



**MICOESTERÓIS COMO AGENTES FUNCIONALIZANTES:  
ENSAIOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO ERGOSTEROL,  
ESTABILIZAÇÃO DE EXTRATOS DE MICOESTERÓIS E  
DESENVOLVIMENTO DE APLICAÇÕES**

**Cristhian Rafael Lopes Francisco**

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

**Orientadores**

Isabel C.F.R. Ferreira

Maria Filomena F. Barreiro

Odinei Hess Gonçalves

**Bragança**

**2017**



E será que, se ouvires a voz do SENHOR teu Deus, tendo cuidado de guardar todos os seus mandamentos que eu hoje te ordeno, o SENHOR teu Deus te exaltará sobre todas as nações da terra.

(Deuteronômio 28:1).



## DEDICATÓRIA

Dedico esta Dissertação a Deus e minha família, Josue meu pai, Elizabete minha mãe e Mariane minha irmã, que em todo tempo foram meu socorro e minha força.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu forças e sabedoria para que este trabalho fosse concluído, pelas oportunidades que Ele preparou e pelo carinho que me sustentou todos os dias.

Sou imensamente grato a minha família, meu pai Josue, minha mãe Elizabete e minha irmã Mariane, que me apoiaram em todos os momentos, e nas horas difíceis trouxeram as palavras que meu coração precisava. Vocês fazem parte de mim hoje e para sempre.

Quero também agradecer as minhas orientadoras em Portugal, professoras Maria Filomena F. Barreiro e Isabel C.F.R. Ferreira pela oportunidade e apoio, sou imensamente grato pela forma que fui recebido e pela confiança que depositaram em mim. Sou grato ao meu orientador no Brasil, professor Odinei Hess Gonçalves por todas as contribuições dadas a esse trabalho e pelo apoio que me deu para que eu participasse deste projeto, muito obrigado.

Agradeço aos meus amigos da UTFPR-CM que foram minha companhia no dia-a-dia, nas várias horas de estudo, nas tristezas, nas alegrias, e durante minha estada em Portugal, foram presentes mesmo distantes. Um agradecimento especial também aos amigos que fiz em Portugal, quero agradecer especialmente a Sandrina que desde o início me auxiliou no laboratório e pessoalmente. Meu muito obrigado também se estende a Isabel e Lillian que sempre estiveram disponíveis para esclarecer dúvidas e muito contribuíram para este trabalho.

Agradeço também a todos os pesquisadores do BioChemCore e LSRE-LCM pela prontidão em me prestar ajuda. Aprendi muito com todos e levarei seus ensinamentos para sempre.

Externo meus agradecimentos à Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Campo Mourão e ao Instituto Politécnico de Bragança pela oportunidade e suporte durante a minha estada em Portugal. Muito obrigado também a todos os professores de ambas as instituições.

Este trabalho foi em parte financiado por:

Projeto POCI-01-0145-FEDER-006984 - LA LSRE-LCM - financiado pelo FEDER, através do POCI-COMPETE2020 e por fundos nacionais através da FCT.

Projeto NORTE-01-0145-FEDER-000006 financiado pelo Norte 2020, através do FEDER e FSE, com o Acordo de Parceria PT2020.



## ÍNDICE

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>v</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>xiii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>xv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>xvii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xxiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>5</b>
2.1. MICOESTERÓIS COMO BIOATIVOS .....	7
2.1.1. Estruturas químicas e vias biossintéticas.....	7
2.1.2. Propriedades bioativas .....	10
2.1.3. Alternativa aos fitoesteróis como agentes funcionalizantes.....	11
2.2. BIODISPONIBILIDADE NO ORGANISMO HUMANO .....	12
2.2.1. Principais problemas associados à biodisponibilidade de esteróis .....	12
2.2.1.1. Absorção e metabolismo de esteróis .....	12
2.2.2. Efeitos de esteróis na absorção intestinal do colesterol .....	14
2.2.2.1. Efeitos físico-químicos.....	14
2.2.2.1.1. Co-cristalização de colesterol e outros esteróis .....	14
2.2.2.1.2. Competição entre colesterol e outros esteróis pela solubilização em micelas .....	15
2.2.2.2. Efeito no local de absorção.....	15
2.2.3. Técnicas de modificação química.....	16
2.3. ESTABILIDADE E SOLUBILIDADE DE MICOESTERÓIS .....	17
2.3.1. Principais problemas.....	17
2.3.2. Principais soluções .....	18
2.3.2.1. Micro e nano encapsulação.....	18
2.3.2.2. Técnicas de emulsificação .....	19
2.4. TÉCNICA DE <i>SPRAY DRYING</i> .....	21
2.4.1. Aplicação na área alimentar.....	22
2.4.2. Técnicas de caracterização.....	25
2.5. TÉCNICA DE RETICULAÇÃO DE BIOPOLÍMEROS .....	25
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
3.1. PADRÕES E REAGENTES.....	31

3.2. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA MOLÉCULA DE ERGOSTEROL.....	32
3.2.1. Acetilação do ergosterol .....	32
3.2.2. Esterificação do ergosterol com ácido mirístico.....	32
3.2.3. Metilação do ergosterol.....	33
3.2.4. Cromatografia em camada delgada (TLC) e purificação dos produtos por cromatografia em coluna.....	34
3.2.5. Elucidação estrutural das moléculas obtidas por modificação química .....	35
3.2.6. Avaliação de propriedades bioativas.....	35
3.2.6.1. Atividade captadora de radicais DPPH .....	35
3.2.6.2. Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais humanas .....	36
3.2.6.3. Atividade citotóxica em células não tumorais .....	36
3.2.6.4. Atividade anti-inflamatória.....	37
3.3. MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE <i>A. BISPORUS</i> PELA TÉCNICA DE SPRAY DRYING .....	38
3.3.1. Amostras de <i>Agaricus bisporus</i> L. ....	38
3.3.2. Obtenção dos extratos.....	38
3.3.3. Quantificação de ergosterol.....	39
3.3.4. Avaliação da reatividade do ácido cítrico com a maltodextrina e com o extrato e da estabilidade térmica do extrato às condições de encapsulação .....	40
3.3.5. Estudos de microencapsulação .....	40
3.3.6. Caracterização das microesferas .....	42
3.3.6.1. Rendimento de encapsulação (R).....	42
3.3.6.2. Eficiência de Encapsulação (EE) .....	42
3.3.6.3. Carga em extrato ( $C_{ext}$ ).....	43
3.3.6.4. Caracterização biológica .....	43
3.3.6.5. Caracterização do tamanho de partícula.....	43
3.3.7. Análise Termogravimétrica (TGA) .....	43
3.3.8. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	44
3.4. FUNCIONALIZAÇÃO DE MATRIZES ALIMENTARES LIPOFÍLICAS E HIDROFÍLICAS COM MICOESTERÓIS .....	44
3.4.1. Incorporação do ergosterol e seu derivado acetilado em maionese .....	44
3.4.2. Incorporação de extrato de <i>Agaricus bisporus</i> com micoesteróis, na forma livre e microencapsulada em iogurte.....	45
3.4.3. Avaliação nutricional e das propriedades bioativas dos produtos finais .....	46
3.4.3.1. Composição centesimal .....	46
3.4.3.2. Açúcares livres.....	46

