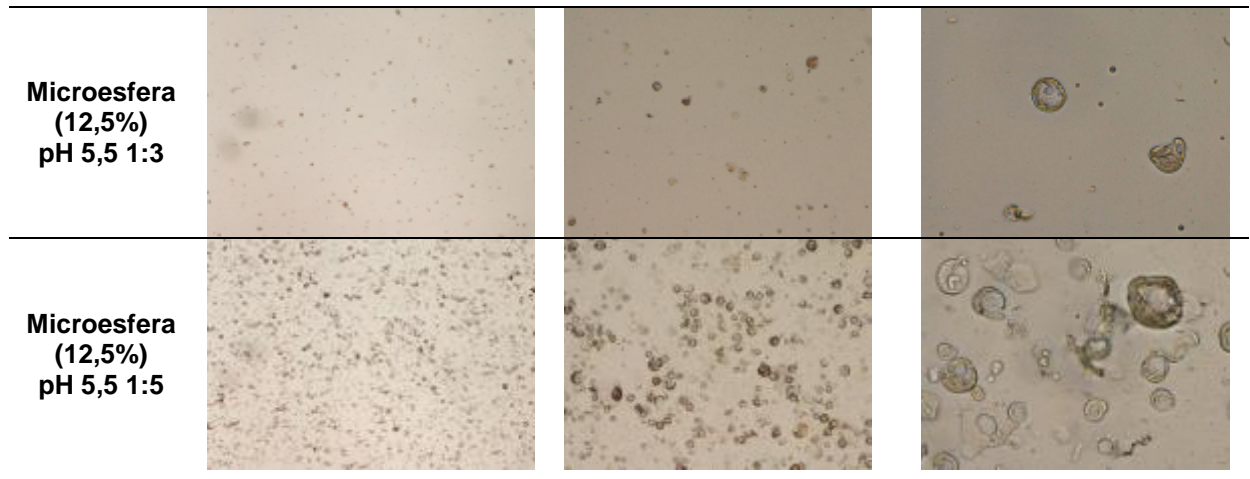
7. ANEXOS





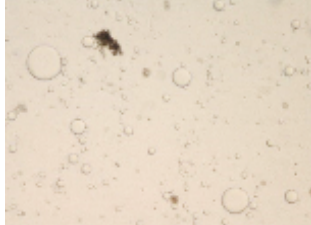





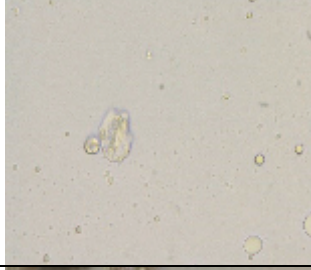


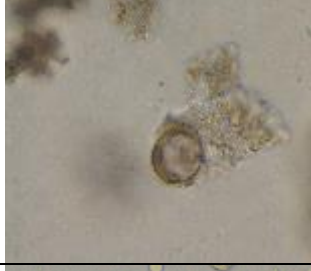


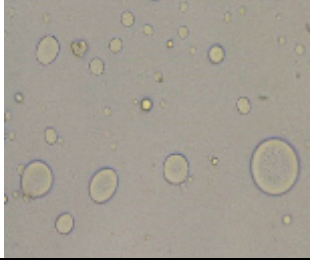
A seguir são apresentadas as fotos obtidas no ensaio preliminar:


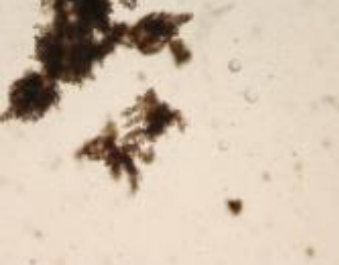
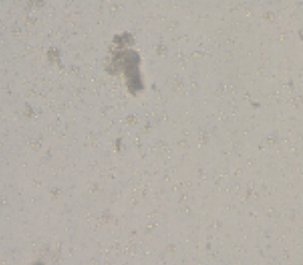


