



Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

Franciely dos Santos de Oliveira

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

Orientado por

Maria Filomena Barreiro

Bogdan Demczuk Junior

Bragança

2015

Agradecimentos

A **DEUS**, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades.

À **MINHA FAMÍLIA**, por sua capacidade de acreditar em mim e investir em mim. Mãe, seu cuidado e dedicação foi o que deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Pai, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

Aos meus orientadores **PROF. DR^a FILOMENA BARREIRO e PROF. DR. BOGDAN DEMCZUK JUNIOR** pela oportunidade concedida, apoio e disponibilidade, e terem acreditado na minha competência para a elaboração desse projeto.

À **PROF. DR^a. ISABEL FERREIRA**, expresse meu profundo agradecimento por toda a colaboração, orientação, apoio e disponibilidade incondicionais que muito elevaram os meus conhecimentos e estimularam o meu desejo de querer sempre saber mais e fazer melhor, e pelos conselhos que me ajudaram muito nessa caminhada.

Ao nosso **GRUPO DE INVESTIGAÇÃO**, em especial ao **RICARDO CALHELHA, ISABEL FERNANDES, ÂNGELA FERNANDES, LILLIAN BARROS e JOÃO BARREIRA**, pela dedicação, apoio, atenção e ajuda proporcionada a nível laboratorial, o meu muito obrigada.

Aos **MEUS AMIGOS**, em especial **CAMILA BISSARO e BÁRBARA MARTINS**, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção melhoraram tudo o que tenho produzido na vida.

Ao **HENRIQUE OLIVEIRA**, um agradecimento especial por todo amor, apoio e carinho diários, pelas palavras doces, pelo companheirismo, paciência, pela transmissão de confiança e força, em todos os momentos, e ser capaz de me mostrar o lado bom em cada obstáculo que tive que enfrentar. Por tudo, com amor, a minha enorme gratidão!

Como já dizia **ANITELLI**: “Sonho parece verdade quando a gente esquece de acordar”. Hoje, vivo uma realidade que parece um sonho, mas foi preciso muito esforço, determinação, paciência, perseverança, ousadia e maleabilidade para chegar até aqui, e

nada disso eu conseguiria sozinha. Minha eterna gratidão a todos aqueles que colaboraram para que este sonho pudesse ser concretizado.

Índice

<i>Lista de figuras</i>	v
<i>Lista de tabelas</i>	vi
<i>Lista de Abreviaturas</i>	vii
<i>Resumo</i>	ix
<i>Motivação e objetivos</i>	11
<i>Estrutura da tese</i>	12
<i>1. Revisão Bibliográfica</i>	54
<i>1.1 Alimentos funcionais e/ou nutracêuticos</i>	17
<i>1.2. Compostos fenólicos como agentes quimiopreventivos</i>	18
<i>1.2.1 Quimioprevenção e Angiogênese</i>	18
<i>1.2.2 Compostos fenólicos com potencial antitumoral e/ou antiangiogénico</i>	21
<i>1.3. Microencapsulação</i>	23
<i>1.3.1 Microcápsulas</i>	25
<i>1.3.2 Materiais encapsulantes</i>	27
<i>1.3.3 Métodos de encapsulação</i>	32
<i>1.3.4 Aplicações da microencapsulação na indústria de alimentos</i>	35
<i>Fragaria vesca L.</i>	37
<i>2. Materiais e Métodos</i>	54
<i>2.1. Material vegetal</i>	41
<i>2.2. Solventes, reagentes e padrões</i>	41
<i>2.3. Preparação e caracterização do extrato de A. montana enriquecido em derivados de apigenina</i>	41
<i>2.4. Avaliação do potencial anti-angiogénico através de um ensaio de inibição enzimática da VEGFR-2</i>	42
<i>2.5. Microencapsulação do extrato de A. montana</i>	43
<i>2.6. Caracterização das microesferas</i>	45

<i>2.7. Incorporação do extrato hidroalcoólico de A. montana, livre e em microesferas, no iogurte</i>	46
<i>2.8. Análise nutricional dos iogurtes controlo e com extrato (livre e encapsulado)</i> 47	
<i>2.8.1. Macronutrientes e valor energético</i>	47
<i>2.8.2. Açúcares livres</i>	48
<i>2.8.3. Ácidos gordos</i>	49
<i>2.9. Análise estatística</i>	50
<i>3. Resultados e Discussão</i>	54
<i>3.1. Potencial anti-angiogénico do extrato de A. montana</i>	53
<i>3.2 Produção e caracterização das microesferas de alginato contendo o extrato de A. montana</i>	53
<i>3.4. Incorporação numa matriz alimentar</i>	55
<i>3.4.1. Valor nutricional dos iogurtes funcionalizados com extrato de A. montana</i>	55
<i>3.4.2. Avaliação do potencial anti-angiogénico dos iogurtes funcionalizados com extrato de A. montana</i>	58
<i>4. Conclusões e Trabalhos Futuros</i>	59
<i>5. Referência Bibliográfica</i>	54
<i>6. ANEXOS</i>	54

Lista de figuras

Figura 1 O desenvolvimento de novos vasos na angiogénese tumoral, adptado (Siemann, 2002).	20
Figura 2 Fotografia de amostras de <i>Arenaria montana L.</i> cedida por Ana Maria Carvalho (http://www.esa.ipb.pt/biochemcore/index.php/list-plants).....	23
Figura 3 Estrutura das micropartículas (adaptado de Silva et al., 2003).....	26
Figura 4 Estrutura representativa do ácido algínico com x unidades de ácido manurônico (M) e y unidades de ácido gulurônico (G).....	29
Figura 5 Cadeia polimérica de um alginato formada por blocos-M, blocos-G e blocos-MG.....	30
Figura 6 Esquema mostrando a interação dos blocos-G na presença de íons Ca ²⁺ , “egg-box model”. Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do cátion.	31
Figura 7 Imagem do sistema NiscoVar J30	44
Figura 8 Percentagem de inibição de VEGFR-2 em função da concentração de extrato de <i>A. montana</i>	53
Figura 9 Microscopia óptica das microcápsulas ao longo do processo de microencapsulação: Microesferas A- depois de ter sido atomizado (tempo inicial do processo de coagulação); B- Microesferas após a coagulação; C- Microesferas após liofilização (forma de armazenamento).....	55

Lista de tabelas

Tabela 1 Exemplos de agentes encapsulantes usados na microencapsulação de acordo com a sua origem (adaptado de Anson, 2005).....	28
Tabela 2 Aplicações e funcionalidade do alginato (adaptado de Draget e Taylor, 2011).	32
Tabela 3 Métodos utilizados na elaboração das microcápsulas (adaptado de Suave et al., 2006).	33
Tabela 4 Exemplos de microencapsulação de princípios ativos contendo extratos fenólicos com interesse na área alimentar.	37
Tabela 5 Tempos de retenção (Rt), área, identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato de <i>A. montana</i>	47
Tabela 6 Valor nutricional dos iogurtes controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 3 dias de armazenamento (média \pm DP).....	57
Tabela 7 Ácidos gordos maioritários e os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados das amostras de iogurte controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e passados 3 dias de armazenamento (média \pm DP).	57
Tabela 8 Aumento percentual do potencial anti-angiogénico das amostras de iogurte funcionalizadas com extrato de <i>A. montana</i> em relação ao controlo.	58

Lista de Abreviaturas

am	Amostra
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação de comunidades analíticas (<i>association of analytical communities</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina
BRESA	Herbário da escola superior agrária de bragança
DAD-	Detector de díodos
DNA-	Ácido desoxirribonucleico
DP-	Desvio padrão
E	Energia
EE	Eficiência de encapsulação
EUA	Estados unidos da américa
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FDA	Administração federal de alimentos e medicamentos (food and drug administration)
GRAS	Geralmente reconhecidos como seguros (generaly regarded as safe)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
m/m	Relação massa/massa
m/v	Relação massa/volume
m_g	Massa de gordura
m_{hc}	Massa de hidratos de carbono
MIC	Microesferas
MO	Microscopia ótica
m_p	Massa de proteína
Mp.a.i.	Massa princípio ativo teórico
Mp.a.ne	Massa princípio ativo não encapsulado
MTPT	1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
n.a.	Não aplicável

p. ex.	Por exemplo
p.a	Princípio ativo
PI	Padrão interno
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
ROS	Espécies reativas de oxigênio
rpm	Rotações por minuto
Rt-	Tempo de retenção
SD	Desvio padrão
SUFA	Ácidos gordos saturados
UV	Radiação ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
VEGF	Fator de crescimento endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor)
VEGF-R-2	Receptor do Fator de Crescimento Endotelial (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor)
w/v	Relação massa/volume

Resumo

A quimioprevenção é um conceito muito atual e contempla a utilização de medicamentos, compostos biológicos ou nutrientes como estratégia de intervenção na prevenção do cancro (i.e. inibir, retardar ou reverter a carcinogénese). São numerosos os estudos que têm atribuído efeito quimiopreventivo aos flavonoides, sendo estes os compostos fenólicos maioritários em diversas plantas. Levando em conta os benefícios que são capazes de proporcionar para a saúde humana, estes assumem grande relevância na indústria alimentar, apresentando elevado potencial de serem utilizados no desenvolvimento de alimentos funcionais. Contudo uma restrição ao seu uso, consiste na sua grande instabilidade podendo sofrer alterações durante o processamento dos alimentos onde são incorporados. Neste contexto, a microencapsulação possibilita a proteção destes quimiopreventivos naturais, permitindo ainda a sua libertação controlada. Assim, este trabalho teve como objetivo selecionar um extrato natural rico em flavonoides, estudar a sua microencapsulação numa matriz polimérica de origem natural (alginato) e posterior incorporação das microcápsulas produzidas numa matriz alimentar selecionada (iogurte). A capacidade quimiopreventiva do alimento funcional produzido foi avaliada pelo seu potencial anti-angiogénico. Em específico, foi preparado um extrato hidroetanólico de *Arenaria montana* que, após caracterização por HPLC-DAD, mostrou ser rico em derivados de apigenina. O mesmo extrato revelou capacidade de inibição da fosforilação da VEGFR-2, enzima envolvida em processos de angiogénese. A microencapsulação do referido extrato pela técnica de atomização/coagulação usando alginato como material de encapsulação foi aplicada com sucesso obtendo-se eficiências de encapsulação próximas de 100%. Os iogurtes funcionalizados com extrato de *A. montana* (livre e encapsulado) mostraram um valor nutricional similar ao controlo (iogurte não enriquecido), mas um aumento do potencial anti-angiogénico (inibição da fosforilação da VEGFR-2) que foi mais preservado no extrato protegido.

Abstract

Chemoprevention is a very recent concept and refers to the use of medicines, biological compounds or nutrients as a strategy of intervention in cancer prevention (i.e. inhibit, delay or reverse carcinogenesis). Several studies have attributed chemopreventive effect to flavonoids, ascribed as the most abundant phenolic compounds in various plants. Considering their health benefits, these compounds are of great importance in the food industry, namely in the development of functional foods. However, these compounds might possess a remarkable instability, and might change during food processing in which they are incorporated. In this context, microencapsulation provides protection of these natural chemopreventive agents, allowing also their controlled release. This work aimed at selecting a natural extract rich in flavonoids, and to study its microencapsulation in polymeric matrices of natural origin (alginate) and subsequent incorporation of the produced microcapsules in a selected food matrix (yogurt). The chemopreventive capacity of the obtained functional food was evaluated by its antiangiogenic potential. In particular, a hydroethanolic extract of *Arenaria montana* was prepared, which after HPLC-DAD characterization, proved to be rich in apigenin derivatives. This extract revealed capacity to inhibit the phosphorylation of VEGFR-2, an enzyme involved in the angiogenesis process. The encapsulation of the mentioned extract by an atomization/coagulation technic using alginate as the encapsulation material was carried out successfully by achieving encapsulation efficiencies close to 100%. The yogurts functionalized with *A. montana* extracts (free and encapsulated) showed a nutritional value similar to the control (non-enriched yogurt), but an increase in the antiangiogenic potential (inhibition of VEGFR-2 phosphorylation), which was more preserved in the protected extract.

Motivação e objetivos

O binômio dieta-saúde representa um novo paradigma na ciência e tecnologia dos alimentos. Neste contexto, surge a percepção de que uma alimentação adequada exerce um papel, que além do fornecimento de energia e nutrientes essenciais, é identificada também pela promoção de efeitos fisiológicos benéficos, podendo prevenir ou retardar doenças. Mas o que poucas pessoas têm conhecimento é que certas substâncias que compõem determinados alimentos, chamados nutracêuticos ou funcionais, podem prevenir e até mesmo tratar vários tipos de doenças. Neste contexto, e atendendo a que o cancro é uma doença com uma incidência crescente na população mundial, aumenta o interesse em estudar alimentos funcionais que possuam propriedades quimiopreventivas, nomeadamente pela utilização de matrizes lácteas, que têm vindo a demonstrar uma grande aceitação por parte dos consumidores.

No âmbito do desenvolvimento de alimentos funcionais, os extratos de origem natural, em oposição aos compostos de origem química, têm ganho um interesse crescente. Neste contexto, os extratos ricos em flavonoides, nomeadamente derivados de apigenina, tal como reportado na literatura, apresentam um elevado potencial para serem incorporados em alimentos com propriedades quimiopreventivas. Contudo, a preservação destas propriedades benéficas nem sempre é simples, sendo necessário recorrer a técnicas de proteção tais como processos de microencapsulação/estabilização, que são hoje em dia cada vez mais estudados e aplicados no desenvolvimento de novos produtos.

Este trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um alimento funcional com características quimiopreventivas por incorporação de extratos vegetais ricos em flavonoides.

Os objetivos específicos foram:

- Selecionar um extrato vegetal rico em flavonoides, em particular derivados de apigenina, e avaliar o seu potencial quimiopreventivo; nesse sentido, foi selecionada a planta *Arenaria montana* L. para obtenção dos extratos que foram

avaliados pelo seu potencial anti-angiogénico através de um ensaio de inibição enzimática da VEGFR-2;

- Estudar a sua microencapsulação em matrizes poliméricas de origem natural; nesse sentido foi selecionada uma técnica de encapsulação por atomização/coagulação e utilizou-se o alginato como material encapsulante.
- Incorporar as microcápsulas produzidas numa matriz alimentar previamente selecionada e fazer a comparação com a utilização dos extratos na sua forma livre (não-encapsulada); para o efeito escolheu-se uma matriz alimentar láctea (iogurte) por pertencer a um grupo de alimentos com boa aceitação pelos consumidores no campo dos alimentos funcionais e realizaram-se estudos comparativos englobando um controlo (iogurte não aditivado) e amostras de iogurte aditivados com o extrato livre e microencapsulado;
- Avaliar a capacidade quimiopreventiva do alimento funcional produzido através do seu potencial anti-angiogénico, com determinação concomitante do seu valor nutricional

Estrutura da tese

Este trabalho encontra-se dividido em 4 capítulos principais. O primeiro capítulo designado por “*Revisão Bibliográfica*”, inclui uma revisão da literatura sobre os principais temas em estudo: (i) extratos naturais ricos em flavonoides com interesse para o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas e (ii) técnicas de microencapsulação aptas a proporcionar proteção aos extratos selecionados.