3.4.3.3. Ácidos gordos .....	47
3.4.3.4. Propriedades bioativas.....	47
3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	48
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>49</b>
4.1. MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA MOLÉCULA DE ERGOSTEROL.....	51
4.1.1. Elucidação estrutural das moléculas obtidas por síntese química.....	51
4.1.2. Avaliação das propriedades bioativas do ergosterol e derivados .....	54
4.2. MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATO DE <i>AGARICUS BISPORUS</i> PELA TÉCNICA DE <i>SPRAY DRYING</i> .....	57
4.2.1. Rendimento e eficiência de encapsulação do processo e carga em extrato das microesferas.....	57
4.2.2. Caracterização do tamanho de partícula para as microesferas obtidas .....	57
4.2.3. Análise termogravimétrica (TGA) .....	59
4.2.3.1. Caracterização dos materiais de base .....	59
4.2.3.2. Análise dos microencapsulados obtidos .....	61
4.2.4. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	63
4.2.4.1. Caracterização dos materiais de base e das microesferas produzidas .....	63
4.2.4.2. Ensaio de reticulação dos componentes individuais (maltodextrina e extrato) com o ácido cítrico .....	66
4.2.5. Propriedades bioativas do extrato de <i>Agaricus bisporus</i> livre e microencapsulado	68
4.3. FUNCIONALIZAÇÃO DE MATRIZES ALIMENTARES LIPOFÍLICAS E HIDROFÍLICAS COM MICOESTERÓIS .....	71
4.3.1. Incorporação do ergosterol e seu derivado acetilado em maionese .....	71
4.3.1.1. Avaliação nutricional de maionese incorporada de ergosterol e seu derivado acetilado .....	71
4.3.1.2. Avaliação das propriedades bioativas de maionese incorporada com ergosterol e seu derivado acetilado .....	72
4.3.2. Incorporação de extrato de <i>A. bisporus</i> com micoesteróis, na forma livre e microencapsulada em iogurte.....	77
4.3.2.1. Avaliação nutricional do iogurte incorporado com extrato de <i>A. bisporus</i> na forma livre e microencapsulada. ....	77
4.3.3. Avaliação das propriedades bioativas do iogurte incorporado com extrato de <i>Agaricus bisporus</i> na forma livre e microencapsulada.....	78
<b>5. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO .....</b>	<b>83</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>89</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do ergosterol. ....	9
<b>Figura 2.</b> Conversão de lanosterol em ergosterol. ....	9
<b>Figura 3.</b> Via Biosintética simplificada de esteróis em fungos. ....	10
<b>Figura 4.</b> Esquema resumindo o metabolismo do colesterol e outros esteróis. ....	13
<b>Figura 5.</b> Ilustração esquemática das morfologias de microesfera (a) e microcápsula (b). .....	19
<b>Figura 6.</b> Reação de reticulação entre ácido cítrico e maltodextrina. ....	27
<b>Figura 7.</b> Reação de síntese química de ergosterol acetilado. ....	32
<b>Figura 8.</b> Reação de síntese química de ergosterol esterificado com ácido mirístico. ..	33
<b>Figura 9.</b> Reação de síntese química de ergosterol metilado. ....	34
<b>Figura 10.</b> Esquematização do processo de encapsulação do extrato pela técnica de <i>spray drying</i> . ....	41
<b>Figura 11.</b> Espectro de <sup>1</sup> HRMN da molécula de ergosterol. ....	51
<b>Figura 12.</b> Espectro de <sup>1</sup> HRMN da molécula de ergosterol acetilada. ....	52
<b>Figura 13.</b> Espectro de <sup>1</sup> HRMN da molécula obtida pela reação de esterificação do ergosterol com ácido mirístico. ....	53
<b>Figura 14.</b> Espectro de <sup>1</sup> HRMN da molécula de ergosterol metilada. ....	54
<b>Figura 15.</b> Distribuição do tamanho de partícula das microesferas obtidas pela técnica de <i>spray drying</i> . Distribuição em volume para as esferas com e sem tratamento (A) Distribuição em número para as esferas com e sem tratamento (B). ....	58
<b>Figura 16.</b> Espectros de degradação da maltodextrina (A), ácido cítrico (B), Extrato (C) e Tween 20 (D). ....	60
<b>Figura 17.</b> Espectro de degradação do extrato de <i>Agaricus bisporus</i> sem (EXT-ST) e com tratamento térmico (EXT-CT). ....	61
<b>Figura 18.</b> Espectro de degradação das esferas vazias (A e B) e das esferas contendo extrato (C e D). ....	63
<b>Figura 19.</b> Espectros de infravermelho obtidos para os materiais de base (EXT, MAL, AC) e microesferas (ESF-CT). ....	65
<b>Figura 20.</b> Espectros de infravermelho da maltodextrina sem tratamento (MAL-ST), maltodextrina com tratamento (MAL-CT) e maltodextrina com ácido cítrico com tratamento (MAL+AC-CT) ....	67

**Figura 21.** Espectros de infravermelho do extrato sem tratamento (EXT-ST), extrato com tratamento (EXT-CT) e extrato com ácido cítrico com tratamento (EXT+AC-CT).

..... 68

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Concentração de ergosterol em diferentes espécies de cogumelos comestíveis .....	8
<b>Tabela 2.</b> Aplicações da técnica de <i>spray drying</i> na área alimentar e parâmetros do processo.....	24
<b>Tabela 3.</b> Quantidade de ergosterol (ERG) ou ergosterol acetilado (E-ACT) incorporada em maionese. ....	45
<b>Tabela 4.</b> Quantidade de extrato (EXT) ou extrato microencapsulado (ESFE-ST e ESF-CT) incorporada em iogurte. ....	45
<b>Tabela 5.</b> Propriedades bioativas do ergosterol e dos seus derivados obtidos por síntese química. ....	56
<b>Tabela 6.</b> Valores de D <sub>10</sub> , D <sub>50</sub> e D <sub>90</sub> obtidos para as distribuições em volume e em número das microesferas obtidas. ....	58
<b>Tabela 7.</b> Propriedades bioativas do extrato de <i>Agaricus bisporus</i> , do extrato microencapsulado e das microesferas vazias. ....	70
<b>Tabela 8.</b> Perfil nutricional e energético das amostras de maionese analisadas. ....	74
<b>Tabela 9.</b> Perfil de ácidos gordos das amostras de maionese analisadas ao longo do período de armazenamento.....	75
<b>Tabela 10.</b> Propriedades bioativas das amostras de maionese analisadas ao longo do período de armazenamento.....	76
<b>Tabela 11.</b> Valor nutricional das amostras de iogurte analisadas ao longo do período de armazenamento. ....	80
<b>Tabela 12.</b> Perfil de ácidos gordos das amostras de iogurte analisadas ao longo do período de armazenamento.....	81
<b>Tabela 13.</b> Propriedades bioativas das amostras de iogurte analisadas ao longo do período de armazenamento.....	82