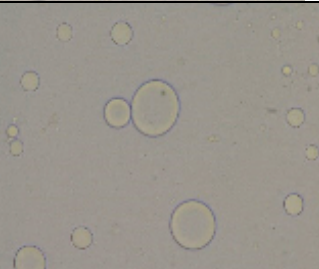


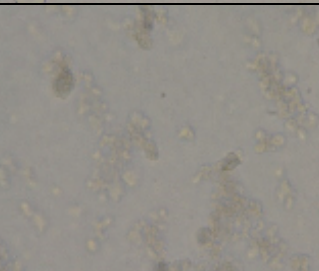







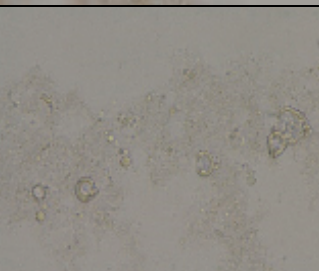


<p>Coacervato proteína- quitosano pH 5,0 1:25</p>			
<p>Coacervato proteína- quitosano pH 5,5 1:3</p>			
<p>Coacervato proteína- quitosano pH 5,5 1:5</p>			
<p>Coacervato proteína- quitosano pH 5,5 1:10</p>			
<p>Coacervato proteína- quitosano pH 5,5 1:25</p>			
<p>Microesfera (12,5%) pH 5,0 1:3</p>			
<p>Microesfera (12,5%) pH 5,0 1:5</p>			



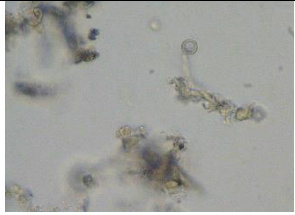

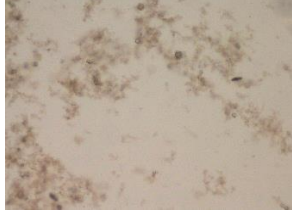
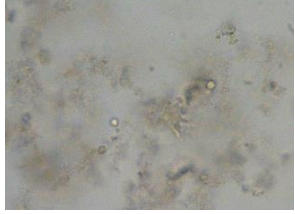

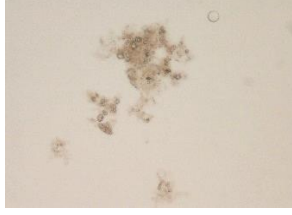
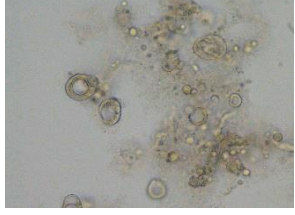
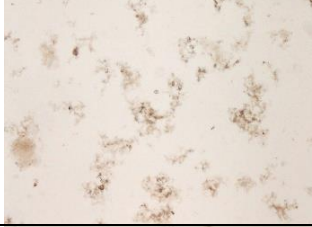


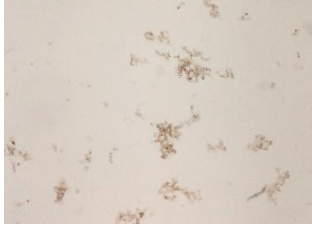

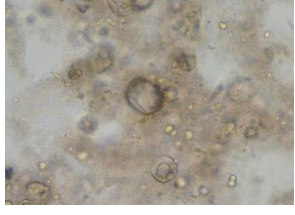


A seguir são apresentadas as imagens obtidas da etapa de otimização do processo de microencapsulação em função da temperatura e da razão P/Q (secção 4.3.2) para o extrato e para o ergosterol, respetivamente.








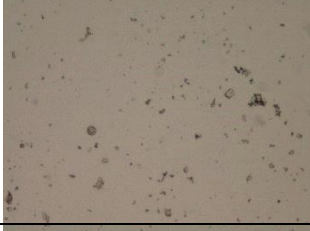


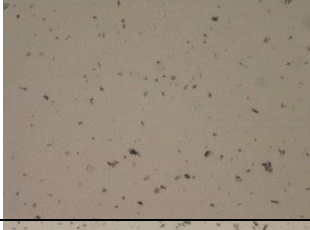
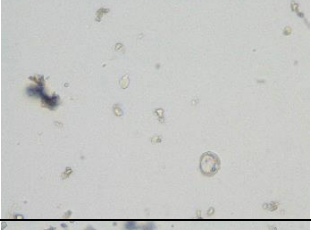