No segundo capítulo “*Materiais e Métodos*” descrevem-se os principais materiais utilizados no decorrer dos ensaios bem como as metodologias experimentais de síntese e caracterização utilizadas.

No capítulo “*Resultados e Discussão*” apresentam-se os principais resultados experimentais seguidos da análise e discussão dos mesmos.

Por fim, no último capítulo intitulado por “*Conclusão e Trabalho Futuro*”, realizam-se as considerações finais ao trabalho, sintetizando os principais resultados obtidos na realização do mesmo. Adicionalmente, e numa perspectiva de continuidade deste trabalho, são apresentadas propostas para sugestões de trabalho futuro.

No final encontram-se os Anexos. Inclui nesta secção um trabalho publicado em conferência e selecionado para a apresentação em pôster.

1. Revisão Bibliográfica

1.1 Alimentos funcionais e/ou nutracêuticos

As evidências epidemiológicas têm apontado para a necessidade de a população começar a mudar os hábitos alimentares, visando incrementar a qualidade de vida e diminuir a incidência de doenças ligadas a uma alimentação inadequada. O aparecimento e aumento da incidência de doenças crônicas na população mundial, tais como a obesidade, a hipertensão, a arteriosclerose, a diabetes, o cancro e a osteoporose, vem impressionando os órgãos públicos de saúde, na medida em que reduzem a expectativa de vida e/ou aumentam os gastos públicos com internamentos ou outras ações curativas (Moraes & Colla, 2006). Contudo, surge agora uma nova consciência, especialmente entre os consumidores, visando melhorar a sua qualidade de vida e reduzir tanto os danos na saúde, assim como os gastos com tratamentos. Essa situação tem contribuído para o desenvolvimento e aumento do uso dos alimentos funcionais e dos nutracêuticos (Anjo, 2004).

Os alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos que proporcionam benefícios para a saúde, inclusive na prevenção e no tratamento de doenças. Juntamente com os nutracêuticos, esses produtos variam de nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados até alimentos processados e derivados de plantas (Anjo, 2004).

Para considerar um alimento funcional é necessário levar alguns parâmetros em consideração. Para Borges (2001), eles devem ser capazes de exercer um efeito metabólico ou fisiológico que atribua pontos positivos para a saúde física e para a redução do risco de desenvolvimento de doenças crônicas. Assim, devem fazer parte da alimentação usual e proporcionar efeitos positivos, obtidos a partir de quantidades não tóxicas e que mantenham o seu efeito mesmo após a suspensão da ingestão. Não devem tratar ou curar doenças, estando seu papel ligado à redução do risco de contrair doenças (efeito quimiopreventivo).

Um alimento nutracêutico é um alimento ou parte deste que proporciona benefícios médicos e de saúde, que incluem prevenção e/ou tratamento da doença. Podem ser nutrientes isolados, suplementos dietéticos, produtos herbais e alimentos processados como cereais, sopas e bebidas, ou até estar na forma de cápsulas (Kwak & Jukes, 2001). Os nutracêuticos podem ser classificados em fibras dietéticas, ácidos

gordos polinsaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas e outros antioxidantes (Andlauer & Fürst, 2002).

Ao mesmo tempo que a prevenção de doenças e a redução do risco das mesmas são atribuídas aos alimentos funcionais, aos nutracêuticos são atribuídas a prevenção e o tratamento de doenças (Kwak & Jukes, 2001). Desta forma, pode-se dizer que os nutracêuticos incluem os suplementos dietéticos e outros tipos alimentares, enquanto que os alimentos funcionais apresentam-se sob a forma de alimento comum (Anjo, 2004).

As plantas são uma fonte natural de compostos bioativos eficazes, que podem levar ao desenvolvimento de nutracêuticos e fármacos com ação anti-inflamatória, digestiva, antinecrótica, neuroprotetora e hepatoprotetora, podendo envolver um mecanismo antioxidante e/ou captador de radicais livres (Loziene et al., 2007).

Uma ingestão elevada de alimentos ricos em antioxidantes naturais aumenta a capacidade antioxidante do plasma e reduz o risco de alguns tipos de cancro, doenças cardiovasculares e acidente vascular cerebral (Hassimoto et al., 2009; Justesen & Knuthsen, 2001). Estas propriedades são atribuídas a vários constituintes, incluindo vitaminas e numerosos fitoquímicos, principalmente compostos fenólicos como os flavonoides (Hassimoto et al., 2009; Justesen & Knuthsen, 2001). Os compostos antioxidantes podem funcionar ou atuar contra as espécies reativas de oxigénio (ROS) de maneira diferenciada tendo uma ação quelante e/ou captadora dos radicais antes da ocorrência de danos em qualquer parte do organismo; após estes danos, podem também funcionar como reparadores dos tecidos (Niki, 2010).

1.2. Compostos fenólicos como agentes quimiopreventivos

1.2.1 Quimioprevenção e Angiogénese

O conceito de quimioprevenção aplicado a processos cancerígenos está relacionado com a utilização de substâncias químicas ou biológicas para inibir ou retardar o desenvolvimento de neoplasias, bloqueando o início neoplásico, bem como

invertendo a progressão de células transformadas antes do aparecimento de lesões malignas (Gupta, 2007).

A abordagem mais racional para a quimioprevenção do cancro é projetar e testar novos agentes que atuam em alvos moleculares e celulares específicos (Gupta, 2007)

Existem pelo menos duas estratégias para o desenvolvimento de protocolos quimiopreventivos. Uma delas pela identificação de agentes dietéticos naturais através de estudos epidemiológicos que demonstrem o seu efeito na incidência e mortalidade associada ao cancro, e que se reflitam nas variações geográficas e de migração associadas a mudanças nos hábitos alimentares e de estilo de vida. A segunda abordagem baseia-se no *design* e síntese de agentes baseados em alvo moleculares. Estas abordagens requerem o isolamento, caracterização e avaliação pré-clínica dos agentes a serem utilizados como agente quimiopreventivo (Lippman, 2002).

As neoplasias malignas são, depois das doenças cardiovasculares, a segunda causa mais comum de morte nos países industrializados, e a disseminação metastática é a responsável pelo fracasso da terapêutica. A angiogénese induzida pelo tumor proporciona disseminação vascular e dispersão neoplásica, além de possibilitar a nutrição das células malignas (Lippman, 2002). Desta forma, o crescimento tumoral contínuo e o desenvolvimento de metástases depende de um passo crucial: a angiogénese.

A angiogénese é o processo através do qual novos vasos sanguíneos se formam e crescem. A angiogénese é uma função fisiológica natural, que pode ser subvertida por células cancerosas para satisfazer sua crescente necessidade de nutrientes e oxigénio, favorecendo o crescimento do tumor. O processo angiogénico, como entendido atualmente, pode ser resumido da seguinte forma: uma célula ativada por uma falta de oxigénio (ou mutação) liberta, entre outras coisas, fatores angiogénicos que atraem as células inflamatórias e endoteliais promovendo a sua proliferação. No decurso da sua migração, as células inflamatórias secretam substâncias adicionais que intensificam a chamada angiogénese. As células endoteliais que formam os vasos sanguíneos existentes respondem a sinais angiogénicos na sua proximidade por proliferação e secretam proteases, que fragmentam as paredes dos vasos sanguíneos para que possam migrar para o local dos estímulos angiogénicos (Figura 1). A proliferação das células endoteliais permite a organização de novos tubos capilares, alterando o arranjo das

Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

proteínas de adesão membranas. Por fim, através do processo de anastomose, os capilares que provêm das arteríolas e das vénulas juntam-se para proporcionar um fluxo sanguíneo contínuo que sustente o metabolismo das células do tumor e configure meios para a metastização de células (Siemann, 2002; Siemann, 2002).

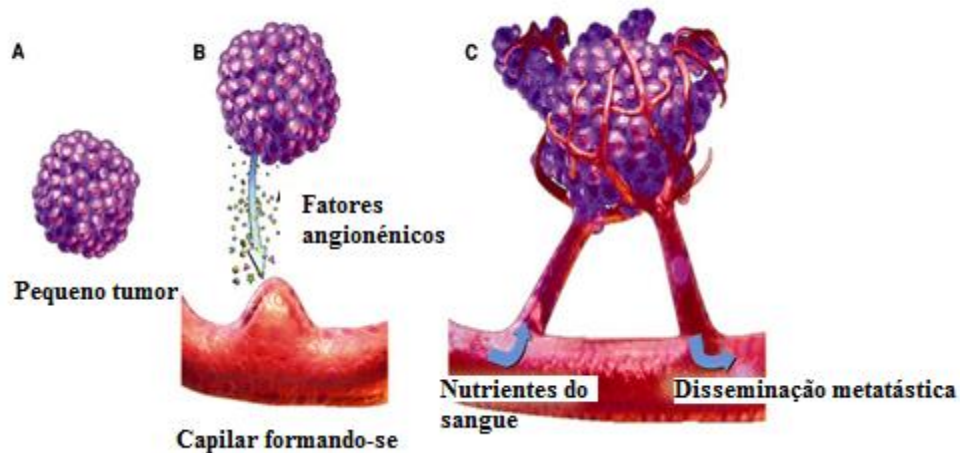


Figura 1 O desenvolvimento de novos vasos na angiogênese tumoral, adaptado (Siemann, 2002).

Angiogênese excessiva ocorre quando células doentes produzem anormalmente grandes quantidades de factores de angiogênese [ex factor de crescimento endotelial vascular (VEGF)] (Fan et al., 2006). Este processo é mediado pelo VEGF, envolvido na permeabilidade vascular indutor de proliferação celular endotelial, e pelo seu receptor de membrana tirosina-cinase VEGFR-2 (também conhecido como KDR) (Soares et al., 2013).

Após o estabelecimento da ligação, o VEGFR-2 sofre auto fosforilação, desencadeando as vias de sinalização que conduzem à proliferação das células endoteliais e subsequente angiogênese. Um agente quimiopreventivo pode competir com o ATP para a seu local de ligação no domínio intracelular do VEGFR-2, impedindo as vias de sinalização que conduzem à angiogênese. Assim, compostos de massa molecular baixa têm emergido como agentes anti-angiogênicos promissores na prevenção de vários tipos de cancro (Soares et al., 2013).

Uma dieta rica em frutas e vegetais inclui várias substâncias com potencial quimiopreventivo no desenvolvimento do cancro nomeadamente, vitaminas,

carotenoides e outras moléculas com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Os compostos fenólicos, incluindo flavonoides, são outras das moléculas conhecidas por reduzir o risco de vários tipos de cancro (Kris-Etherton et al., 2002).

1.2.2 Compostos fenólicos com potencial antitumoral e/ou antiangiogénico

Os compostos fenólicos são compostos aromáticos hidroxilados, que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo. Acumulam-se como produtos finais a partir das vias do chiquimato e acetato, podendo variar entre moléculas relativamente simples (ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides) e compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas, taninos) (Bravo, 1998).

Soares (2002) propôs a seguinte classificação para estes compostos: (i) pouco distribuídos na natureza e (ii) largamente distribuídos na natureza: Na família dos compostos fenólicos pouco distribuídos na natureza estão os fenóis simples, o pirocatecol, a hidroquinona e o resorcinol. A esta família também pertencem os aldeídos derivados dos ácidos benzoicos, que são constituintes dos óleos essenciais como a vanilina. Na família dos compostos largamente distribuídos na natureza estão os fenólicos encontrados geralmente em todo o reino vegetal, podendo às vezes, estar localizados numa só planta. Estes fenólicos estão divididos em dois grandes grupos: os flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos (ácidos benzoico, cinâmico e seus derivados) e cumarinas.

Em particular os flavonoides são uma família de compostos polifenólicos, possuindo uma estrutura semelhante e sintetizados pelas plantas. Encontram-se divididos em subclasses, incluindo as antocianidinas, flavanoles, flavanonas, flavonóis, flavonas e isoflavonas. A estes compostos têm sido atribuídas várias propriedades benéficas, incluindo anti-alérgicas, antiespasmódicas, antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias, anti-estrogénicas e hepatoprotetoras e, com maior relevo para este trabalho, as anticancerígenas (Patel et al., 2007; Zhang et al., 2005; Havsteen, 2002; Middleton et al.)

Os flavonoides têm-se mostrado eficientes na neutralização de várias moléculas oxidantes, incluindo o oxigénio singlete e vários radicais livres que podem estar envolvidos em danos no DNA e na indução de tumores (Wright et al., 2001).

Alguns flavonoides apresentam atividades anticancerígenas e inibidoras do crescimento de células tumorais *in vitro*. Podem interagir com enzimas do metabolismo xenobiótico, possuir efeitos anti-iniciadores e/ou antipromotores, e ser, inclusive, citostáticos (Bruneton, 2001). Os flavonoides, tais como a naringina, nobiletina e hesperitina demonstraram já um efeito anticancerígeno por paragem do ciclo celular e indução de apoptose em linhas celulares humanas (Park et al., 2012; Kim et al., 2008; Luo et al., 2008).

Alguns estudos reconhecem os compostos fenólicos como agentes quimiopreventivos; os flavonoides parecem suprimir o crescimento de células tumorais modificando o ciclo celular e induzindo a apoptose em diversas linhagens de células tumorais (Kandaswami et al., 2005). Em particular, o efeito anti-angiogénico da apigenina (Osada et al., 2004) em células tumorais tem sido relatado na literatura e relacionado com a diminuição na VEGF.

Efetivamente, a apigenina tem suscitado um interesse considerável como agente quimiopreventivo. Trata-se de uma 4', 5, 7 -tri-hidroxi-flavona com a fórmula molecular $C_{15}H_{10}O_5$ (Patel et al., 2007). Tem a vantagem de apresentar baixa toxicidade para células normais, em comparação com outros flavonoides estruturalmente relacionados (Cheung et al., 2008)

Na natureza, a apigenina existe também como um dímero, a biapigenina, sendo esta forma isolada principalmente a partir dos botões e flores do *Hypericum perforatum* L., apresentando estes efeitos neuroprotetores (Cheung et al., 2008). A apigenina é também abundante em frutas comuns, tais como toranja e laranja, bebidas de origem vegetal, como por exemplo infusões, nomeadamente camomila, legumes como a salsa e a cebola, brotos de trigo, alguns condimentos, vinho tinto e cerveja fabricada a partir de ingredientes naturais (McKay & Blumberg, 2006). Em fontes naturais está presente como apigenina-7-*O*-glucósido e vários derivados acilados. O grupo de investigação BioChemCore (www.esa.ipb.pt/biochemcore), liderado pela Prof. Isabel C.F.R. Ferreira, reportou recentemente que a planta silvestre *Arenaria montana* L. (Figura 2) é uma importante fonte de derivados de apigenina (Pereira et al., 2014) e, nesse sentido,

Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

pode ser uma espécie interessante a explorar como fonte de agentes quimiopreventivos antitumorais e/ou antiangiogénicos.



Figura 2 Fotografia de amostras de *Arenaria montana* L. cedida por Ana Maria Carvalho (<http://www.esa.ipb.pt/biochemcore/index.php/list-plants>).