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABCG</b>	<i>ATP-binding cassette sub-family G</i> - transportadores de “cassetes de ligação de ATP sub-família G”.
<b>AC</b>	Ácido cítrico.
<b>ACAT</b>	Acil-CoA:colesterol aciltransferase.
<b>ACR</b>	Atividade captadora de radicais.
<b>AG</b>	Ácido gordo.
<b>ApoB</b>	Apolipoproteína B.
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato.
<b>A<sub>A</sub></b>	Absorvância da solução contendo a amostra.
<b>A<sub>DPPH</sub></b>	Absorvância da solução de DPPH.
<b>A<sub>w</sub></b>	Atividade de água.
<b>C</b>	Colesterol.
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	Clorofórmio deuterado.
<b>C<sub>ext</sub></b>	Carga em extrato.
<b>CoA</b>	Coenzima A.
<b>DE</b>	Dextrose Equivalente.
<b>DMEM</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - “Meio Eagle modificado por Dulbecco”.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido.
<b>DPPH</b>	2,2 Difenil-1-picril-hidrazilo.
<b>DSC</b>	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> – “Calorimetria Diferencial de Varredura”.
<b>DTG</b>	Termogravimetria Derivada.
<b>E</b>	Energia.
<b>EC</b>	Éster de colesterol.
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração responsável por 50% da atividade captadora de radicais DPPH.
<b>EE</b>	Eficiência de encapsulação.
<b>e<sub>f</sub></b>	Massa de esferas formadas.
<b>Eq</b>	Equivalente.
<b>EXT</b>	Extrato de <i>Agaricus bisporus</i> .

<b>EXT<sub>experimental</sub></b>	Massa de extrato experimental.
<b>EXT-CT</b>	Extrato de <i>Agaricus bisporus</i> submetido a tratamento térmico em estufa.
<b>EXT-ST</b>	Extrato de <i>Agaricus bisporus</i> não submetido a tratamento térmico em estufa.
<b>EXT+AC-CT</b>	Extrato de <i>Agaricus bisporus</i> e ácido cítrico submetidos a tratamento térmico em estufa.
<b>ERG</b>	Ergosterol 98%.
<b>ERG<sub>experimental</sub></b>	Massa de ergosterol experimental.
<b>ERG<sub>teórica</sub></b>	Massa de ergosterol teórica.
<b>E-ACT</b>	Molécula de ergosterol acetilada.
<b>E-EST</b>	Molécula de ergosterol esterificada com ácido gordo.
<b>E-MET</b>	Molécula de ergosterol metilada.
<b>ESF-CT</b>	Microesferas contendo extrato tratadas termicamente.
<b>ESF-ST</b>	Microesferas contendo extrato não tratadas termicamente.
<b>ESFV-CT</b>	Microesferas vazias tratadas termicamente.
<b>ESFV-ST</b>	Microesferas vazias não tratadas termicamente.
<b>FBS</b>	<i>Fetal Bovine Serum</i> - “Soro Fetal Bovino”.
<b>FTIR</b>	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier.
<b>g</b>	Massa de gordura.
<b>GI<sub>50</sub></b>	Concentração responsável por 50% da inibição do crescimento celular.
<b>HBSS</b>	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> - “Solução Salina Equilibrada de Hank”.
<b>hc</b>	Massa de hidratos de carbono.
<b>HDL</b>	<i>High Density Lipoprotein</i> – “Lipoproteína de alta densidade”.
<b>HeLa</b>	Linha celular humana de carcinoma cervical.
<b>HepG2</b>	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular.
<b>HPLC</b>	<i>High-performance Liquid Chromatography</i> - “Cromatografia Líquida de Alta Eficiência”.
<b>Hz</b>	Hertz.
<b><sup>1</sup>HRMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Protão.
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração responsável por 50% da inibição da produção de NO.

<b>ICN</b>	Iogurte controlo negativo.
<b>ICP</b>	Iogurte controlo positivo.
<b>IESF-CT</b>	Iogurte incorporado com microesferas contendo extrato tratadas termicamente.
<b>IESF-ST</b>	Iogurte incorporado com microesferas contendo extrato não tratadas termicamente.
<b>IR</b>	Índice de Refração.
<b>LDL</b>	<i>Low Density Lipoprotein</i> – “Lipoproteína de baixa densidade”.
<b>LPS</b>	Lipopolissacárido.
<b>M</b>	Molar (mol/L).
<b>MAL</b>	Maltodextrina.
<b>MAL-CT</b>	Maltodextrina submetida a tratamento térmico em estufa.
<b>MAL-ST</b>	Maltodextrina não submetida a tratamento térmico em estufa.
<b>MAL+AC-CT</b>	Maltodextrina e ácido cítrico submetidos a tratamento térmico em estufa.
<b>MCF-7</b>	Linha celular humana de adenocarcinoma de mama.
<b>MCN</b>	Maionese controlo negativo.
<b>MCP</b>	Maionese controlo positivo.
<b>ME-ACT</b>	Maionese incorporada com ergosterol acetilado.
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varrimento.
<b>M<sub>f</sub></b>	Soma das massas finais dos materiais utilizados na encapsulação.
<b>M<sub>i</sub></b>	Soma das massas iniciais dos materiais utilizados na encapsulação.
<b>ms</b>	Massa seca.
<b>MUFA</b>	<i>Monounsaturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos monoinsaturados”.
<b>m/m</b>	Massa/massa.
<b>m.e/p.a</b>	Material encapsulante/princípio ativo.
<b>NCI-H460</b>	Linha celular humana de carcinoma de pulmão.
<b>ND</b>	Não disponível.
<b>NED</b>	N-(1-naftil).
<b>NO</b>	Óxido nítrico.
<b>NPC1L1</b>	<i>Niemman Pick C1 Like 1</i> .
<b>p</b>	Massa de proteína.
<b>p.a</b>	Percentagem de princípio ativo.