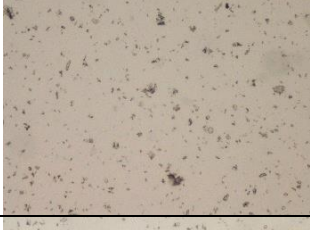

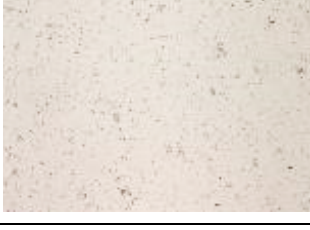


EXTRATO					
T (°C)	P/Q	40X	100X	400X	
65	3				
85	3				
65	8				
85	8				
55	5,5				




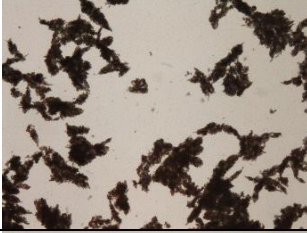
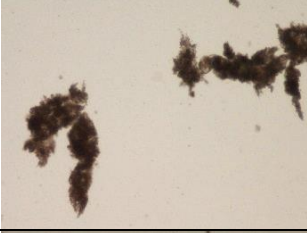
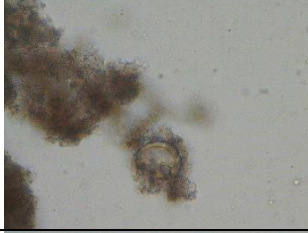

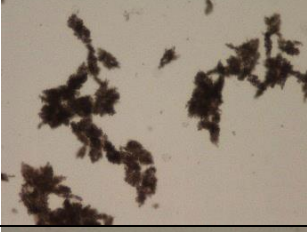

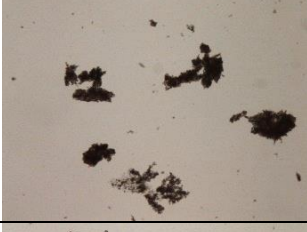
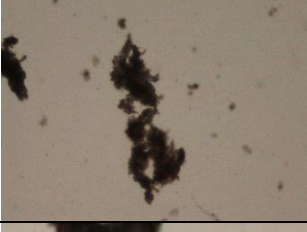

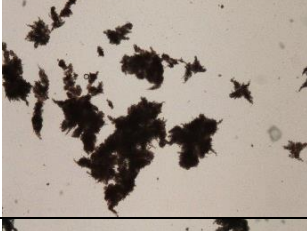



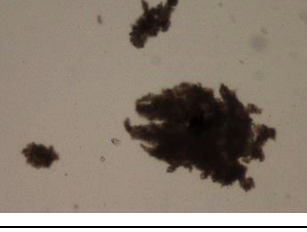

<p>95 5,5</p>			
<p>75 0,5</p>			
<p>75 10,5</p>			
<p>75 5,5</p>			
<p>75 5,5</p>			
<p>75 5,5</p>			