1.3. Microencapsulação

Os primeiros registos sobre microencapsulação datam da década de 1930, sendo esta técnica amplamente estudada na atualidade e utilizada em diversas áreas industriais. Estas integram a área farmacêutica, química, agroquímica e alimentar; onde se podem citar exemplos de encapsulação de células vivas como os microrganismos probióticos e enzimas, de compostos voláteis responsáveis pelo aroma e sabor dos alimentos, de acidulantes, corantes, lipídios, vitaminas e minerais. Como resultado da aplicação de técnicas de microencapsulação, muitos produtos que foram considerados tecnicamente inviáveis no passado, são agora possíveis (Fang & Bhandari, 2010).

A técnica de microencapsulação consiste no acondicionamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, com dimensões que variam entre 0,2 e 5000 μm (Favaro-Trintade et al., 2008; Nedovic et al., 2011). Tem como objetivo principal proteger o material encapsulado de condições adversas, tais como a luz, humidade e atmosfera oxidativa, contribuindo assim para o aumento e manutenção da sua estabilidade. Tal deve-se à capacidade que as microcápsulas apresentam de reduzir a taxa de evaporação e de transferência de material do núcleo para o ambiente, modificando adicionalmente as características físicas do material,

facilitando seu manuseio e proporcionado a liberação controlada do material encapsulado (Schrooyen et al., 2001; Fang & Bhandari, 2010).

De acordo com Nedovic et al. (2011), esta técnica é aplicada no setor alimentar, com vários propósitos, nomeadamente:

1. Melhorar as propriedades do material encapsulado, mascarando as características organolépticas desagradáveis (sabores, odores e cor) de alguns materiais;
2. Possibilitar a otimização de formulações no que se refere à modulação da liberação da substância a encapsular;
3. Estabilizar a substância a encapsular, evitando as reações de degradação decorrentes das condições adversas ao longo do trato gastrointestinal (pH e enzimas);
4. Reduzir efeitos adversos provocados pela presença de outras substâncias na formulação (p.ex. substâncias que possam reagir com os princípios ativos de interesse);
5. Diminuir a toxicidade do composto bioativo;
6. Controlar a biodisponibilidade;
7. Proteger os compostos voláteis, impedindo a sua perda;
8. Proteger as substâncias dos agentes atmosféricos (luz, humidade, calor e oxigénio).

Na indústria alimentar, a utilização da microencapsulação tem vindo a ser intensificada devido aos novos desafios que surgem no desenvolvimento de novas formulações que procuram responder às necessidades/desejos dos consumidores; muitas vezes, de extrema complexidade. Uma dessas necessidades consiste na obtenção de liberação controlada (Ubbink & Krueger, 2006). Dessa forma, a microencapsulação deixa de ser somente um método de agregar substâncias a uma formulação alimentar, para tornar-se numa fonte de ingredientes totalmente novos e com propriedades únicas (Anekella & Orsat, 2013).

Há uma tendência mundial que aponta para a necessidade de que os alimentos não sejam mais somente vistos como uma fonte de nutrientes com apelo sensorial, mas também como fonte de bem-estar e de saúde para os indivíduos. Esta mudança de

perspectiva requer, indiscutivelmente, mudanças de paradigma no desenvolvimento de novos produtos, aplicando-se os métodos tradicionais, mas também se observando a necessidade do controle da bioacessibilidade de determinados componentes dos alimentos. Esta abordagem se torna cada vez mais relevante conforme se estabelecem as relações entre genética, alimentação e saúde (Sanguansri & Augustin, 2006), e a microencapsulação é um meio efetivo de se alcançar tais objetivos.

Vale a pena ressaltar, entretanto, que comparativamente às outras indústrias, como farmacêutica, agroquímica e cosmética, o desenvolvimento de produtos contendo ingredientes ativos é geralmente mais desafiador na indústria alimentar (Ubbink & Krüger, 2006). Para tal segmento, as qualidades sensoriais não devem ser comprometidas pela adição de ingredientes encapsulados, e as matrizes alimentares são normalmente muito mais complexas que os meios usados na indústria farmacêutica e na cosmética para introdução dos bioativos encapsulados no corpo (intravenosa, cutânea, muscular, ocular, pulmonar, por exemplo). Deve-se lembrar também que, como serão sempre ingeridos via oral, os ingredientes encapsulados podem ter que resistir às condições do trato gastrintestinal, ou ainda, o material de parede pode possuir propriedades mucoadesivas (Favaro-Trintade et al., 2008)

O estudo da microencapsulação de compostos bioativos, como por exemplo compostos fenólicos provenientes de extratos naturais, não é muito corrente, sendo encontrados, principalmente, trabalhos referentes à microencapsulação de compostos purificados ou sintetizados em laboratório. Estes estudos abordam temas como, elaboração e caracterização das microcápsulas, eficiência de encapsulação, taxa de libertação, estabilidade dos compostos encapsulados e da sua atividade antioxidante durante o armazenamento, sendo escassos estudos em relação à aplicação em alimentos, nomeadamente no que respeita ao desenvolvimento de produtos finais (alimentos funcionais).

1.3.1 Microcápsulas

Existem diferentes morfologias de micropartículas. Pode dizer-se que estas são formadas por um núcleo (líquido, ou sólido), contendo o ingrediente ativo e uma parede, normalmente polimérica, que confina o ingrediente ativo, controla sua

libertação e protege o material de efeitos nocivos. Em alternativa podem ser constituídos por uma matriz onde ingrediente ativo está disperso. Utilizando uma terminologia cientificamente mais correta as primeiras designam-se por microcápsulas e as segundas por microesferas. Todavia, é muito comum utilizar correntemente o termo microcápsula para os dois tipos de estruturas. As micropartículas são pequenas partículas esféricas sólidas com tamanho que varia entre 1 e 1000 μm . De uma forma mais abrangente as microcápsulas e microesferas podem subdividir-se em outras classes tal como apresentado na Figura 3 (Silva et al., 2003).

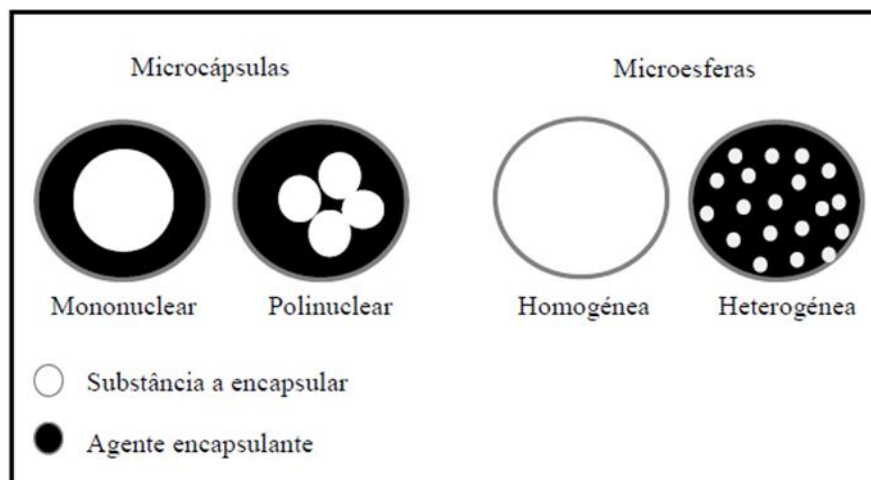


Figura 3 Estrutura das micropartículas (adaptado de Silva et al., 2003).

Ampliando a definição de micropartículas para incluir as nanopartículas, partículas semelhantes às anteriores mas com dimensões inferiores (de 10 a 1000 nm) que caracterizam um sistema coloidal, devemos adicionar na classificação das micropartículas os lipossomas e as emulsões lipídicas, também conhecidas por microesferas lipídicas. Contudo, estes sistemas não satisfazem totalmente a definição pelo fato de não serem sólidos: um é semissólido e outro é líquido (Azeredo, 2008).

Levando em conta sua dimensão, as cápsulas são classificadas como nanopartículas ou micropartículas, variando de 0,01 a 0,2 μm e de 1 a 100 μm , respetivamente. Acima de 100 μm elas são denominadas de macropartículas (Santos et al., 2000).

As microcápsulas são empregadas em diferentes setores da indústria onde podem desempenhar múltiplas funções. A proteção atribuída pela parede polimérica das

microcápsulas aumenta o tempo de vida útil de um composto volátil, ou seja, o tempo de prateleira de muitos ingredientes alimentares e cosméticos é ampliado. A microencapsulação é de grande interesse para a indústria de alimentos, pois aumenta a estabilidade de óleos, aromatizantes, vitaminas, etc. Gouin (2004) relata que a indústria de alimentos espera diversificar as propriedades dos ingredientes alimentares sendo tal conseguido maioritariamente à custa de da microencapsulação. Com base nas suas características inovadoras estes ingredientes podem ser designados por ingredientes funcionais.

As microcápsulas podem ser desenvolvidas com o objetivo de obter uma libertação gradual de ingredientes ativos, sendo que o material de revestimento da cápsula pode ser selecionado para libertar o material microencapsulado em alvos específicos do organismo. O material de revestimento, no caso de um ingrediente a ser utilizado na indústria alimentar, deve ser capaz de resistir às condições ácidas no estômago, permitindo-lhes atravessar esta zona do aparelho digestivo de maneira intacta (Champagne, 2011). Este aspeto tem particular interesse para ingredientes que beneficiem da sua libertação no intestino. Um exemplo de um material encapsulante com estas características é o alginato.

1.3.2 Materiais encapsulantes

Um dos principais fatores que influencia a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (Suave et al., 2006), sendo a sua escolha um parâmetro importante quando se quer desenhar um novo processo de encapsulação.

A escolha do material encapsulante é realizada em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas. Segundo Santos et al. (2000), o material encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo de produtivo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter capacidade de selar e manter o material ativo dentro da estrutura da cápsula; libertar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de

Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo frente a condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de libertação do material ativo; não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral; e ser econômico. Na Tabela 1 estão referenciados alguns exemplos de agentes encapsulantes classificados de acordo com a sua origem.

Tabela 1 Exemplos de agentes encapsulantes usados na microencapsulação de acordo com a sua origem (adaptado de Anson, 2005).

Tipos de agentes encapsulantes	Exemplos
Naturais	Gelatina, goma, agar-agar, alginato de sódio, alginato de cálcio, dextrano, quitosano, caseinato, sacarose e cera.
Semi-Sintéticos	Acetato de celulose, nitrato de celulose, etilcelulose, hidroxipropilcelulose, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio, álcool mirístico, gliceril mono ou dipalmitato, mono di e triestearato de glicerol.
Sintéticos	Polímeros do ácido acrílico e co-polímeros

A seleção do material de parede a ser utilizado para a encapsulação envolve muitas vezes procedimentos de tentativa e erro que ficam caros e são demorados procurando alcançar vários critérios, entre os quais: eficiência de encapsulação, estabilidade durante o armazenamento, grau de proteção do material do núcleo e características microscópicas da superfície (Pérez- Alonso, 2003).

Os materiais encapsulantes devem ainda atender os seguintes requisitos: boa capacidade de formação de filme; baixa higroscopicidade; baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos (menos que 0,5 Pa.s em concentrações superiores a 45%); sabor e odor suaves; fácil reconstituição e baixo custo. Muitas vezes, pelo fato de um mesmo composto não englobar todas essas propriedades, usam-se misturas (Azerdo, 2008).

Na indústria alimentar, é comum adicionar aos alimentos diversos materiais incluindo amidos (milho, mandioca e arroz), amidos modificados, maltodextrinas, goma arábica, ciclodextrinas e xaropes de milho, para minimizar a perda de

compostos ativos, além de atuar como agentes de encapsulação para melhor ou modificar a composição física e química de um produto (Azeredo, 2008).

Também têm sido extensivamente usados os polímeros naturais tais como o alginato e o quitosano. Os alginatos são polissacarídeos naturais, extraídos de algas e de algumas bactérias, são biodegradáveis, biocompatíveis e atóxicos (Paques, et al., 2014).

1.3.2.1 Alginato

Muitos trabalhos têm explorado o potencial do alginato de sódio como material encapsulante, dado este ser um polímero natural, de fácil obtenção, biocompatível e biodegradável, que não necessita utilização de solventes orgânicos (é solúvel em água) e nem condições rigorosas de temperatura para a formação das micropartículas, além de ter um relativo baixo custo (Schoubben et al., 2010).

O ácido algínico é um polissacarídeo linear composto por dois ácido urônicos, β -*D*-manurônico (M) e o ácido α -*L*-gulurônico (G), ocorrendo na parede celular de algas marinhas normalmente na forma de um sal misto de cálcio, magnésio, sódio e potássio, representados na Figura 4, unidos por ligações glicosídicas 1 \rightarrow 4 em três tipos de segmentos poliméricos: um consiste essencialmente de unidades de ácido *D*-manurônico, blocos M; o segundo de unidades de ácido *L*-gulurônico, blocos G; e o terceiro consiste de uma alternância destas unidades, blocos-MG (Goh et al., 2012).

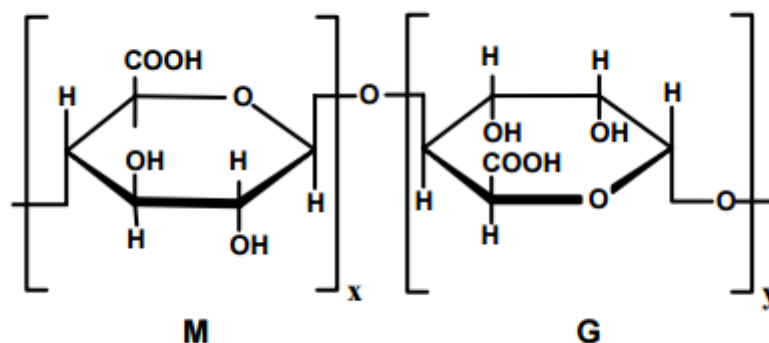


Figura 4 Estrutura representativa do ácido algínico com x unidades de ácido manurônico (M) e y unidades de ácido gulurônico (G).

Devido à orientação das ligações glicosídicas, as regiões da cadeia nas quais predominam blocos-M adquirem forma linear, enquanto as regiões onde predominam blocos-G adquirem forma ondulada, como representado na Figura 5.

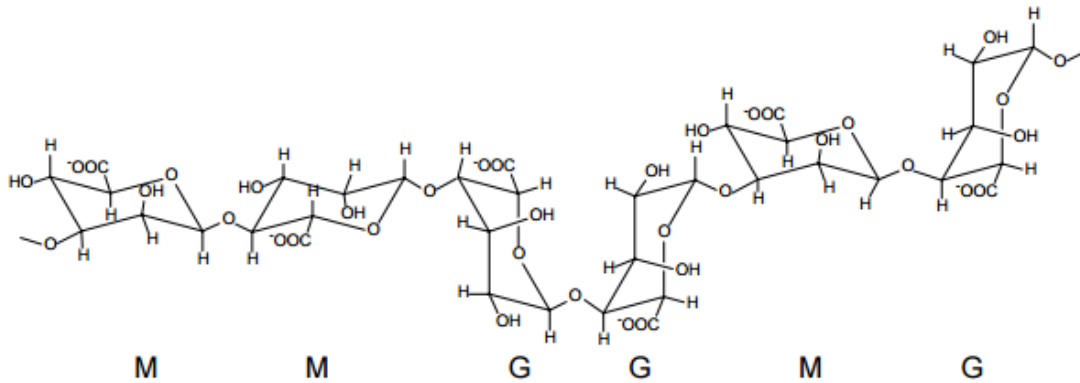


Figura 5 Cadeia polimérica de um alginato formada por blocos-M, blocos-G e blocos-MG.