<b>PLP2</b>	<i>Porcine liver primary culture</i> - “cultura primária de células de fígado de porco”.
<b>ppm</b>	Partes por milhão.
<b>PTM</b>	Proteína de transferência de triglicéridos microsomal.
<b>PUFA</b>	<i>Polyunsaturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos polinsaturados”.
<b>SFA</b>	<i>Saturated fatty acids</i> – “Ácidos gordos saturados”.
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B.
<b>TAG</b>	Triacilglicerol.
<b>Te</b>	Temperatura de entrada.
<b>TG</b>	Termogravimetria.
<b>TGA</b>	<i>Thermogravimetric analysis</i> – “Análise Termogravimétrica”.
<b>TLC</b>	<i>Thin-layer chromatography</i> – “Cromatografia em camada delgada”.
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano.
<b>Ts</b>	Temperatura de saída.
<b>Tris</b>	Trisaminometano.
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico.
<b>R</b>	Rendimento.
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>v/v</b>	Volume/volume.
<b>VLDL</b>	<i>Very Low Density Lipoprotein</i> – “Lipoproteína de muita baixa densidade”.
<b>W</b>	Watt.
<b>XDR</b>	<i>X-ray Powder Diffraction</i> – “Difração de raios X”.
<b>δ</b>	Desvio químico.

## RESUMO

O ergosterol é o esteroide maioritário em cogumelos que apresenta diversos efeitos bioativos, nomeadamente atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. Devido à semelhança estrutural com os fitoesteróis, acredita-se que o ergosterol atue de forma idêntica na diminuição dos níveis de colesterol sanguíneo. No entanto, a sua solubilidade limitada, simultaneamente em meio aquoso e em meio lipídico, limita a sua aplicação direta em formulações alimentares. Através de reações de modificação química, nomeadamente acetilação, metilação e esterificação, é possível aumentar a solubilidade desta molécula em meio apolar, o que poderá também resultar num aumento da sua bioatividade e/ou biodisponibilidade. Adicionalmente, uma abordagem interessante para a aplicação do ergosterol ou extratos ricos neste, em formulações maioritariamente aquosas como o iogurte, consiste na sua encapsulação com uma matriz hidrofílica, por exemplo através da técnica de *spray drying*, o que permitirá maior compatibilidade deste com o alimento em questão, além de preservar as suas propriedades bioativas. Assim, o presente trabalho teve como objetivos: (i) modificar quimicamente o ergosterol visando melhorar a sua compatibilidade com matrizes alimentares lipofílicas e aumentar a sua bioatividade; (ii) encapsular extratos de *Agaricus bisporus* ricos em microesteróis, nomeadamente ergosterol, através da técnica de *spray drying*, tendo-se estudado para o efeito um sistema químico onde a maltodextrina foi reticulada com ácido cítrico. Como último passo, foram desenvolvidas duas aplicações finais: (i) maionese enriquecida com ergosterol modificado quimicamente, tendo-se selecionado para o efeito o composto modificado que apresentou maior bioatividade (ergosterol acetilado); (ii) iogurte enriquecido com microesteróis onde o efeito da encapsulação foi avaliado em termos da bioatividade do produto final e performance comparativa com o extrato incorporado na forma livre. Os resultados obtidos permitiram avaliar as estratégias aplicadas (modificação química e microencapsulação) como promissoras para suportar o desenvolvimento de alimentos enriquecidos com ergosterol/microesteróis onde a sua bioatividade é preservada, ou mesmo incrementada.



## ABSTRACT

Ergosterol is a fungal sterol that shows different bioactive effects mainly antioxidant, anti-inflammatory and antitumor activities. Due to the structural similarity with phytosterols, it is believed that ergosterol acts identically in the decrease of blood cholesterol levels. However, its insolubility, both in aqueous and lipid media, limits its direct application in food formulations. Through chemical modification, namely acetylation, methylation and esterification, it is possible to increase the solubility of this molecule in non-polar media, which may also increase its bioactivity and/or bioavailability. Moreover, an interesting approach for the application of ergosterol itself and ergosterol rich extracts in hydrophilic formulations, such as yogurt, is the encapsulation by *spray drying*, which will allow to increase compatibility with the food matrix, besides preserving its bioactive properties. Thus, the present work had the following objectives: (i) to chemically modify ergosterol in order to improve its compatibility with lipophilic food matrices and to increase its bioactivity; (ii) to encapsulate extracts of *Agaricus bisporus* rich in mycoesterols, namely ergosterol, through the *spray drying* technique, where a chemical system based on maltodextrin crosslinked with citric acid was studied. As a final step, two final applications were developed: (i) mayonnaise enriched with chemically modified ergosterol, being selected the modified form having the highest bioactivity among the produced ones (acetylated form); (ii) yoghurt enriched with mycoesterols where the effect of encapsulation was evaluated in terms of the bioactivity of the final product and comparative performance with the yoghurt incorporated with the free form. The results obtained allowed to evaluate the applied strategies (chemical modification and microencapsulation) as promising ones able to support the development of foods enriched with ergosterol/mycoesterols, where bioactivity is preserved, or even increased.



# 1.INTRODUÇÃO





## **Motivação e objetivos**

O ergosterol, esteroide maioritário em fungos, segundo diversos estudos, apresenta efeitos bioativos de grande interesse, nomeadamente atividade antioxidante, antitumoral, anti-inflamatória e hipocolesterolémica que tornam sua aplicação em alimentos funcionais uma abordagem promissora. A modificação química dessa molécula pode atuar de forma a melhorar sua atividade bioativa além de torná-la mais compatível com matrizes alimentares lipídicas, como a maionese. Dessa forma, a incorporação desses produtos de síntese química em alimentos proporcionaria aos consumidores a disponibilidade de alimentos que apresentam maiores efeitos benéficos à saúde.

O interesse atual no uso de extratos de *Agaricus bisporus*, o cogumelo de maior consumo mundial, ocorre devido ao seu elevado valor nutricional e sua composição em substâncias bioativas, nomeadamente o ergosterol. Para a incorporação de extratos em alimentos deve ser assegurada a manutenção da sua bioatividade e a sua compatibilidade com a matriz alimentar. Para isso, as técnicas de encapsulação são capazes de preservar o princípio ativo encapsulado, além de possibilitar o aumento da sua compatibilidade com meios aquosos, nomeadamente iogurte, uma bebida mundialmente consumida.

Em concreto, a incorporação de produtos de síntese química e extratos ricos em ergosterol em matrizes alimentares como maionese e iogurte, respetivamente, numa perspectiva futura, representa uma alternativa para os princípios ativos que enriquecem alimentos já disponíveis atualmente, promovendo assim maior variedade e competitividade no mercado, conseqüentemente também a diminuição de preços.