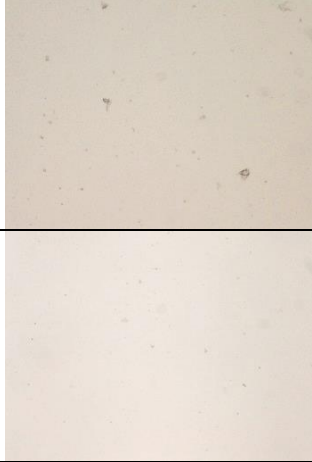
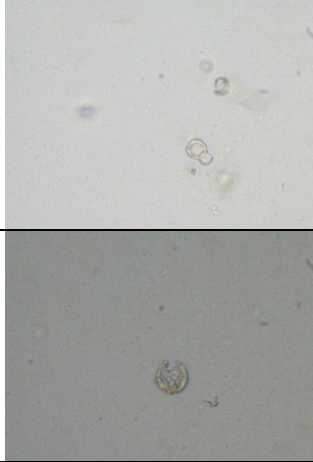
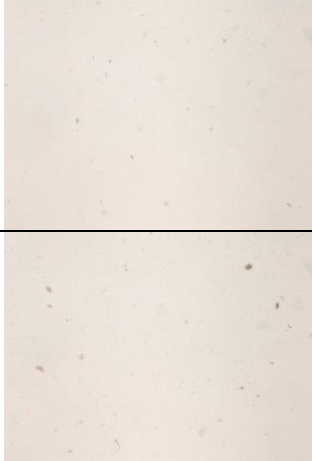
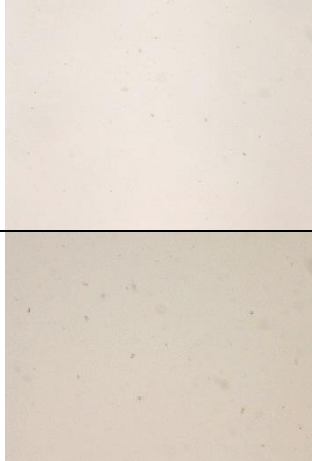
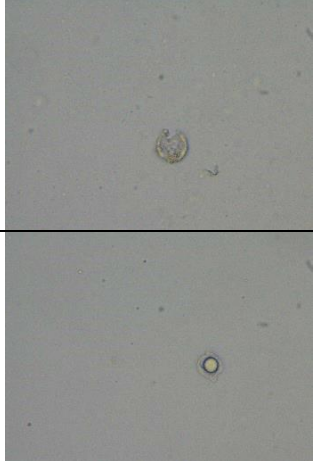
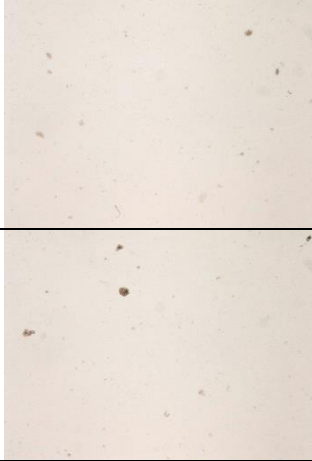
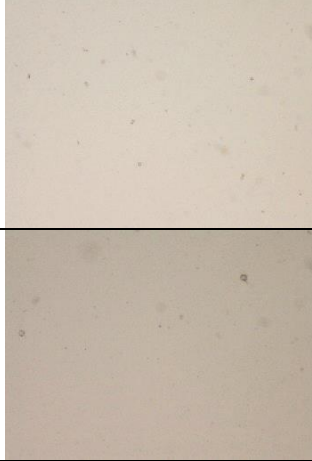
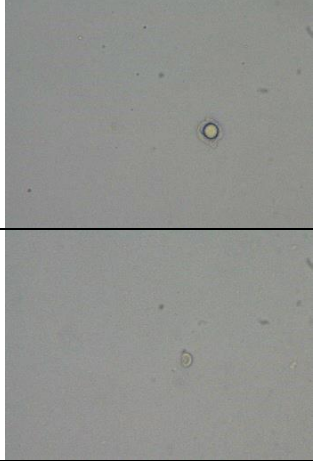
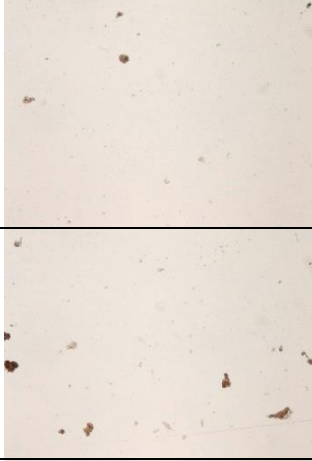
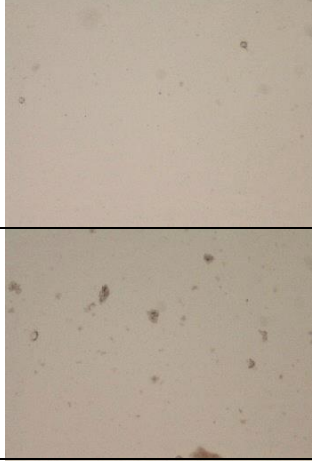
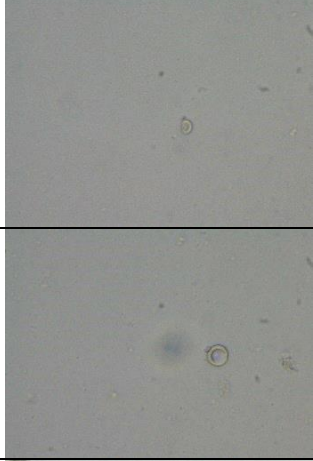
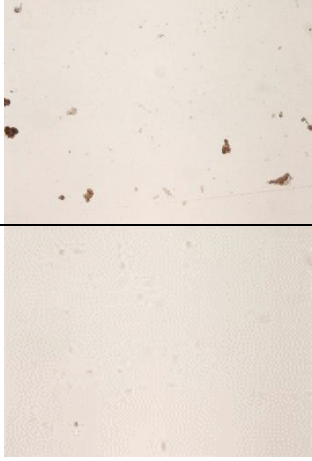
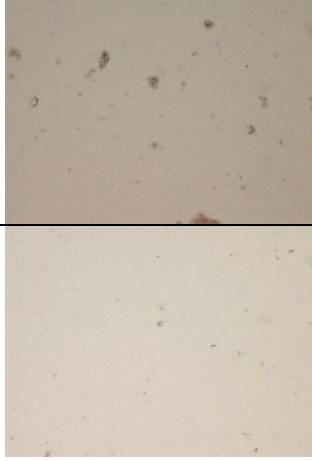
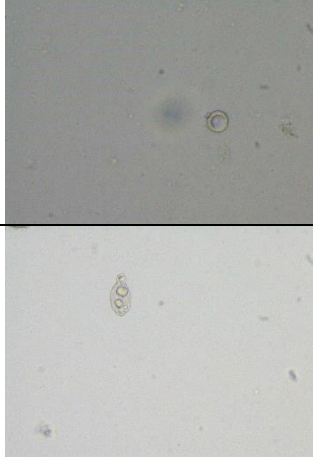