Quando as regiões de blocos-G das cadeias poliméricas se aproximam na presença de íons divalentes, como p.ex. os íons de Ca^{2+} , forma-se uma estrutura dimérica, em que os íons se posicionam nos interstícios entre as cadeias de alginato, interagindo com o anião carboxilato e com os grupos hidroxila. O modelo que explica a interação das cadeias de alginato com os íons de Ca^{2+} é o modelo “caixa de ovos” (do inglês ‘egg-box model’), apresentado na Figura 6, no qual os íons de Ca^{2+} representam os ovos, dispostos nos espaços que existem entre os blocos-G emparelhados, que fazem o papel da caixa (8,9). Esta interação é responsável por uma das principais propriedades dos alginatos, que é a capacidade de formar géis. (Pasin et al., 2012).

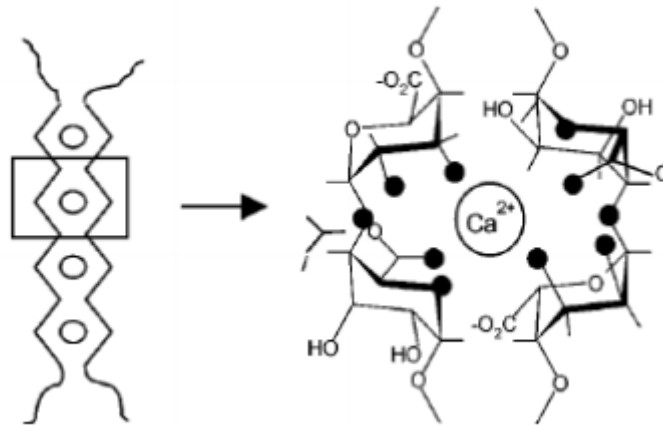


Figura 6 Esquema mostrando a interação dos blocos-G na presença de íons Ca^{2+} , “egg-box model”. Os círculos pretos representam os átomos de oxigênio envolvidos na coordenação do cátion.

A razão entre as unidades M:G e a quantidade relativa dos três segmentos poliméricos varia com a fonte de obtenção dos alginatos. Assim, os alginatos extraídos de algas marinhas distintas apresentam composição e estrutura polimérica diferentes e, conseqüentemente, suas propriedades também são diferentes. Uma diferença importante é observada na característica dos géis. Alginatos com maior percentagem de blocos-G formam géis mais rígidos e quebradiços, que podem sofrer sinérese. Já os géis de alginatos com maior percentagem de blocos-M são mais elásticos e dificilmente sofrem sinérese (Pasin et al., 2012).

O alginato é caracterizado por apresentar as seguintes propriedades:

Biocompatibilidade: Os alginatos estão incluídos num grupo de compostos que são geralmente considerados como seguros (GRAS) pela FDA tornando-o passível de administração oral sem detectar sinais de toxicidade. Estudos efetuados revelaram a biodegradabilidade e a não toxicidade deste composto, provocando uma baixa resposta imunitária quando ingerido oralmente (George e Abraham, 2006).

Mucoadesividade: Essa é uma propriedade do alginato que reforça o seu papel enquanto sistema de libertação de substâncias em diversos locais do trato gastrointestinal. A mucoadesividade deve-se aos grupos carboxilo existentes na parte terminal das suas cadeias moleculares (George e Abraham 2006).

Sensibilidade ao pH: O comportamento do alginato varia de acordo com o valor de pH a que está submetido. A sensibilidade ao pH viabiliza a aplicação deste composto

Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

como parte de um sistema de libertação por via oral. A libertação de moléculas a partir de capsulas de alginato é significativamente reduzida a pH baixo (ambiente gástrico) uma vez que nestas condições este apresenta retração. No fluido gástrico, o alginato hidratado é convertido numa “pele” de ácido algínico que é porosa e insolúvel. Quando transita para o trato intestinal, onde o pH é superior, a “pele” de ácido algínico é convertida numa camada viscosa solúvel, ocorrendo libertação do conteúdo da capsula (George e Abraham, 2006).

Na Tabela 2 estão apresentadas algumas aplicações com a respetiva funcionalidade exercida pelo alginato em diferentes áreas industriais.

Tabela 2 Aplicações e funcionalidade do alginato (adaptado de Draget e Taylor, 2011).

Aplicação	Atributo funcional
Indústria alimentar de bebidas	
Bebidas, geleias	Estabilizantes, espessantes
Produção de etanol	Material de encapsulação
Indústria farmacêutica	
Material de impressão dentária	Molde
Cultura e transplante de células	Material de encapsulação
Outras indústrias	
Tecidos	Espessante
Papel	Agente adesivo
Tintas	Estabilizante, agente de suspensão

1.3.3 Métodos de encapsulação

Atualmente, a quantidade de métodos de microencapsulação patenteados ascende a várias centenas e é previsível que esse número continue crescendo à medida que forem surgindo novos materiais encapsulantes e novos princípios ativos que requeiram processamentos específicos para a sua microencapsulação (Suave et al., 2006).

Várias técnicas têm sido utilizadas na preparação de micropartículas, tais como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, co-extrusão, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas, complexação por inclusão e nanoprecipitação (Silva, 2013).

Ré (1998), Cardoso (2000) e Alvim (2005) relatam que os procedimentos para obtenção das microcápsulas podem ser divididos nos 3 grupos básicos, tal como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 Métodos utilizados na elaboração das microcápsulas (adaptado de Suave et al., 2006).

Físico-químicos	Químicos	Físicos
Coacervação simples ou complexa	Polimerização interfacial -	" <i>Spray drying</i> "
Separação de fases	Inclusão molecular	" <i>Spray coating</i> "
Envolvimento lipossômico		" <i>Spray chilling</i> "
		Leito fluidizado
		Extrusão
		Liofilização
		Centrifugação
		Co-cristalização

Cada processo de microencapsulação depende de vários aspetos contudo, o princípio básico é comum a todos. O método clássico de formação de microcápsulas é caracterizado pela utilização de uma parede polar revestindo um núcleo apolar ou vice-versa. A imiscibilidade entre o composto ativo e a solução/suspensão do agente encapsulante é o que permite a formação inicial das cápsulas, pois a tentativa de homogeneização dessa mistura gera uma emulsão na qual a fase contínua é composta por um solvente contendo o agente encapsulante e a fase descontínua o composto ativo (Alvim, 2005).

De uma forma genérica, a deposição do agente encapsulante sobre o agente a encapsular ocorre seguindo uma série de etapas. Primeiramente, o agente encapsulante é dissolvido ou fundido. O agente a encapsular pode estar presente na forma de partículas pequenas (se for de natureza sólida) ou em gotas (se for de natureza líquida), ou até mesmo na forma de gás. O material a encapsular é colocado num meio apropriado e, posteriormente, sobre este deposita-se o agente encapsulante. Em suma, o agente encapsulante sofre precipitação (se estiver previamente solubilizado) ou solidificação (se estiver previamente fundido) adquirindo uma forma que é fixada por meio de calor, de reticulação ou devido à evaporação do solvente, formando-se assim as micropartículas/microcápsulas (Venkatesan et al., 2009).

As técnicas de microencapsulação e as aplicações destas microcápsulas na indústria de alimentos são apresentadas em diversos artigos de revisão, nomeadamente no de Gouin (2004). De acordo com este autor, a tecnologia de leiteo fluidizado consiste num processo muito eficiente para aplicar uma camada uniforme de material encapsulante em partículas sólidas, sendo possível processar de forma eficiente partículas de 100 µm a alguns milímetros. A microencapsulação por extrusão é usada quase exclusivamente para o encapsulamento de flavorizantes e óleos voláteis e instáveis em matrizes de polissacarídeos. Um dos inconvenientes desta tecnologia é a formação de partículas de grandes dimensões que limitam o uso posterior dos flavorizantes em aplicações onde o paladar é um fator crucial. O “spray cooling/chilling” é a tecnologia menos cara de encapsulamento e é usado rotineiramente para o encapsulamento de vários sais orgânicos, inorgânicos bem como para os ingredientes texturais, enzimas, flavorizantes e outros ingredientes funcionais para melhorar a estabilidade ao calor, retardar a libertação em ambientes húmidos, e/ou o converter ingredientes hidrofílicos líquidos em pós (sólidos). A tecnologia de “spray drying” é uma técnica bem estabelecida, barata e direta, apresentando como principal limitação o número reduzido de materiais para encapsulação disponíveis. Quase todos os processos de spray drying na indústria de alimentos são realizados com formulações aquosas, logo o material da parede deve ser solúvel em água, num nível aceitável. É importante também que as soluções produzidas possuam uma baixa viscosidade para um elevado teor de sólidos.

A escolha do método de microencapsulação é ditada pelas propriedades (físicas e químicas) do material encapsulado, do encapsulante e pelo fim a que se destina a aplicação do ingrediente (Madene et al., 2006; Desai & Park, 2005).

O método ideal de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido, fácil de transpor para a escala industrial e pouco dependente das características de solubilidade da substância ativa a encapsular e do polímero a ser utilizado (Silva et al., 2003).

A técnica mais utilizada para o processo de microencapsulação na indústria alimentar é a técnica de *spray drying*. Este é considerado um processo económico, flexível, utiliza um equipamento fácil de manusear originando partículas de boa qualidade (Fang & Bhandari, 2010).

Existem outras variantes que se baseiam em técnicas de *spray*, como por exemplo a técnica de atomização (*spray*) seguida de coagulação. Esta técnica apresenta a vantagem de não utilizar temperaturas elevadas podendo apresentar por isso vantagens relativamente à técnica de *spray drying* no que respeita à encapsulação de substâncias mais sensíveis à temperatura. Adicionalmente, esta técnica é adequada ao uso do alginato como material encapsulante em que o processo de consolidação da forma é feita por um processo de gelificação. Esta técnica será a escolhida para utilizar neste trabalho.

1.3.4 Aplicações da microencapsulação na indústria de alimentos

Os propósitos gerais da microencapsulação podem ser enumerados da seguinte forma: (i) transformar um líquido em sólido, de modo a facilitar sua manipulação, transporte e adição em formulações; (ii) separar materiais reativos; (iii) reduzir a toxicidade do material ativo; (iv) promover a libertação controlada do princípio ativo encapsulado; (v) reduzir a volatilidade ou flamabilidade de líquidos; (vi) mascarar o sabor e odor de determinados componentes; (vii) aumentar o tempo de vida de prateleira; e (viii) proteger contra a luz, humidade e calor (Favaro-Trintade et al., 2008).

Entre os materiais que podem ser encapsulados, para aplicação na indústria alimentar, incluem-se ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, aminoácidos, óleos essenciais, corantes, enzimas e microrganismos (Desai & Park, 2005). Os itens abaixo descrevem com maior detalhe a importância da encapsulação de alguns destes materiais.

As fortes restrições impostas pelo mercado ao uso de corantes sintéticos tem motivado a crescente substituição destes por pigmentos naturais. No entanto, além de mais caros que os sintéticos, os naturais são muito instáveis quimicamente. Por exemplo, os carotenoides, que constituem uma das principais classes de corantes naturais, são muito suscetíveis à oxidação e isomerização, resultando na perda de cor. A encapsulação além de evitar esta degradação, possibilita ainda a dispersão dos carotenoides em água, facilitando sua aplicação em alimentos (Azeredo, 2005).

A produção de preparados de sucos de frutas encapsulados em pó é uma aplicação de crescente interesse industrial. Os sucos de frutas são produtos de elevada

procura no mercado mundial, e a sua produção sobre a forma de pós tem sido muito estudada. Todavia, devido à sua alta higroscopicidade e natureza termoplástica o seu fabrico acarreta problemas de adesão às paredes do secador e aglomeração o que pode ser contornado pela utilização de materiais encapsulantes (Bhandari, 1993).

Várias vitaminas são altamente oxidáveis, podendo por isso beneficiar da encapsulação, que, para além de aumentar a estabilidade destes composto, pode ainda mascarar possíveis sabores ou odores estranhos. Desta forma, o material de parede deve libertar o núcleo apenas após a ingestão, ou seja, no estomago ou no intestino. Geralmente são utilizados materiais hidrofóbicos, como ceras, embora os derivados da celulose e proteínas com reticulação possam também promover a libertação energética (Brazel, 1999).

A legislação limita os teores de muitos conservantes em alimentos, além de apresentarem limitações sensoriais. A libertação controlada de conservantes por encapsulação melhora sua eficiência, reduzindo o teor requerido desses aditivos. A encapsulação de ácidos orgânicos utilizados como conservantes em panificação, como ácido sórbico, evita uma queda prematura do pH, que poderia comprometer o crescimento das leveduras. A libertação controlada desses ácidos, por outro lado, é requerida durante a armazenagem, quando sua ação contra o crescimento de fungos é necessária (Azeredo, 2005).

A encapsulação de extratos naturais ricos em compostos fenólicos ou de compostos isolados foi efetuada por diversos autores. A Tabela 4 apresenta um resumo de alguns estudos encontrados na literatura para o caso dos extratos naturais.

Tabela 4 Exemplos de microencapsulação de princípios ativos contendo extratos fenólicos com interesse na área alimentar.

Princípio ativo	Material	Técnica	Referência
<i>Daucus carota</i> L. (Extrato etanólico)	Maltodextrinas	<i>Spray drying</i>	(Ersus & Yurdagel, 2007)
<i>Fragaria vesca</i> L. (extrato hidrometanólico)	Alginato	Atomizaçã/coagulação	(Dias, 2015)
<i>Garcinia cowa</i> (Extrato do fruto)	Maltodextrina	Freeze drying	(Ezhilarasi et al., 2013)
<i>Ilex paraguariensis</i> (Extrato aquoso)	Alginato, Alginato+quitosano	<i>Spray drying</i>	(Deladino et al., 2008)
<i>Lippia sidoides</i> (Extrato hidroetanólico)	Maltodextrina, Goma-arábica	<i>Spray drying</i>	(Fernandes et al., 2012)
<i>Myrica rubra</i> Sieb. et Zucc (Extratos fenólicos de bayberry)	Etil Celulose	Separação de fases	(Zheng et al., 2011)
<i>Olea europaea</i> (Extrato de folha de oliveira)	Quitosano	<i>Spray drying</i>	(Kosaraju, D'ath e Lawrence,2006)
<i>Opuntia ficus-indica</i> (Extrato etanólico)	Maltodextrina, Inulina	<i>Spray drying</i>	(Saéñz et al., 2009)
Própolis (Extrato etanólico)	Proteína isolada de soja e pectina	Coacervação complexa, <i>Freeze drying</i>	(Nori et al., 2011)
<i>Quercus resinosa</i> (Extrato da infusão das folhas)	Maltodextrina, k-carragenano	<i>Spray drying</i>	(Gallegos-Infante et al., 2013)
<i>Rubus ulmifolius</i> (extrato hidroalcoólico)	Alginato	Atomização/coagulação	(Martins et al.,2014)
<i>Suillus luteus</i> e <i>Coprinopsis atramentaria</i>	Maltodextrina	<i>Spray drying</i>	(Ribeiro, 2015)

2. Materiais e Métodos

2.1. *Material vegetal*

As amostras silvestres de *Arenaria montana* L. (Caryophyllaceae), flores e caules com folhas, foram recolhidas em Bragança (Nordeste Portugal) e identificadas pela Prof. Ana Maria Carvalho da Escola Superior Agrária de Bragança. A espécie foi coletada em plena floração, na primavera, em caminhos com árvores de carvalho, em Oleiros, Bragança. A amostra para análise para este estudo foi feita combinando o material de diferentes plantas. Alguns exemplares foram depositados no Herbário da Escola Superior Agrária de Bragança (BRESA). A amostra foi liofilizada (4,5 FreeZone, Labconco, Kansas City, MO, EUA), reduzida a pó (20 mesh) e misturada para garantir a sua homogeneidade.