### **Objetivo geral:**

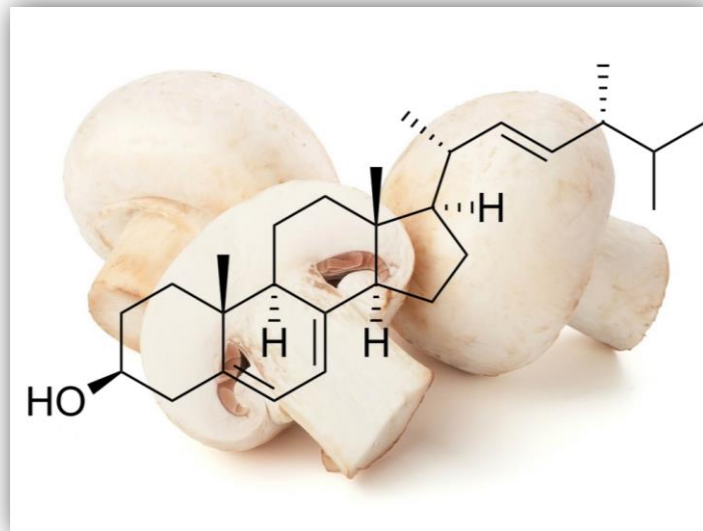
Desenvolvimento de alimentos funcionais com base em micoesteróis:

- i) matrizes alimentares lipofílicas, nomeadamente maionese, enriquecida com derivados da molécula de ergosterol obtidos por síntese química;
- ii) matrizes alimentares hidrofílicas, nomeadamente iogurte, fortificado com extratos de *Agaricus bisporus* ricos em micoesteróis, na forma livre e após microencapsulação por *spray drying*.

**Objetivos específicos:**

- Modificação química da molécula de ergosterol através de reações de acetilação, esterificação com um ácido gordo e metilação, no sentido de aumentar a bioatividade da molécula precursora e torná-la mais compatível com matrizes lipofílicas;
- Elucidação estrutural dos compostos sintetizados e avaliação da sua atividade antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória;
- Incorporação dos compostos sintetizados em maionese e estudos nutricionais e de bioatividade comparativos com maionese fortificada com ergosterol;
- Obtenção de extratos de *Agaricus bisporus* ricos em micoesteróis utilizando extração assistida por ultrassons em condições previamente otimizadas;
- Avaliação das propriedades antioxidantes, antitumorais e anti-inflamatórias dos extratos obtidos;
- Desenvolvimento de um processo de microencapsulação para aplicar na estabilização dos extratos obtidos, nomeadamente melhorar a compatibilidade com matrizes alimentares hidrofílicas. Em específico, estudar a reticulação da maltodextrina com ácido cítrico utilizando a técnica de *spray drying* e avaliar as vantagens da utilização de uma etapa de pós-tratamento térmico;
- Caracterização do processo de microencapsulação quanto ao rendimento e eficiência de encapsulação e as microesferas obtidas quanto à carga em extrato, morfologia (MOP), análise térmica (TG/DTG) e análise química/estrutural (FTIR);
- Incorporação das microesferas contendo extrato em iogurtes e estudos comparativos com o iogurte enriquecido com o extrato na forma livre, em termos nutricionais e bioatividade.

## 2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



<http://bit.ly/2rXQuBh>



## 2.1. Micoesteróis como bioativos

Os cogumelos são consumidos em todo o mundo sendo apreciados principalmente devido à sua textura, aroma e sabor característicos. Além de propriedades sensoriais diferenciadas, apresentam um elevado valor nutricional. São constituídos por proteínas contendo todos os aminoácidos essenciais e apresentam um baixo teor de lípidos. A sua composição compreende ainda quantidades relativamente elevadas de glúcidos e fibras e quantidades significativas de minerais e vitaminas como tiamina e riboflavina, ácido ascórbico e vitamina D<sub>2</sub> (LEAL *et al.*, 2013; NDUNGUTSE *et al.*, 2015).

Os cogumelos são reconhecidos mundialmente, não apenas pela sua importância culinária, mas também devido à presença de componentes bioativos na sua composição nomeadamente, compostos fenólicos, terpenos, esteróis e polissacáridos que segundo diversos estudos apresentam atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, anti-hiperlipidémicas, anti-hiperglicémicas, antimicrobianas e antivirais (BARROS *et al.*, 2007; BOK *et al.*, 1999; LIU *et al.*, 2012; NDUNGUTSE *et al.*, 2015; TAOFIQ *et al.*, 2016).

Dentro destes componentes bioativos destacam-se os micoesteróis, substâncias constituintes da membrana celular dos fungos estruturalmente semelhantes ao colesterol e aos fitoesteróis (GIL-RAMÍREZ *et al.*, 2014).

### 2.1.1. Estruturas químicas e vias biossintéticas

Os esteróis pertencem à classe dos esteróides e a sua estrutura química é composta por quatro anéis ligados entre si, sendo que três correspondem ao ciclo-hexano e um ao ciclopentano; ligado ao carbono C<sub>3</sub> está um grupo hidroxilo. Na maioria destes compostos, os grupos metilo estão presentes nos carbonos C<sub>10</sub> e C<sub>13</sub>, podendo também apresentar um grupo alquilo ligado ao C<sub>17</sub>. Os esteróis encontram-se em diferentes matrizes na natureza, sendo classificados como zooesteróis, fitoesteróis ou micoesteróis quando isolados de animais, plantas ou fungos/leveduras, respetivamente (BARREIRA & FERREIRA, 2015).

Na natureza os esteróis podem ser encontrados na sua forma livre ou conjugados. Quando conjugados, o grupo 3 $\beta$ -hidroxilo pode estar esterificado com um ácido gordo

ou com o ácido hidroxicinâmico, ou glucosilado com uma hexose ou 6-acil hexose<sup>1</sup> (BARREIRA *et al.*, 2014). Dos micosteróis, o ergosterol (ergosta-5,7,22-trien-3 $\beta$ -ol) é o mais abundante representando cerca de 80% (m/m) dos esteróis encontrados em cogumelos (GIL-RAMÍREZ *et al.*, 2014). O ergosterol (**Figura 1**) pode ser encontrado livre ou esterificado, sendo a proporção destas duas formas variável e dependente da espécie, tecido e estágio de desenvolvimento do cogumelo (SHAO *et al.*, 2010; VILLARES *et al.*, 2012). Outros esteróis, tais como fungisterol, ergosta-5,7-dienol, 24-metilcolesterol e metilenocolesterol foram também identificados em fungos, porém em menor quantidade (MATTILA *et al.*, 2002).

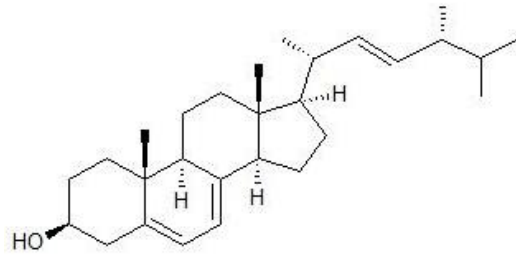
A **Tabela 1** apresenta a concentração de ergosterol de alguns cogumelos comestíveis, sendo evidente o interesse da espécie *Agaricus bisporus* como fonte para a sua obtenção.