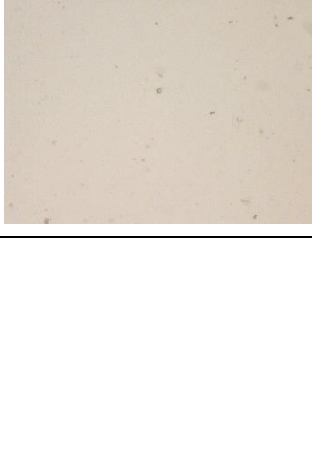
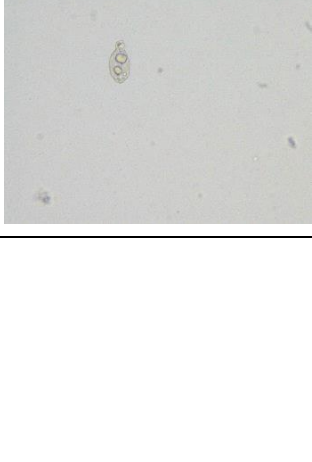
ERGOSTEROL					
T (°C)	P/Q	40X	100X	400X	
65	3				
85	3				
65	8				
85	8				
55	5,5				
95	5,5				

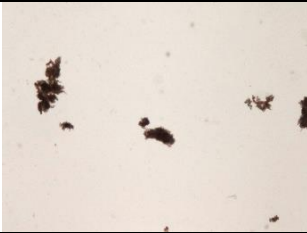
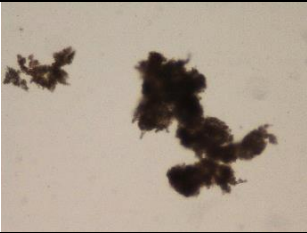








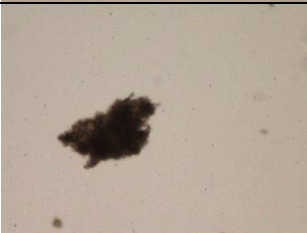
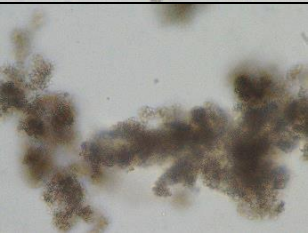

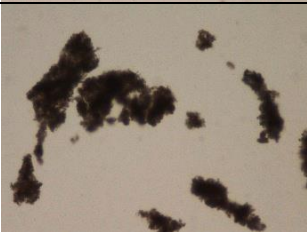
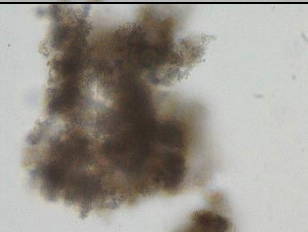
75	0,5			
75	10,5			
75	5,5			
75	5,5			
75	5,5			

A seguir são apresentadas as imagens obtidas da etapa da otimização da quantidade de ergosterol encapsulada (secção 4.3.3) para o ergosterol e para o extrato, respetivamente.

ERGOSTEROL (T=55°C e P/Q = 0,5)			
Erg (µg)	40X	100X	400X
675			
2700			
5400			
10800			
16200			
21600			

ERGOSTEROL (T=95°C e P/Q = 10,5)			
Erg (µg)	40X	100X	400X
675			
2700			
5400			
10800			
16200			
21600			

EXTRATO (T=55°C E P/Q = 0,5)			
Erg (µg)	40X	100X	400X
675			
2700			
5400			
10800			
16200			
21600			

EXTRATO (T=95°C E P/Q = 10,5)			
Erg (μg)	40X	100X	400X
675			
2700			
5400			
10800			
16200			
21600	