2.2. *Solventes, reagentes e padrões*

O cloreto de cálcio di-hidratado foi adquirido na Panreac Quimica SAV e o alginato de sódio na Fluka Chemie.

O acetonitrilo 99%, grau HPLC, foi adquirido à Fisher Scientific (Loures, Portugal). O solvente etanol, grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na Sigma, assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos e os padrões de açúcares. Os padrões de compostos fenólicos foram obtidos na Extrasynthesis (Genay Cedex, França). Os restantes reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA).

A água utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water System, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

2.3. *Preparação e caracterização do extrato de A. montana enriquecido em derivados de apigenina*

O extrato foi preparado por maceração do material vegetal liofilizado (1 g) com 30 mL de etanol:água (80:20, v/v) a 25°C sob agitação a 150 rpm durante 1h, sendo

subsequentemente filtrado através de papel Whatman N°4. O resíduo obtido foi, em seguida, extraído com uma porção adicional de 30 mL da mistura hidroalcoólica. Os extratos hidroalcoólicos combinados foram evaporados a 35°C sob pressão reduzida (evaporador rotativo Buchi R-210, Flawil, Suíça) e posteriormente liofilizados.

A caracterização do extrato foi feita por HPLC-DAD (Shimadzu 20A series UFLC, Shimadzu Corporation) com uma bomba quaternária, com dupla detecção *online* levada a cabo por um detetor de díodos (DAD) usando os comprimentos de onda preferenciais de 280 nm e 370 nm. Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C₁₈ (3 µm, 4,6 x 150 mm) termostaticada a 35 °C e com um fluxo de 0,5 mL/min. A fase móvel foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B mais 10 min, 25-35% B mais 10 min, 35-50% B mais 10 min e reequilíbrio da coluna. Os compostos fenólicos foram caracterizados de acordo com os seus espectros de UV e tempo de retenção em comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão de apigenina com concentrações conhecidas (2,5-100 µg/mL) e confirmada por comparação com os resultados previamente publicados pelo grupo de investigação BioChemCore (onde também se realizou a presente análise) relativos à mesma amostra (Perreira et al., 2014). Os resultados foram expressos em mg por g de extrato.

2.4. Avaliação do potencial anti-angiogénico através de um ensaio de inibição enzimática da VEGFR-2

O extrato hidroalcoólico foi re-dissolvido em água (concentração final de 8 mg/mL). As soluções stock foram ainda diluídas para obter diferentes concentrações e posteriormente submetidas a ensaios de inibição enzimática da VEGFR-2 utilizando Z'-LYTE-Tyr1 Peptide assay kit (Invitrogen, Cat. PV3190) (Guimarães et al., 2015)

Resumidamente, os ensaios foram realizados em placas de 384 poços num volume total de 20 µL, usando a técnica de transferência de Energia de Ressonância Fluorescente (FRET - Fluorescence Resonance Energy Transfer). O substrato Tyr1 (peptídeo duplamente marcado com fluoresceína-cumarina) a 1 µM, foi incubado durante

1 h com 4 µg/mL de VEGFR-2, 50 µM de ATP e as diferentes concentrações das amostras à temperatura ambiente em 50 mM Hepes/NaOH (pH 7,5), MgCl₂ 10 mM , MnCl₂ 2 mM, DTT 2,5 mM, ortovanadato de sódio 0,1 mM e albumina de soro bovino 0,01%. Os poços foram incubados a 25 °C durante 1 h com agitação. Após a incubação foram adicionados 5 µL de solução de desenvolvimento a cada poço. Após uma segunda incubação de 1h com agitação, adicionaram-se 5 µL de solução STOP a cada poço. Usando um leitor de microplacas Biotek FLX800, mediu-se a fluorescência a 445 nm e 520 nm (excitação a 400 nm). A genisteína (Extrasynthese, Genay, França) foi utilizada como controlo positivo. Para análise dos dados usou-se o software Gen5™. Os resultados foram expressos em valor de IC₅₀ (concentração de amostra capaz de inibir 50% da fosforilação; em µg /mL).

2.5. Microencapsulação do extrato de *A. montana*

O processo de produção das microesferas foi realizado através do método de atomização/coagulação utilizando o sistema NISCO Var J30 (equipamento utilizado no presente trabalho). Este pode ser descrito como sendo constituído por um controlador de pressão ligado a uma fonte de gás (azoto) e uma bomba seringa para controlo do caudal da solução. Estes componentes alimentam o bico atomizador (*nozzle*), onde ocorre a formação do *spray*. As micropartículas são consolidadas logo após a sua formação por contato com a solução do agente de coagulação. Relativamente à produção de microesferas, este sistema requer a otimização do caudal de alimentação da emulsão ou solução ao *nozzle* e da pressão de saída do gás. No presente trabalho foram utilizadas condições previamente otimizadas (Fernandes et al., 2012). O sistema químico utilizado consistiu no seguinte:

- Material de suporte – alginato utilizado sob a forma de solução aquosa a 4% (w/v);
- Princípio ativo – extrato hidroalcoólico de *A. montana* na sua forma liofilizada;
- Solução de coagulação – solução CaCl₂ a 4% (w/v).

Na Figura 7 apresenta-se uma imagem do dispositivo experimental Nisco Var J30.

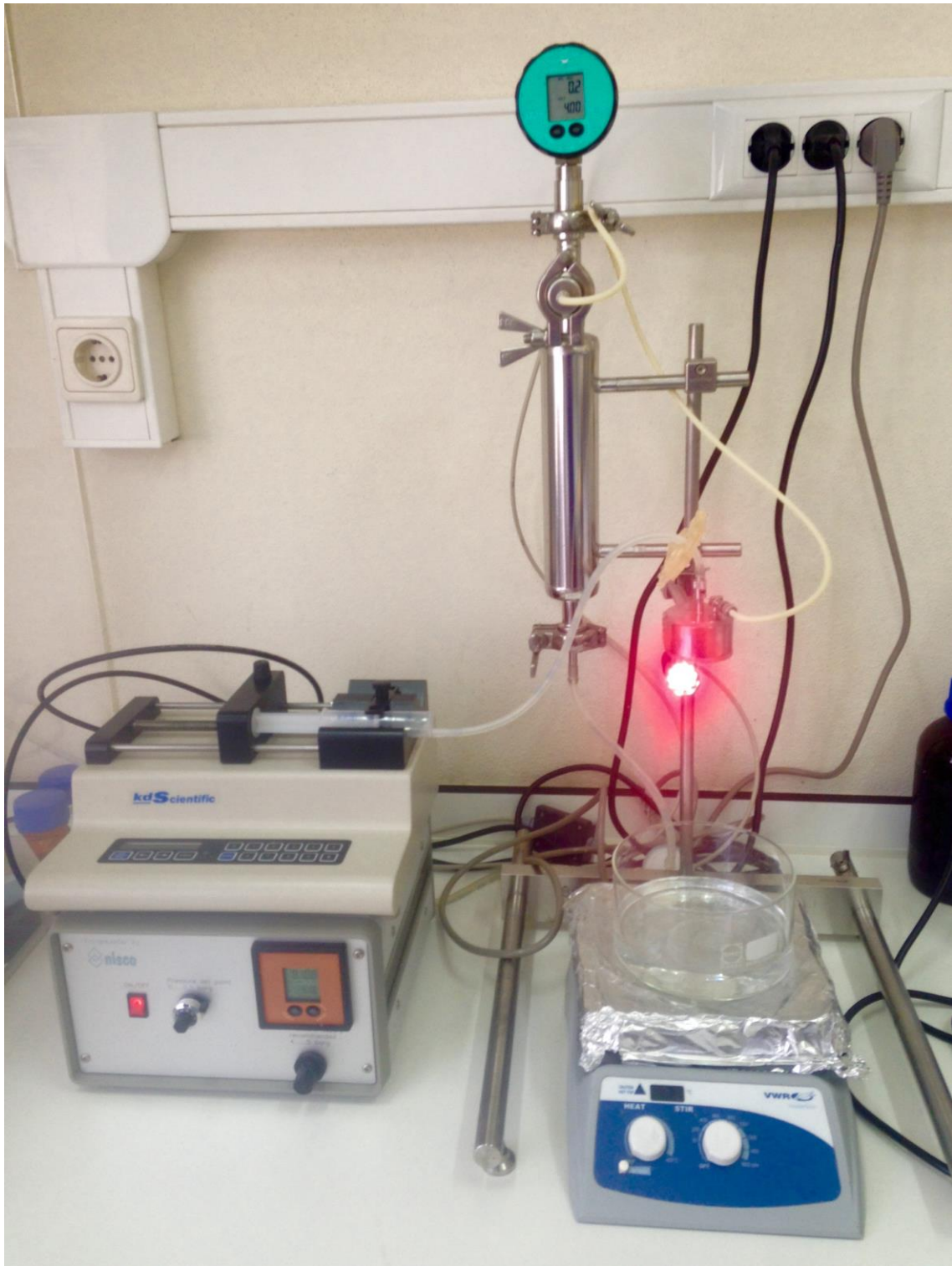


Figura 7 Imagem do sistema NiscoVar J30.

Para a produção das microesferas foram pesadas 50 mg do extrato hidroalcoólico de *A. montana* e procedeu-se à sua dissolução em 10 mL de água, a seguir filtrou-se a solução obtida para retirar o material residual por dissolver (que foi sempre mínimo) e Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

adicionaram-se 400 mg de alginato de sódio. Colocou-se a solução preparada numa placa de agitação a 400 rpm durante 2 h de forma a garantir a dissolução completa do alginato. Para a atomização foram medidos 10 mL da solução utilizando uma seringa de 20 mL. Esta foi acondicionada na bomba de seringa do equipamento Nisco Var J30. Fixou-se o caudal de alimentação da solução ao nozzle em 0,2 mL/min e a pressão de alimentação do azoto 0,1bar. Dispensaram-se os 10 mL da solução preparada para a solução de coagulação (250 mL de solução de CaCl₂ 4% (w/v)). Uma vez finalizada a atomização, manteve-se a solução de coagulação sob agitação a 200 rpm e temperatura ambiente durante 4h de forma a garantir a consolidação das microesferas produzidas. Num último passo, procedeu-se à separação e acondicionamento das microesferas. Fez-se uma primeira filtração para isolar as microesferas da solução de coagulação e procedeu-se seguidamente à sua lavagem com água destilada (100 mL) e filtração. Este procedimento foi repetido duas vezes. Por fim recolheram-se as microesferas obtidas, estas foram liofilizadas e acondicionadas ao abrigo da luz para posterior utilização.

2.6. Caracterização das microesferas

As microesferas produzidas foram observadas por microscopia ótica (MOP) utilizando um microscópio Nikon Eclipse 50i equipado com uma câmara Nikon Visão Digital e o *software NIS-Elements Documentation* para a aquisição de dados. Foram adquiridas imagens com a ampliação de 40, 100, e 400X, após a produção e a etapa de coagulação. Os dados obtidos permitiram analisar a morfologia e o tamanho das partículas produzidas, este determinado mediante o uso de uma calibração existente no software do microscópio que estabelece a relação entre o número de pixéis e a unidade de comprimento (micrómetros (µm)). Foi também possível com esta análise inferir a presença/ausência de princípio ativo no interior e exterior das microesferas.

As microesferas produzidas foram ainda caracterizadas quanto ao resíduo seco e eficiência de encapsulação (EE).

O resíduo seco foi determinado como a razão entre a massa das microesferas secas (liofilizadas) e a massa das microesferas húmidas e expressa em termos de percentagem m/m.

Para a determinação da eficiência de encapsulação (EE) recorreu-se à análise cromatográfica (HPLC-DAD) de compostos fenólicos e respetiva quantificação, de acordo com o procedimento descrito na secção 2.3. Para tal avaliou-se cumulativamente o extrato remanescente na solução de coagulação e na 1ª solução de lavagem.

A eficiência de encapsulação foi calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Eficiência de encapsulação (EE)} = \frac{Mp.a.t - Mp.a.ne}{Mp.a.t} \times 100$$

na qual, Mp.a.t corresponde à quantidade de substância teórica utilizada no processo de encapsulação e Mp.a.ne corresponde à quantidade por encapsular determinada como descrito anteriormente.

2.7. Incorporação do extrato hidroalcoólico de *A. montana*, livre e em microesferas, no iogurte

A matriz alimentar escolhida foi o iogurte natural com 5% de matéria gorda. Foram preparadas 6 porções, cada uma com 125 g de iogurte, em gobelés, para a preparação das seguintes amostras:

- 2 amostras de 125 g de iogurte simples (controlo),
- 2 amostras de 125 g de iogurte para incorporação do extrato livre (16 mg);
- 2 amostras de 125 g para incorporação do extrato microencapsulado (70 mg).

A quantidade de extrato incorporado nas amostras de iogurte (livre ou microencapsulado) foi duas vezes o valor de IC₅₀ (determinado de acordo com o descrito na secção 2.4.), estando também de acordo com a dose diária recomendada de derivados de apigenina (4 a 24 mg (Brazil, 2013)) e a sua concentração relativa no extrato (48%, w/w). O valor de concentração referido foi obtido com base nos valores

contantes na Tabela 5, a partir do cálculo do conteúdo mássico de derivados de apigenina (área dos derivados de apigenina/área total).

Tabela 5 Tempos de retenção (Rt), área, identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato de *A. montana*.

Composto fenólico	Rt (min)	Área (mAU)	Concentração (mg/g extrato)
Apigenina-6-C-hexósido-8-C-hexósido	14,452	496,1	0,9±00,1
Apigenina 6-C-hexósido-8-C-pentósido	15,193	2142,05	1,86±00,1
Luteolina-6-C-glucósido	16,723	2417,95	1,01±00,4
Apigenina 2''-O-pentosil-6-C-hexósido	18,44	6245,65	5,54±0,10
Luteolina 2''-O-feruloil-hexosil-6-C-hexósido	18,551	4169	1,70±00,2
Apigenina-6-C-glucósido	19,863	8054,4	7,16±0,08
Apigenina 2''-O-acetilpentosil-6-C-hexósido	21,255	9050,4	8,05±0,04
Metil-luteolina 2''-O-acetilpentosil-C-hexósido	22,554	4477,8	3,96±0,06
Metil-luteolina 2''-O-feruloilhexosil-C-hexósido	22,83	22568,05	20,17±0,16
Apigenina 2''-O-feruloilhexosil-6-C-hexósido	23,118	4643,85	4,11±0,11

A negrito destacam-se os derivados de apigenina utilizados na monitorização do presente estudo (processo de encapsulação e incorporação na matriz alimentar).