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

<b>Espécie</b>	<b>Ergosterol (mg/100 g ms)</b>
<i>Agaricus bisporus</i>	352 $\pm$ 1
<i>Agaricus bisporus portobello</i>	77 $\pm$ 1
<i>Flammulina velutipes</i>	189 $\pm$ 2
<i>Lentinus edodes</i>	217 $\pm$ 2
<i>Pleurotus eryngii</i>	187 $\pm$ 1
<i>Pleuratus ostreatus</i>	104 $\pm$ 1
<i>Amanita caesarea</i>	231 $\pm$ 1
<i>Boletus edulis</i>	234 $\pm$ 2
<i>Cantharellus cibarius</i>	129 $\pm$ 1
<i>Fistulina hepatica</i>	108 $\pm$ 1
<i>Lactarius deliciosus</i>	55 $\pm$ 1
<i>Macrolepiota procera</i>	118 $\pm$ 2
<i>Morchella esculenta</i>	43 $\pm$ 2

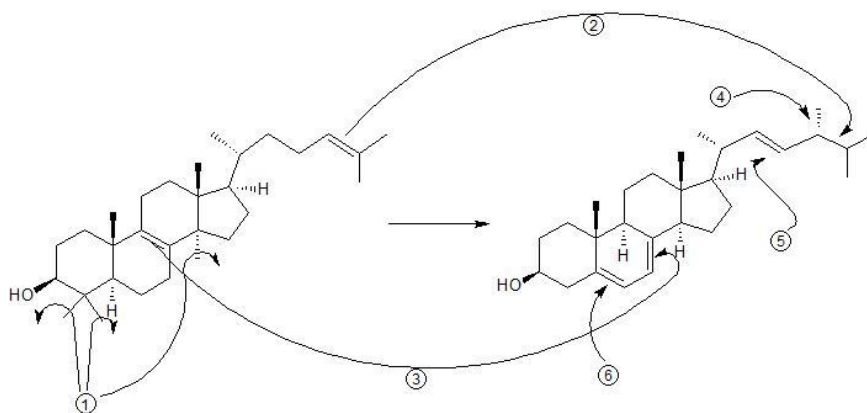
**FONTE:** Barreira *et al.* (2014). ms: massa seca.

<sup>1</sup> Grupo acilo de um ácido gordo.

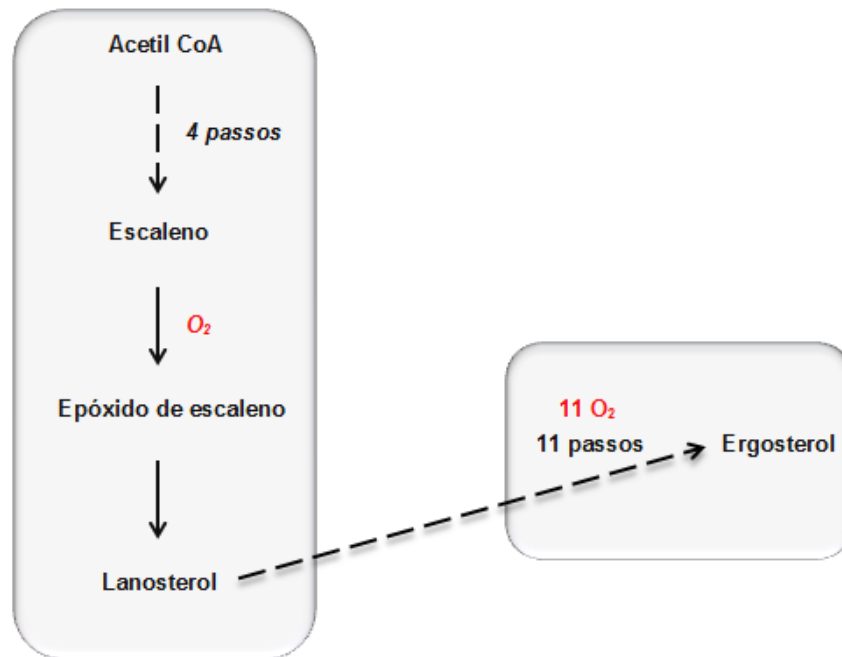


**Figura 1.** Estrutura química do ergosterol.

Os principais esteróis encontrados em células eucariontes são representados por três formas predominantes: colesterol em vertebrados, fitoesteróis (sitosterol, campesterol, estigmasterol) em plantas e ergosterol em fungos. Estes esteróis são produtos de vias biossintéticas longas compostas por múltiplas etapas que derivam de uma via inicial comum que corresponde à conversão de acetil CoA em epóxido de escaleno. A partir deste composto, produz-se cicloartenol em plantas e lanosterol em animais e fungos (DUPONT *et al.*, 2012). A via biossintética do ergosterol é bastante complexa, envolve cerca de 20 enzimas e tem sido extensivamente estudada (ALCAZAR-FUOLI *et al.*, 2008). A conversão de lanosterol em ergosterol no fermento (*Saccharomyces cerevisiae*), por exemplo, requer 6 transformações gerais (**Figura 2**): (1) remoção de três grupos metilo da molécula de lanosterol em C<sub>4</sub> e C<sub>14</sub>; (2) Alquilação em C<sub>24</sub> com conseqüente redução em C<sub>25</sub> e formação de  $\Delta^{24(28)}$ -metileno; (3) isomerização da dupla ligação  $\Delta^8$  para  $\Delta^7$ ; (4) redução da dupla ligação  $\Delta^{24(28)}$  gerando C<sub>24</sub>-metil; (5) introdução de uma dupla ligação  $\Delta^{22}$ ; e (6) introdução de uma dupla ligação  $\Delta^5$  (FRYBERG *et al.*, 1973). De uma forma mais simplificada, a via biossintética de esteróis em fungos é exemplificada de forma esquemática na **Figura 3**.



**Figura 2.** Conversão de lanosterol em ergosterol.  
**FONTE:** Adaptado de Fryberg *et al.* (1973).



**Figura 3.** Via Biosintética simplificada de esteróis em fungos.  
**FONTE:** Adaptado de Dupont *et al.* (2012).

### 2.1.2. Propriedades bioativas

Existem vários estudos que descrevem a possibilidade do ergosterol e dos seus produtos de peroxidação contribuírem para a promoção da saúde, apresentando funções fisiológicas significativas como efeito antitumoral, anti-inflamatório, antiofídico e antimicrobiano (GAO *et al.*, 2007; SHAO *et al.*, 2010; YASUKAWA *et al.*, 1994). A atividade antitumoral do ergosterol tem sido atribuída à inibição direta da angiogénese induzida por tumores sólidos (SUBBIAH & ABPLANALP, 2003).

É também do conhecimento da comunidade científica que a molécula de ergosterol, quando exposta a luz ultravioleta, sofre uma conversão fotossintética levando à formação de uma variedade de produtos da fotoirradiação, principalmente pré-vitaminas D<sub>2</sub> tais como taquisterol e lumisterol que, de forma espontânea, sofrem um rearranjo térmico levando à formação de vitamina D<sub>2</sub>. Esta substância é essencial para o bom funcionamento dos ossos e, recentemente, tem sido destacada a sua função imunoestimuladora e o seu efeito preventivo no tratamento alguns tipos de cancro e outras doenças crónicas (PHILLIPS *et al.*, 2011; TEICHMANN *et al.*, 2007).