Foram feitas análises para dois tempos: tempo inicial (t0), isto é o momento imediatamente após a adição do extrato e do respetivo microencapsulado, e o tempo de 3 dias (t3). Após recolha das amostras conforme o planeamento estabelecido (t0 e t3), estas foram liofilizadas e acondicionadas para posterior análise. As amostras foram submetidas a ensaios para a determinação do valor nutricional, nomeadamente macronutrientes e valor energético, açúcares livres e ácidos gordos. Adicionalmente foi avaliado o potencial antiangiogénico cuja metodologia já foi descrita anteriormente na secção 2.4.

2.8. Análise nutricional dos iogurtes controlo e com extrato (livre e encapsulado)

2.8.1. Macronutrientes e valor energético

Foi analisada a humidade, proteínas, gordura, hidratos de carbono e cinzas, utilizando os procedimentos AOAC (2005). As proteínas totais ($N \times 6,25$) foram estimadas pela técnica macro-Kjeldahl. A gordura total foi determinada após extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração a 660 ± 15 °C. Os hidratos de carbono foram calculados por diferença: $100 - (\text{massa proteínas} + \text{massa gordura} + \text{massa cinzas})$. A energia total foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$E \text{ (kcal)} = 4 \times (m_p + m_{hc}) + 9 \times (m_g)$$

Eq. (1)

Onde:

E = Energia

m_p = Massa de proteínas

m_{hc} = Massa de hidratos de carbono

m_g = Massa de gordura

2.8.2. Açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros et al. (2010) com algumas modificações. Cada uma das amostras de frutos e pedúnculos (1 g) foi enriquecida com melezitose como padrão interno (PI, 5 mg/mL) e foi extraída com 40 mL de etanol aquoso 80%, a 80 °C, durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion) a 15,000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida; os vestígios de gordura foram removidos em três lavagens sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 mL. Os açúcares foram determinados usando o HPLC (Knauer, sistema Smartline) a 35 °C. O sistema de HPLC estava equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6×250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de

Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

1 mL/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em g por 100 g de massa fresca.

2.8.3. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Barros et al. (2010), e após o seguinte processo de trans-esterificação. A massa obtida por extração em Soxhlet dos frutos e pedúnculos foi misturada com 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 °C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada, para obter a separação das fases. A FAME foi recuperada com 3 mL de éter etílico em agitação no *vortex*; fez-se passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um *vial* com tampa contendo membrana de teflon e filtrou-se com um filtro de nylon 0,2 µm Milipore. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m×0,32 mm×0,25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C, 20 °C/min até 220 °C que permaneceu durante 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

2.9. Análise estatística

Os ensaios relativos a cada uma das amostras foram feitos em triplicado. Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) a 2 fatores seguindo o modelo geral linear (GLM). Os resultados foram comparados através de um teste de Tukey HSD com $\alpha = 0,05$ para o efeito da funcionalização e através de um teste *t student* para o efeito do tempo de armazenamento. Este tratamento foi efetuado utilizando o programa SPSS v. 22.0.

3. Resultados e Discussão

3.1. Potencial anti-angiogénico do extrato de *A. montana*

O extrato hidroetanólico de *A. montana* mostrou capacidade para inibir a fosforilação da VEGFR-2, de acordo com o ensaio enzimático baseado na transferência de energia de ressonância fluorescente (FRET). O valor de IC₅₀ (concentração de extrato responsável por 50% de inibição da fosforilação da enzima) obtido foi 63.13 ±2,52 µg/mL.

Na Figura 8 é possível observar que a percentagem de inibição de fosforilação da VEGFR-2 é dependente da concentração de extrato, ou seja, quanto maior a concentração deste maior a inibição obtida. Para a concentração testada de 100 µg/mL a inibição foi de 61,11%.

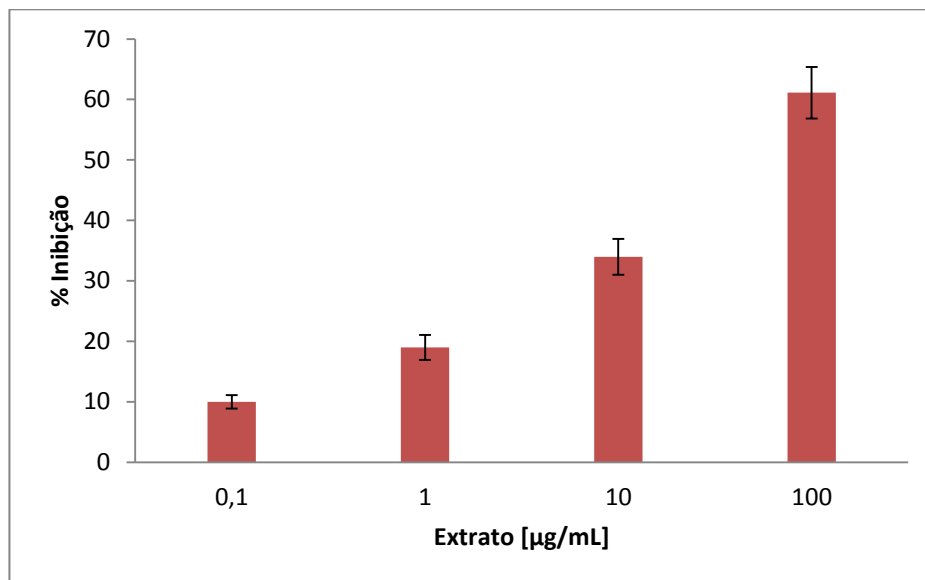


Figura 8 Percentagem de inibição de VEGFR-2 em função da concentração de extrato de *A. montana*.

3.2 Produção e caracterização das microesferas de alginato contendo o extrato de *A. montana*

As microesferas de alginato incorporando o extrato de *A. montana* foram preparadas através da técnica atomização/coagulação tendo sido realizados testes iniciais à escala de 50 mg de extrato para 400 mg de alginato (razão extrato/alginato de 0,125, m/m). Seguidamente a microencapsulação foi efetuada a uma escala superior de modo a ser suficiente para realização dos testes de incorporação no iogurte. Para tal

Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quim

foram utilizados 100 mg de extrato e 800 mg de alginato dissolvidos em 20 mL de água destilada, tendo sido atomizados 14 mL. Após o processo de separação e lavagem obtiveram-se 5,4711 g de microesferas hidratadas. Uma vez submetidas à liofilização obtiveram-se 0,4224 g de microesferas secas o que conduziu à obtenção de um resíduo seco de 7,7%.

As microesferas foram analisadas por MOP em diferentes pontos do processo produtivo: imediatamente após a finalização da atomização, decorridas 4h em contato com a solução de coagulação e após liofilização (forma de armazenamento selecionada). As observações efetuadas estão registradas na Figura 9. Ao observar as imagens obtidas foi possível confirmar que o processo decorreu com sucesso. Após atomização a maioria das microesferas produzidas apresentaram uma morfologia esférica e característica (não se detectaram aglomerados), em algumas microesferas foi observado uma ligeira deformação (forma semelhante a uma pera). Após o período de consolidação o número de microesferas com morfologia esférica aumentou, comprovando que houve uma boa consolidação. Após a liofilização as microesferas apresentaram uma forma irregular devido à desidratação. O tamanho das microesferas produzidas foi estimado entre 14 e 88 μm .

A análise por HPLC com vista à quantificação dos derivados de apigenina (Tabela 3) revelou que estes estavam presentes em concentrações residuais (abaixo do limite de detecção) ou ausentes, respectivamente para a solução de coagulação e 1ª solução de lavagem. Tal permitiu estimar uma eficiência de encapsulação de 100%.

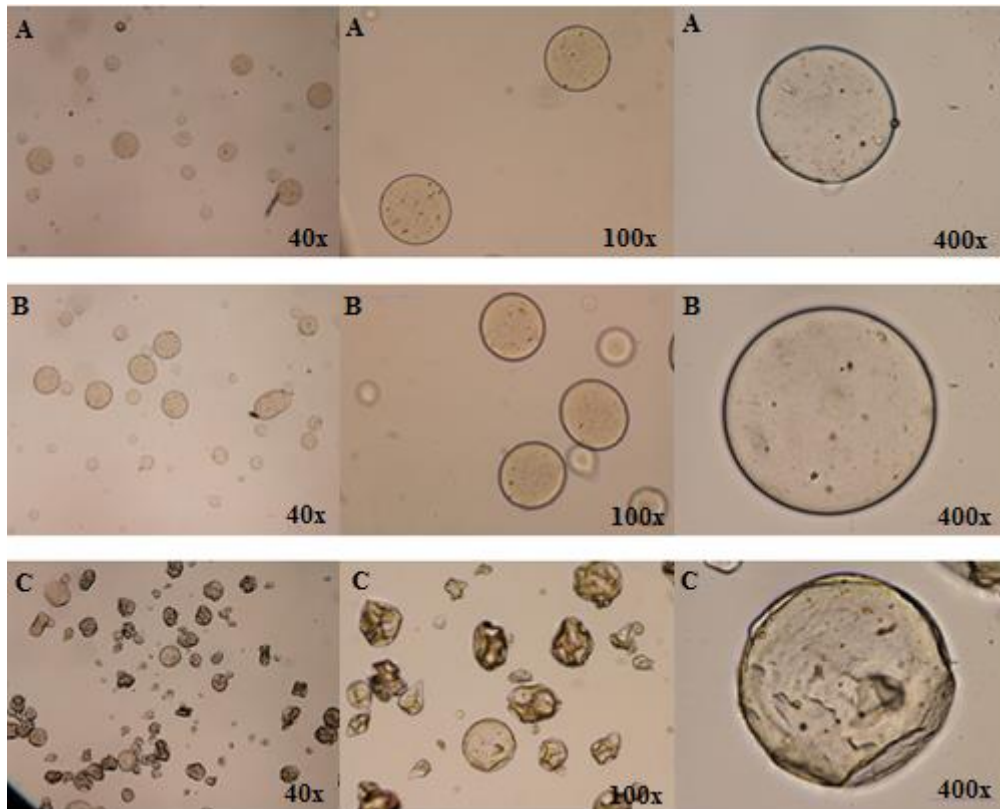


Figura 9 Microscopia óptica das microcápsulas ao longo do processo de microencapsulação: Microesferas A- depois de ter sido atomizado (tempo inicial do processo de coagulação); B- Microesferas após a coagulação; C- Microesferas após liofilização (forma de armazenamento)

3.4. Incorporação numa matriz alimentar

3.4.1. Valor nutricional dos iogurtes funcionalizados com extrato de *A. montana*

O estudo do valor nutricional das amostras de iogurte preparadas, e respetivo controlo, abrangeu a determinação da percentagem de água, cinzas e teor de macronutrientes (lípidos, proteínas e glúcidos); no final, também foi calculada a sua contribuição energética. Na Tabela 6 são apresentados os valores relativos à composição de macronutrientes, açúcares individuais e valor energético, expressos por 100 g de iogurte.

Antes do estudo do efeito de cada fator individual, é necessário analisar a possível interação entre os vários fatores em estudo. Isto é, verificar se o efeito de um determinado fator ao longo dos diferentes níveis do segundo mantém ou não uma

variação tendencial. Como se pode ver, o efeito da interação foi significativo apenas no caso da gordura, proteínas e cinzas. Nos restantes casos, a interação não foi significativa, o que permite efetuar comparações múltiplas para cada um dos fatores individuais, sempre que o seu efeito seja significativo ($p < 0,05$) *per se*, condição que se observa apenas no caso da lactose, que demonstrou ser significativamente superior no dia inicial, em comparação com o valor obtido após 3 dias de armazenamento. De qualquer forma, o efeito do tempo de armazenamento foi ainda significativo no caso do conteúdo em proteínas, que revelou ser superior também nas amostras não armazenadas, embora não se possam classificar inequivocamente os resultados, devido à interação entre fatores. Por outro lado, o efeito da incorporação de agentes de funcionalização foi apenas significativo no caso da gordura total, que resultou ser superior para as amostras incorporadas com extrato.

Todos os restantes parâmetros permaneceram aproximadamente invariáveis para ambos os fatores em estudo.

No caso dos ácidos gordos, resultados apresentados na Tabela 7, a interação entre os fatores foi significativa para todas as moléculas analisadas. Assim, e apesar de não ser possível indicar a classificação obtida após efetuar comparações múltiplas para cada um dos fatores individuais, verifica-se que o armazenamento induziu um ligeiro aumento das percentagens de C4:0, C6:0 e C12:0, e uma ligeira diminuição da percentagem de C16:0. Para os restantes ácidos gordos, é notório que as percentagens de ácidos gordos se mantiveram quase constantes.

Em relação ao efeito da incorporação de agentes de funcionalização, os iogurtes incorporados com extrato microencapsulado demonstraram valores ligeiramente superiores de C4:0 e C6:0, enquanto aqueles incorporados com extrato livre demonstraram maiores percentagens de C10:0 e C12:0. Finalmente, os iogurtes não incorporados revelaram maiores percentagens de C18:0. Para todos os restantes ácidos gordos, não foram observadas variações significativas, quer em função do efeito do tempo, quer da incorporação de agentes de funcionalização, o que permite de alguma forma dizer que os perfis em ácidos gordos foram apenas ligeiramente alterados em alguns dos seus componentes minoritários.

Tabela 6 Valor nutricional dos iogurtes controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 3 dias de armazenamento (média ± DP).

		Humidade (g/100 g fw)	Gordura (g/100 g fw)	Proteína (g/100 g fw)	Hidratos de carbono (g/100 g)			Cinzas (g/100 g)	Energia (kcal/100 g)
					Galactose	Lactose	Total		
Armazenamento (ST)	0 dias	88±1	2,6±0,2	4,0±0,1	0,5±0,1	3,9±0,4	4±1	0,6±0,1	57±2
	3 dias	89±1	2,7±0,2	3,8±0,1	0,6±0,1	3,4±0,4	4±1	0,6±0,1	57±3
<i>p</i> -value (n=18)	<i>t</i> -Student test	0,054	0,065	<0,001	0,284	<0,001	0,108	0,062	0,394
Funcionalização	Ausente	88±1	2,4±0,1	3,9±0,2	0,6±0,1	3,7±0,4	4±1	0,6±0,1	56±2
	Extrato livre	89±1	2,9±0,1	3,9±0,1	0,5±0,1	3,7±0,4	4±1	0,5±0,1	58±3
	Extrato microencapsulado	89±1	2,7±0,1	3,9±0,1	0,6±0,1	3,6±0,5	4±1	0,6±0,1	57±2
<i>p</i> -value (n=18)	Tukey's HSD test	0,352	<0,001	0,762	0,205	0,801	0,308	<0,051	0,090
C×ST (n=54)	<i>p</i> -value	0,756	0,007	<0,001	0,214	0,506	0,506	0,007	0,819

Tabela 7 Ácidos gordos maioritários e os ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados das amostras de iogurte controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e passados 3 dias de armazenamento (média ± DP).

		C4:0	C6:0	C10:0	C12:0	C14:0	C16:0	C18:0	C18:1	C18:2	SFA	MUFA	PUFA
		Armazenamento (ST)	0 dias	2±1	2,4±0,4	3,3±0,2	3,7±0,1	11±1	31±1	11±1	24±1	3,1±0,2	69±1
	3 dias	3±1	2,8±0,2	3,2±0,2	3,5±0,2	11±1	30±1	11±1	24±1	3,2±0,2	68±1	27±1	4,7±0,4
<i>p</i> -value (n=18)	<i>t</i> -Student test ²	<0,001	<0,001	0,059	<0,001	0,062	0,002	0,485	0,473	0,702	0,216	0,345	0,160
Funcionalização	Ausente	2,6±0,4	2,7±0,2	3,2±0,1	3,5±0,2	11±1	30±1	12±1	24±1	3,2±0,2	68±1	27±1	4,8±0,3
	Extrato livre	2,3±0,5	2,3±0,4	3,5±0,1	3,8±0,1	11±1	31±1	11±1	24±1	3,1±0,2	69±1	27±1	4,5±0,3
	Extrato microencapsulado	3,6±0,2	2,8±0,2	3,1±0,2	3,6±0,1	11±1	30±1	11±1	24±1	3,1±0,2	69±1	27±1	4,6±0,3
<i>p</i> -value (n=18)	Tukey's HSD test ²	<0,001	<0,001	<0,001	0,001	0,055	0,061	<0,001	0,080	0,085	0,064	0,236	0,056
C×ST (n=54)	<i>p</i> -value	<0,001	<0,001	0,004	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

3.4.2. Avaliação do potencial anti-angiogénico dos iogurtes funcionalizados com extrato de *A. montana*

Na Tabela 8 apresentam-se os resultados do aumento percentual de inibição da fosforilação da VEGFR-2 das amostras de iogurte funcionalizadas com o extrato de *A. montana* (livre e encapsulado) em relação ao controlo (iogurte não aditivado). Todos os ensaios foram realizados utilizando a mesma concentração de iogurte liofilizado (100 µg/mL).

É possível observar, ao longo do tempo, uma melhoria da inibição nas amostras de iogurte com o extrato microencapsulado, o que pode ser explicado por uma provável libertação do extrato protegido. Observa-se também, ao longo do tempo, uma diminuição da capacidade de inibição nas amostras de iogurte funcionalizadas com extrato livre (melhor que o iogurte com extrato encasulado no tempo zero), o que pode ocorrer devido a uma provável degradação do extrato.

Apesar de ter sido possível detetar alguma inibição da fosforilação da VEGFR-2 nas amostras de iogurte funcionalizadas com extrato de *A. montana*, estes resultados necessitam de confirmação e validação em trabalhos futuros. Não obstante, o trabalho realizado permitiu verificar o efeito favorável da microencapsulação do extrato.

Tabela 8 Aumento percentual do potencial anti-angiogénico das amostras de iogurte funcionalizadas com extrato de *A. montana* em relação ao controlo.

Funcionalização	Tempo de armazenamento	Aumento da inibição da fosforilação da VEGFR2 (% relativa do controlo)
Com extrato livre	0 dias	10,03
	3 dias	8,6
Com extrato encapsulado	0 dias	5,45
	3 dias	12,04

4. Conclusões e Trabalhos Futuros

No presente trabalho foi realizado um estudo sobre a incorporação de um extrato vegetal rico em derivados de apigenina numa matriz láctea visando o desenvolvimento de um alimento funcional com propriedades quimiopreventivas. Para atingir os objetivos propostos selecionou-se, numa primeira fase e com base na bibliografia e conhecimento existente no grupo de investigação, uma planta rica em derivados de apigenina (*A. montana*) e procedeu-se à obtenção do seu extrato hidroetanólico e validação do seu potencial quimiopreventivo. Numa segunda etapa efetuou-se a microencapsulação do extrato selecionado numa matriz polimérica de origem natural (alginato) e procedeu-se à caracterização das micropartículas produzidas. Numa última etapa as microcápsulas produzidas foram incorporadas numa matriz alimentar láctea (iogurte) e o seu potencial anti-angiogénico e valor nutricional avaliados comparativamente com um controlo (iogurte sem extrato adicionado) e um iogurte funcionalizado com o extrato na sua forma livre.

A caracterização do extrato hidroetanólico de *A. montana*, obtida por HPLC-DAD, revelou a sua riqueza em derivados de apigenina (apigenina-6-C-hexósido-8-C-hexósido, apigenina 6-C-hexósido-8-C-pentósido, apigenina 2''-O-pentósil-6-C-hexósido, apigenina-6-C-glucósido e apigenina 2''-O-feruloilhexosil-6-C-hexósido). O mesmo extrato revelou capacidade de inibição da fosforilação da VEGFR-2 ($IC_{50} = 63,12 \pm 2.52 \mu\text{g/mL}$), o que evidenciou o seu potencial anti-angiogénico e viabilidade de utilização para o fim proposto, desenvolvimento de um alimento funcional com propriedades quimiopreventivas.

Uma vez que o extratos vegetais livres mostram, de uma forma geral, problemas de estabilidade procedeu-se à sua microencapsulação, tendo sido esta efetuada pela técnica de atomização/coagulação utilizando alginato como material encapsulante. As microcroeferas foram produzidas com sucesso seguindo um protocolo já estabelecido no grupo de investigação onde se realizou este trabalho tendo-se obtido uma eficiência de encapsulação, determinada cromatograficamente por quantificação dos derivados de apigenina presentes na solução de coagulação e 1ª solução de lavagem de 100%.

Os iogurtes funcionalizados com extrato de *A. montana* (livre e encapsulado) mostraram um valor nutricional similar ao controlo (iogurte não enriquecido), mas um

aumento do potencial anti-angiogénico (inibição da fosforilação da VEGFR-2) que foi mais preservado no extrato protegido.

Em conclusão, o presente trabalho aponta para a viabilidade de utilização do extrato hidroetanólico de *A. montana* no desenvolvimento de novos alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas. Permitiu ainda demonstrar as vantagens de se utilizarem os extratos microencapsulados relativamente aos extratos na forma livre. A utilização da microencapsulação é vantajosa não só para preservar a bioatividade dos extratos durante o seu armazenamento (antes da sua incorporação nos alimentos), assim como durante o seu tempo de prateleira garantindo uma maior biodisponibilidade destes aquando da ingestão.

De realçar que, tanto quanto é do nosso conhecimento, a proposta de desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas recorrendo às estratégias propostas neste trabalho é inovadora, não sendo conhecidos no mercado produtos com estas características (alimentos lácteos funcionalizados com extratos vegetais ricos em derivados de apigenina ou outros bioativos com propriedades quimiopreventivas). Nesse sentido este trabalho é pioneiro, e face aos resultados obtidos, indica a necessidade e interesse em dar continuidade a este estudo mediante confirmação dos resultados obtidos e estudos de outros extratos vegetais com propriedades quimiopreventivas. Adicionalmente, e pensando na industrialização do processo, seria interessante testar outros processos de microencapsulação (p. ex. *spray drying*, tecnologia com larga implementação industrial) e outras matrizes poliméricas.

5. Referência Bibliográfica

- Andlauer, W.; Furst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*, 35, 171-176.
- Anekella, K.; Orsat, V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 50, 17-24. .
- Anson, R. (2005). Microencapsulation: For enhanced textile performance. *Performance Apparel Markets*, 12, 21-39.
- Anjo, D. L. C. (2004). Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. *Jornal Vascular Brasileiro*, 3, 145- 154.
- Alvim, I., (2005). D., Produção e Caracterização de Micropartículas Obtidas por Spray Drying e Coacervação Complexa e seu Uso para Alimentação de Larvas de Peixe. *Tese (Doutorado)* - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 243.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis of AOAC international. In W. Horwitz, & G. Latimer, Gaithersburg, MD: *AOAC International*, 18.
- Azeredo, H. D. (2008). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 16, 89-97.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247-254.
- Bhandari, B. R., (1993). Spray Dryinf of concentrated fruit juices. *Drying Technology*, 11, 1081- 1092.
- Brazel, C. S., (1999). Microencapsulation: offering solutions dor the food industry. *Cereal Food World*, 44, 388-393.
- Brasil, 2013. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Consulta Pública nº 14, de 14 de maio. Diário Oficial da União (D.O.U) de 15 de maio. Relator: Dirceu Brás Aparecido Barbano
- Borges V. C. (2001) Alimentos funcionais: prebióticos, probióticos, fitoquímicos e simbióticos. *Nutrição Enteral e Parenteral na Prática Clínica*, 50, 1495-1501.

- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. *Nutrition Reviews*, 56, 317-333.
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales. *Acribia, Zaragoza*, 2, 1100.
- Cardoso, F. S. N., (2000) Produção de Microencapsulados de Amido com Recobrimento em Leito Fluidizado. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 65.
- Champagne, C. P. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 185-193.
- Cheung, Z. H., Leung, M. C., Yip, H. K., Wu, W., Siu, F. K., So, K.F. (2008). A neuroprotective herbal mixture inhibits caspase-3-independent apoptosis in retinal ganglion cells. *Cell Mol Neurobiol*, 28, 137–155.
- Deladino, L., Anbinder, P. S., Navarro, A. S., Martino, M.N. (2008). Encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*. *Carbohydrate Polymers*, 71, 126–134.
- Desai, K. G. H., Park, H. J., (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23, 1361-1394.
- Dias, M. I., Barros, L., Fernandes, I. P., Ruphuy, G., Oliveira, M. P. P., Santos-Buelga, C., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C.F.R. (2015). Bioactive formulation based on *Fragaria vesca* L. vegetative parts: chemical characterization and application in k-carrageenan gelatin. *Journal of Functional Foods*, 16, 243-255.
- Draget, K.I., Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, 25, 251-256.
- Ersus, S., Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805–812.
- Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., Jena, B.S., Anandharamakrishnan, C. (2013). Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. *Journal of Food Engineering*, 117, 513–520.

- Fan, T.-P., Yeh, J.-C., Leung, K.H., Yue, P.Y.K., & Wong, R.N.S. (2006). Angiogenesis: from plants to blood vessels. *Trends in Pharmacological Sciences*, 27, 297-309.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Favaro-Trindade, C. S.; Pinho. S. C.; Rocha, G. A. (2008). Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technololy*, 11, 103-112.
- Fernandes, I., Amaral, J., Pinto, V., Ferreira, M., Barreiro, M.F. (2012). Chitosan microparticles loaded with essential oils having in view leather applications. In 11th International Chemical and Biological Engineering Conference, 552-553.
- Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., González-Laredo, R.F., Medina-Torres, L., Gomez-Aldapa, C.A, Ochoa-Martínez, L.A., Martínez-Sánchez, C.E., Hernández-Santos, B., Rodríguez-Ramírez, J. (2013). Physicochemical properties and antioxidant capacity of oak (*Quercus resinosa*) leaf infusions encapsulated by spray-drying. *Food Bioscience*, 2, 31–38.
- George, M., Abraham, T.E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*, 114, 1-14.
- Gouin, S. (2004). Micro-encapsulation: Industrial Appraisal of Existing Technologies and Trends. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 330-347.
- Guimarães, R., Calhella, R. C., Froufe, H. J. C., Abreu, R. M. V., Carvalho, A. M., Queiroz, M. J. R.P., Ferreira, I. C.F.R., (2015). Wild Roman chamomile extracts and phenolic compounds: enzymatic assays and molecular modelling studies with VEGFR-2 tyrosine kinase. *Food and Function*, in press.
- Gupta S. (2007). Prostate cancer chemoprevention: current status and future prospects. *Toxicol Appl Pharmacol*, 224, 369–376.

- Hassimotto, N.M.A., Genovese, M.I., Lajolo, F.M. (2009). Antioxidant capacity of Brazilian fruit, vegetables and commercially-frozen fruit pulps. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, 394–396.
- Havsteen B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapy*, 96, 67-202.
- Kandaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., Huang, Y.T., & Lee, M.T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, 19, 895-909.
- Justesen, U., Knuthsen, P. (2001). Composition of flavonoids in fresh herbs and calculation of flavonoid intake by use of herbs in traditional Danish dishes. *Food Chemistry*, 73, 245–250.
- Kim, D. I., Lee, S. J., Lee, S. B., Park, K., Kim, W. J., Moon, S. K. (2008). Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression. *Carcinogenesis*, 29, 1701-1709.
- Kris-Etherton, P. M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A. E., Hilpert, K. F., Griel, A.E., Etherton, T. D. (2002). Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. *American Journal of Medicine*, 113, 71-88.
- Kosaraju, L. S., D'ath, L., Lawrence, A. (2006). Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, 64, 163-167.
- Kwak, N.; Jukes, D. J. (2001). Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. *Food Control*, 12, 99-107.
- Lippman, S. M., Hong W. K. (2002). Cancer prevention science and practice. *Cancer*, 62, 5119–5125.
- Loziene, K., Venskutonis, P.R., Sipailiene, A., Labokas, J. (2007). Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus pulegioides* L. chemotypes. *Food Chemistry*, 103, 546-559.
- Luo, G., Guan, X., Zhou, L. (2008). Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy*, 7, 966-973.

- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S., (2006) Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1–21.
- Martins, A., Barros, Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Barreiro, M. F., Ferreira, I. C.F.R. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schoot flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food & Function*, 5, 1091-1100.
- McKay, D. L., Blumberg, J.B. (2006). A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.) *Phytother*, 20, 519–530.
- Middleton, Jr. E., Kandaswami, C, Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews*, 52, 673–751.
- Moraes F. P.; Colla A L. M. (2006). Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology . *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3, 99-112.
- Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food application. *Food Science*, 1, 1806-181.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radicals, Biology & Medicine*, 49, 503-515.
- Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Alencar, S. M., Thomazini, M., Balieiro, J. C. C, Castillo, C. J. C. (2011). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *Food Science and Technology*, 44, 429-435.
- Osada, M., Imaoka, S., & Funae, Y. (2004). Apigenin suppresses the expression of VEGF, an important factor for angiogenesis, in endothelial cells via degradation of HIF-1 α protein. *FEBS Letters*, 575, 59-63.
- Paques, J. P, Van der Linden, E., van Rijn, C.J., & Sagis, L. M.(2014). Métodos de preparação de nanopartículas de alginato. *Avanços em colóides e interfaces em ciência*, 209, 163-171.