### ***2.1.3. Alternativa aos fitoesteróis como agentes funcionalizantes***

Os micoesteróis e os fitoesteróis são biossintetizados por vias semelhantes, porém, tal como descrito anteriormente, após a formação do epóxido de escaleno as reações subsequentes diferem entre os compostos, originando produtos ligeiramente distintos. Os fungos produzem nomeadamente o ergosterol que difere dos esteróis das plantas por possuir no seu anel B duas duplas ligações e não apenas uma, característica dos fitoesteróis (BARREIRA & FERREIRA, 2015; NES, 2011).

Os alimentos funcionais têm sido amplamente desenvolvidos uma vez que, a sociedade procura, cada vez mais, adquirir hábitos alimentares saudáveis. Alguns destes alimentos têm sido apontados como capazes de diminuir o nível de colesterol sanguíneo e, na maioria, este efeito relaciona-se com a presença de fitoesteróis nas suas formulações (GIL-RAMÍREZ *et al.*, 2013). Os fitoesteróis e o colesterol possuem estruturas químicas semelhantes, por isso, competem pela inclusão nas micelas formadas durante a digestão o que aumenta a precipitação do colesterol e a sua excreção (RAJU *et al.*, 2013). Assim, tal como os fitoesteróis, o ergosterol também apresenta uma estrutura semelhante ao colesterol, podendo de igual forma atuar na diminuição do nível de colesterol sanguíneo (GIL-RAMÍREZ *et al.*, 2013).

A possibilidade de utilização de micoesteróis como alternativa aos fitoesteróis torna-se ainda mais atrativa considerando as perspectivas económica e ambiental. De facto, a grande quantidade de subprodutos e desperdícios de biomassa gerados durante os processos de cultivo, colheita ou processamento dos cogumelos, pode ser reaproveitada para a obtenção destas moléculas de alto valor acrescentado. Em concreto, os exemplares com características organolépticas inadequadas ou aspeto irregular e/ou em situação de não conformidade para comercialização em fresco, podem servir para este fim. Esses resíduos sólidos ao invés de serem eliminados poderão ser utilizados no desenvolvimento de alimentos funcionais uma vez que são fontes de ergosterol (HELENO *et al.*, 2016).

Adicionalmente, a aplicação de micoesteróis em produtos alimentares parece ser promissora já que os alimentos considerados hipocolesterolémicos são maioritariamente enriquecidos com fitoesteróis. Por outro lado, a produção em larga escala de alimentos enriquecidos com micoesteróis contribuiria, também, para aumentar a competitividade

do mercado de alimentos funcionais, o que acarretaria uma conseqüente diminuição de preços.

## **2.2. Biodisponibilidade no organismo humano**

### **2.2.1. Principais problemas associados à biodisponibilidade de esteróis**

#### 2.2.1.1. Absorção e metabolismo de esteróis

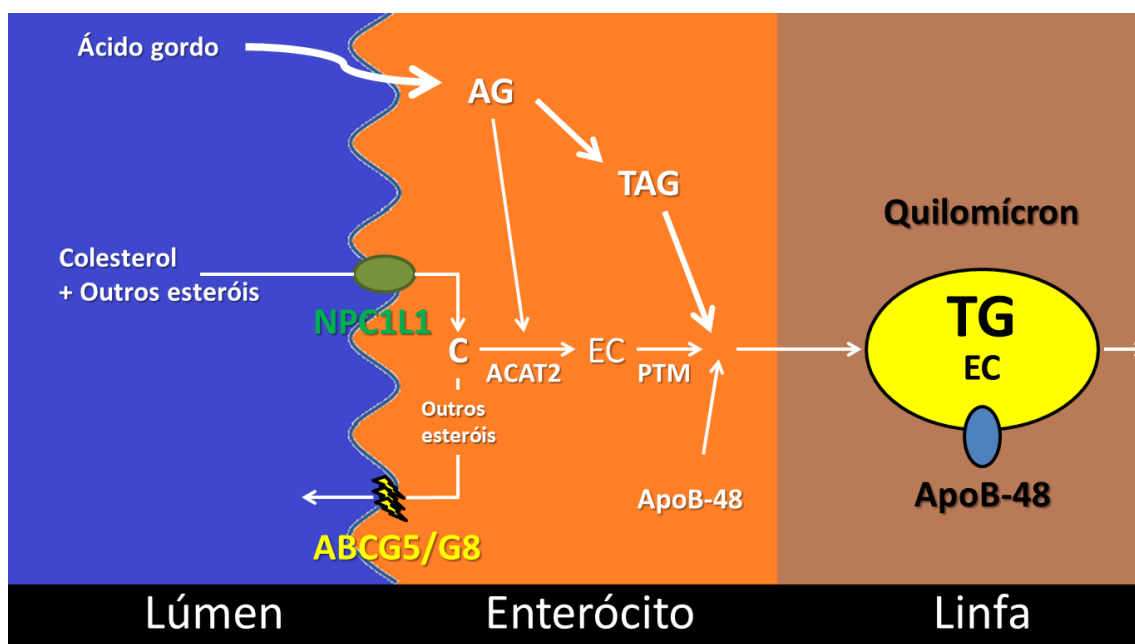
Apesar da grande semelhança estrutural, o metabolismo do colesterol e dos outros esteróis difere em alguns aspectos. Os mamíferos absorvem e retêm o colesterol da dieta entre 55% e 60%, enquanto que, para outros esteróis a absorção no intestino pode variar entre 0,04% e 16% (BRUFAU *et al.*, 2008). No intestino, os ésteres de esteróis adquiridos na dieta são primeiramente hidrolisados. Tratando-se de moléculas hidrofóbicas na sua forma livre, não podem circular livremente na corrente sanguínea. Desta forma, a absorção de esteróis pelas células do intestino requer a solubilização desses compostos em micelas intestinais que são estruturas compostas por sais biliares, triglicéridos e outros lípidos, e lipoproteínas (ROZNER & GARTI, 2006). Os esteróis possuem taxas de absorção no intestino que dependem do comprimento da cadeia lateral, hidrofobicidade e solubilidade em micelas. Assim, quanto maior a cadeia lateral menor é a absorção da molécula devido ao aumento da hidrofobicidade e à diminuição da solubilidade em micelas (OTHMAN *et al.*, 2013).

O colesterol da dieta e biliar, os fitoesteróis e os estanois são absorvidos no intestino via proteína *Niemman Pick C1 Like 1* (NPC1L1). Este transportador encontra-se no epitélio intestinal e na interface hepatobiliar e é responsável por facilitar a absorção de esteróis pelos enterócitos. Os transportadores de cassetes de ligação de ATP (ABC, do inglês *ATP-binding cassette*) nomeadamente as sub-famílias ABCG5 e ABCG8 também possuem um papel importante na absorção de esteróis pelas células intestinais uma vez que são responsáveis pelo efluxo dessas substâncias de volta para o lúmen intestinal (IKEDA, 2015; OTHMAN *et al.*, 2013).