- Park, K., Park, H. S., Nagappan, A., Hong, G. E., Lee, D. H., Kang, S. R., Kim, J. A., Zhang, J., Kim, E. H., Won Sup Lee, W. S., Shin, S. C., Hah, Y. S., Kim, G. S. (2012). Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean Citrus aurantium L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chemistry*, 135, 2728-2735.
- Pasin, B.L., Azón, C.G., Garriga, A.M. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia e Tecnologia Alimentar*, 3, 130-151.
- Patel, D., Shukla, S., Gupta, S. (2007). Apigenin and cancer chemoprevention: progress, potential and promise. *International Journal of Oncology*; 30, 233–245.
- Pérez- Alonso, C. (2003). Estimation of the activation energy of carbohydrate polymers blends as selection criteria for their use as wall material for spray-dried microcapsules. *Carbohydrate. Polymers*, 53, 197-203.
- Pereira, E., Barros, L., Calhelha, R. C., Duenas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., (2014). Bioactivity and phytochemical characterization of *Arenaria montana* L. *Food & Function*, 5, 1848-1855
- Ré, M. I., (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology, Drying Technology: An International Journal*, 16, 1195-1236.
- Ribeiro, A., Ruphuy, G., Lopes, J. C., Dias, M. M., Barros, Barreiro M. 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.
- Saézn, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 114, 616–622.
- Sanguansri, P.; Augustin, M. A. (2006). Nanoscale materials development – a food industry perspective. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 547-556.
- Santos, A. B., Ferreira, V. P., Grosso, C. R. F. (2000). Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, 3, 26-30.

- Schrooyen, P., M. M., Van Der Meer. R., De Kruif, C. (2001). Microencapsulation: its application in nutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 60, 475-479.
- Schoubben, A.; Blasi, P.; Giovagnoli, S.; Rossi, C.; Ricci, M. (2010). Development of a scalable procedure for fine calcium alginate particle preparation. *Chemical Engeneering Journal*, 160, 363-369.
- Siemann, W. (2002). Vascular targeting agentes. *Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Beside*, 1, 4-15.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39, 1-9.
- Soares, S., E. (2002). Ácidos fenólicos Como Antioxidantes. *Revista de Nutrição*, 15, 71-81.
- Soares, P., Costa, R., Froufe, H. J. C., Calhelha, R. C., Peixoto, D., Ferreira, I. C. F. R., Queiroz, M. R. P. (2013). 1-aryl-3-[4-(thieno[3,2-d]pyrimidin-4-yloxy)phenyl]ureas as VEGFR-2 tyrosine kinase inhibitors: synthesis, biological evaluation, and molecular modelling studies. *BioMed Research International*, 56, 10-1155.
- Suave, J., Dall'agnol, E. C., Pezzin, A. P. T., Silva, D. A. K., Meier, M. M., Soldi, V., (2006). Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. *Health and Environment Journal*, 7, 12-20.
- Sun, G., McMahon, (2000). *Drug Discovery Today*, 2, 344-353.
- Ubbink, J.; Krüger, J. (2006). Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17, 244-254.
- Venkatesan, P., Manavalan, R., Valliappan, K. (2009). Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutiacal Sciences and Research*, 1, 26-35.
- Wright, J.S., Johnson, E.R., DiLabio, G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application

to major families of antioxidants. *Journal of American Chemical Society*, 123, 1173-1183.

Zhang, S., Yang a, X., Coburn, R. A., Morris, M. E. (2005). Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochemical Pharmacology*, 70, 627-639.

Zheng, L., Ding, Z., Zhang, M., Sun, J. (2011). Microencapsulation of bayberry polyphenols by ethyl cellulose: Preparation and characterization. *Journal of Food Engineering*, 104, 89-95.

6. ANEXOS



6th WORKSHOP

Green Chemistry and Nanotechnologies
in Polymer Chemistry



July 15-17, 2015

Polytechnic Institute of Bragança | PCT-TMAD Brigantia EcoPark

Bragança - Portugal

WORKSHOP PROCEEDINGS

Eds. - M. F. Barreiro, O. Ferreira, A.I. Pereira



P.52 Microencapsulation of plant extracts rich in apigenin to be used as quimiopreventive agents in functional foods

Franciely S. Oliveira^{1,2}, Ricardo C. Calhella², Isabel C.F.R. Ferreira^{2,*}, Filomena Barreiro^{1,*}, Bogdan D. Junior³

¹ Laboratory of Separation and Reaction Engineering (LSRE), Associate Laboratory LSRE/LCM, IPB, Campus de Santa Apolónia, 1134, 5301-857 Bragança, Portugal.

² Mountain Research Centre (CIMO), ESA, IPB, Campus de Santa Apolónia, 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

³ UTFPR, University Federal technological of Parana, Campus Campo Mourão Via Rosalina Maria dos Santos, 1233, +55 44 3528-1400 Campo Mourão, Paraná, Brazil.

**iferreira@ipb.pt, barreiro@ipb.pt*

Introduction

Angiogenesis is the process by which new blood vessels are formed from pre-existing vasculature, being a key process that leads to tumor development. Excessive angiogenesis occurs when diseased cells produce abnormally large amounts of angiogenesis factors [e.g. vascular endothelial growth factor (VEGF)] [1]. Some studies recognize phenolic compounds as chemopreventive agents; flavonoids seem to suppress the growth of tumor cells modifying the cell cycle and inducing apoptosis in several tumor cell lines [2]. Among them, apigenin derivatives have been recognized as having antiangiogenic effects on tumor cells being this related to a decrease in VEGF expression or to a VEGFR inhibition [3]. According to Ferreira et al. previous research, *Arenaria montana* L. [4], is rich in apigenin derivatives. Therefore, this plant source is ideal to prepare apigenin rich extracts to be used as chemopreventive agents in functional foods. However, bioactive compounds are generally recognized as presenting problems of instability, which weakens their bioavailability and potential benefits and, therefore, microencapsulation emerges as a technology offering numerous advantages towards increasing the efficacy of functional foods [5].

In this work, a hydroethanolic extract prepared from *A. montana* was evaluated for its *in vitro* antiangiogenic effects, being further microencapsulated to be used as chemopreventive agent in functional yogurts.

Experimental

The bioactive ingredient was obtained from *Arenaria montana* L. through an extraction with ethanol: water 80:20 (v/v). The obtained extract was evaluated in terms of inhibitory activity of the tyrosine kinase intracellular domain of the Vascular Endothelium Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2) through an enzymatic assay. The microspheres were prepared by using an atomization/coagulation technique where a solution of sodium alginate containing the extract (10 mL, extract/sodium alginate ratio of 50/400 (mg/mg)) was atomized through a nozzle (0.35 mm diameter) and coagulated in a calcium chloride solution (250 mL, 4% (v/v)). The forming microspheres were characterized by optical microscopy (OM) during the microencapsulation process to monitor morphology evolution. The encapsulation efficiency (EE) was evaluated by HPLC-DAD based on apigenin (the major extract's aglycone), and the effective incorporation in the alginate matrix verified by FTIR analysis. Additionally, free and microencapsulated extracts were incorporated in yogurt samples that were thereafter evaluated in terms of *in vitro* antiangiogenic activity and nutritional composition at two different storage times (0 and 3 days).

Results and discussion

The *A. montana* extract showed capacity to inhibit the phosphorylation of VEGFR-2 ($IC_{50} \approx 63.13 \mu\text{g/ml}$), according to the performed enzymatic fluorescence resonance energy transfer (FRET)-

Microencapsulação de extratos naturais ricos em flavonoides visando o desenvolvimento de alimentos funcionais com propriedades quimiopreventivas

based assay. This extract was microencapsulated and the obtained microspheres were observed by OM immediately after the atomization and after 4 hours in contact with the coagulation solution (Fig 1). This analysis confirms that the process was successful. The microspheres had a spherical morphology and individualized structures. It was also observed that the extract was well distributed in microspheres. The EE was determined through an indirect method by quantifying the major aglycone in the extract (apigenin) present in the coagulation and washing solutions. Its absence in the analysed solutions allowed an evaluation of EE around 100%. The FTIR analysis confirmed the presence of the extract inside the microspheres.

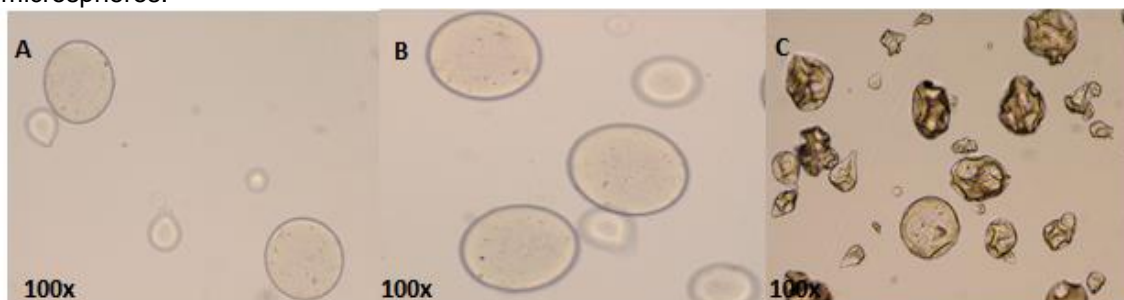


Fig.1. **A-** Observation of the microspheres after spray; **B-** Observation of the microspheres after coagulation; **C-** Observation of the microspheres after lyophilization.

The amount of the extract (free or microencapsulated) incorporated in yogurt samples was twice the IC₅₀ value which is in accordance with apigenin daily recommended dose and its relative concentration in the extract (48%).

Conclusions

The atomization/coagulation technique allowed the production of viable microspheres enriched with the plant extract. This final ingredient was effectively incorporated into yogurts, protecting the extract and envisaging the development of novel functional foods with chemopreventive effects. The characterization of the prepared yogurt samples (control, with free extract and with microencapsulated extract) is in course.

Acknowledgements

FCT for financial support to CIMO (Project PEst-OE/AGR/UI0690/2014). FCT/MEC and FEDER under Program PT2020 for financial support to LSRE (Project UID/EQU/50020/2013). QREN, ON2 and FEDER (NORTE-07-0124-FEDER-000014) and PRODER (Project nº 46577-PlantLact). The authors also thank Ana Maria Carvalho for providing *Arenaria montana* L. samples.

References

- [1] T.-P. Fan, J.-C. Yeh, K. H. Leung, P. Y. K. Yue and R. N. S Wong, *Trend. Pharmacol. Sci.*, 27, (2006), 297-309.
- [2] C. Kandaswami, L.T. Lee, P. P. Lee, J. J. Hwang, F. C. Ke, Y. T. Huang and M. T. Lee, *In Vivo*, 19, (2005), 895-909.
- [3] M. Osada, S. Imaoka, Y. Funae, *FEBS Lett.*, 575, (2004), 59-63.
- [4] E. Pereira, L. Barros, R.C. Calhelha, M. Dueñas, A.M. Carvalho, C. Santos-Buelga, I.C.F.R. Ferreira. *Food Func.*, 5, (2014), 1848-1855.
- [5] M.I. Dias, I.C.F.R. Ferreira, M.F. Barreiro, *Food Func.*, 6, (2015), 1035-1052.

Introduction

- ✓ Angiogenesis is the process by which new blood vessels are formed from pre-existing vasculature, being a key process that leads to tumor development.
- ✓ Some studies recognize phenolic compounds as chemopreventive agents; apigenin (Fig 1) derivatives have been recognized as having antiangiogenic effects on tumor cells being this related to a decrease in VEGF expression or to a VEGFR inhibition.
- ✓ *Arenaria montana* L. (Fig 2) is rich in apigenin derivatives. This plant source is ideal to prepare apigenin rich extracts to be used as chemopreventive agents in functional foods.
- ✓ However, bioactive compounds are generally recognized as presenting problems of instability, which can weaken their bioavailability and potential benefits.
- ✓ Therefore, the use of microencapsulation is studied here as a way to confer protection and increasing the efficacy of functional foods incorporating these extracts.
- ✓ In this work, a hydroethanolic extract prepared from *A. montana* was evaluated for its *in vitro* antiangiogenic effects, being further microencapsulated to be used as chemopreventive agent in functional yogurts.

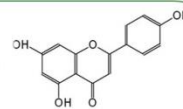


Fig 1. Structure of apigenin



Fig 2. *Arenaria montana* L.

Experimental

- ✓ The bioactive ingredient was obtained from *Arenaria montana* L. through extraction with ethanol: water 80:20 (v/v).
- ✓ The extract was evaluated in terms of inhibitory activity of the tyrosine kinase intracellular domain of the Vascular Endothelium Growth Factor Receptor-2 (VEGFR-2) through an enzymatic assay.
- ✓ The microspheres were prepared by using an atomization/coagulation technique (Fig. 3) where a solution of sodium alginate containing extract (10 mL, extract/sodium alginate ratio of 50/400 (mg/mg)) was atomized through a nozzle (0.35 mm diameter) and coagulated in a calcium chloride solution (250 mL, 4% (v/v)).
- ✓ The forming microspheres were characterized by optical microscopy (OM) during the microencapsulation process to monitor morphology evolution.
- ✓ The encapsulation efficiency (EE) was evaluated by HPLC-DAD based on apigenin (the major extract's aglycone).
- ✓ Additionally, free and microencapsulated extracts were incorporated into yogurt samples that were thereafter evaluated in terms of *in vitro* antiangiogenic activity and nutritional composition at two different storage times (0 and 3 days).

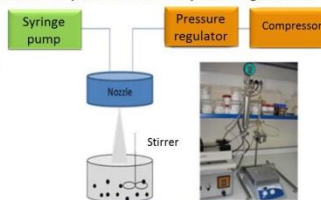


Fig 3. Nisco Var J30 system

Results

- ✓ The *A. montana* extract showed capacity to inhibit the phosphorylation of VEGFR-2 (IC_{50} =63.13 μ g/ml), according to the performed enzymatic fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based assay.
- ✓ Figure 4 shows microspheres after the atomization, after 4 hours in contact with the coagulation solution and after lyophilization (storage form). Was confirmed that the process was conducted successfully. The observed microspheres had a spherical morphology and no agglomeration was detected (they were presented as individualized structures).
- ✓ The determined EE pointed out a value reaching 100% since no apigenin (the major extract's aglycone) was detected, both in the coagulation and washing solutions.
- ✓ The amount of the incorporated extract in the yogurt samples (free or microencapsulated) was twice the IC_{50} value which is in accordance with the apigenin daily recommended dose and its relative concentration in the extract (48%, w/w).
- ✓ For the yogurt added with the free form, and comparatively with the microencapsulated form, an initially higher antiangiogenic activity was observed. Nevertheless, a decrease was observed for t3 (3 days), which can be associated with the extract degradation. On the contrary, in the case of using the microencapsulated form, an increase of antiangiogenic activity was observed from t0 (initial time) to t3.

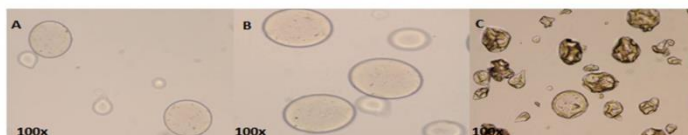


Fig.4. Optical microscopy of the microcapsules along the microencapsulation process: A- Microspheres after being sprayed (initial time of the coagulation process); B- Microspheres after coagulation; C- Microspheres after lyophilization (storage form).

Conclusions

- ✓ The atomization/coagulation technique allowed the production of viable microspheres enriched with the plant extract.
- ✓ This final ingredient was effectively incorporated into yogurts, protecting the extract and envisaging the development of novel functional foods with chemopreventive effects.
- ✓ The evaluation of the nutritional composition is under progress.