Uma vez dentro dos enterócitos cerca de 50-60% das moléculas livres de colesterol são esterificadas pela acil-CoA:colesterol aciltransferase (ACAT) e, posteriormente, empacotadas em quilomícrons (lipoproteínas) para serem transportadas para o fígado.

Outros esteróis, que não o colesterol, possuem pouca afinidade para a ACAT e apenas 12% dessas moléculas é esterificada, predominando assim a incorporação de colesterol esterificado nos quilomícrons. O colesterol e outros esteróis não esterificados são secretados de volta para o lúmen intestinal através dos transportadores ABCG5/8. Os esteróis não absorvidos, como por exemplo, os fitoesteróis podem sofrer modificações pela flora intestinal e produzir metabólitos. Entretanto, as moléculas de esteróis efetivamente absorvidas são armazenadas nos quilomícrons e entram na circulação; ao chegar ao fígado, os fitoesteróis remanescentes presentes nos quilomícrons são secretados no sangue na forma de constituintes lipídicos de lipoproteínas de muita baixa densidade (VLDL) (BRUFAU *et al.*, 2008; GYLLING *et al.*, 2014; ROZNER & GARTI, 2006).

Finalmente, vários estudos têm descrito uma maior razão fitoesterol/colesterol nas lipoproteínas de alta densidade (HDL) em comparação com as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e VLDL, sugerindo que os fitoesteróis são transportados preferencialmente por lipoproteínas de alta densidade. De salientar que, nessas estruturas, os fitoesteróis são esterificados pela enzima lecitina-colesterol acil transferase de forma eficiente e comparável ao que acontece com o colesterol (OTHMAN *et al.*, 2013; TRAUTWEIN *et al.*, 2003). A **Figura 4** representa de forma simplificada o metabolismo do colesterol e outros esteróis.



**Figura 4.** Esquema resumindo o metabolismo do colesterol e outros esteróis.

**FONTE:** Adaptado de Gylling *et al* (2014). AG: ácido gordo; Apo: apolipoproteína; C: colesterol; EC: éster de colesterol; PTM: proteína de transferência de triglicéridos microsossomal; TAG: triacilglicerol.

### **2.2.2. Efeitos de esteróis na absorção intestinal do colesterol**

Têm sido propostos diversos mecanismos para explicar o modo como os esteróis, nomeadamente os fitoesteróis, atuam na diminuição do nível de colesterol sanguíneo e, conseqüentemente, de LDL (DE JONG *et al.*, 2003). Estes processos ainda não estão completamente compreendidos, porém a ação dos fitoesteróis parece basear-se na diminuição, ou na inibição, da absorção do colesterol (ROZNER & GARTI, 2006). Diversos estudos têm estabelecido que a ingestão de esteróis tem efeitos hipocolesterolémicos em animais e humanos (ASH *et al.*, 2011; GYLLING & SIMONEN, 2015; MESINK *et al.*, 2002), isto porque uma dieta rica nestes compostos aumenta a excreção fecal de colesterol e produtos do seu metabolismo; assim, acredita-se que os esteróis inibem a absorção do colesterol no intestino e que tal efeito não se baseia na sua biodisponibilidade, mas sim, na sua disponibilidade para absorção em micelas no intestino delgado (IKEDA, 2015).

Os mecanismos pelos quais os esteróis interferem na absorção do colesterol não estão completamente compreendidos, porém, considerando a via de absorção do colesterol, acredita-se que estes possam inibir a sua absorção nas seguintes etapas: 1. Solubilidade em micelas; 2. Co-cristalização de colesterol e fitoesteróis das micelas; 3. Inibição de lipases, esterases, e demais enzimas envolvidas na absorção de esteróis; 4. Ação sobre transportadores da parede celular de células intestinais (ROZNER & GARTI, 2006). De todas as teorias apresentadas, apenas a teoria da substituição em micelas tem tido suporte experimental (GYLLING *et al.*, 2014; GYLLING & SIMONEN, 2015).

#### 2.2.2.1. Efeitos físico-químicos

##### 2.2.2.1.1. *Co-cristalização de colesterol e outros esteróis*

Este mecanismo em que ocorre a diminuição da absorção de colesterol baseia-se na cristalização do colesterol junto a outros esteróis levando à formação de uma mistura de cristais pouco solúveis durante a lipólise dos alimentos no trato gastrointestinal. No estômago, as moléculas de colesterol e outros esteróis estão presentes numa emulsão água:óleo que, devido ao baixo grau de hidrólise lipídica enzimática, faz com que estas moléculas se mantenham dispersas na fase lipídica. Já no intestino delgado, a conversão

enzimática da emulsão gástrica intensifica-se, ocorrendo a degradação de triacilgliceróis, ácidos gordos livres e fosfolipídios e, também, a transformação de ésteres de esteróis em esteróis livres. Acredita-se que a rápida redução do volume da fase lipídica no intestino delgado é um pré-requisito para a precipitação de esteróis. Além disso, o aumento da ingestão de esteróis, nomeadamente fitoesteróis, acarreta um aumento da competição com as moléculas de colesterol pela inclusão na fase lipídica o que facilita a precipitação intestinal de colesterol e outros esteróis (TRAUTWEIN *et al.*, 2003).

#### 2.2.2.1.2. *Competição entre colesterol e outros esteróis pela solubilização em micelas*

As micelas formadas durante a digestão possuem um papel importante no mecanismo de absorção. Estas estruturas agem como um veículo que transporta tanto moléculas apolares como polares em direção à parede intestinal. Têm sido realizados diversos ensaios experimentais com o objetivo de compreender o modo como diferentes esteróis atuam na diminuição da absorção do colesterol através deste mecanismo (CARR *et al.*, 2009; IKEDA, 2015; TARLING & EDWARDS, 2012). Os resultados sugerem que a solubilidade da molécula de colesterol na presença de fitoesteróis, por exemplo, diminui devido à limitação da capacidade das micelas para solubilizar moléculas hidrofóbicas. Como os fitoesteróis são moléculas mais hidrofóbicas, apresentam uma maior afinidade para com as micelas, substituindo assim o colesterol dado a diferença de energia livre favorável (ROZNER & GARTI, 2006).

#### 2.2.2.2. *Efeito no local de absorção*

O colesterol esterificado corresponde a 20% do total ingerido diariamente e, somente após a sua hidrólise em colesterol livre pela enzima colesterol esterase pancreática, é que este pode ser absorvido pelas células que compõem a parede intestinal. Outros esteróis esterificados podem também atuar como substrato da colesterol esterase, uma enzima pouco específica, dado a sua semelhança com a estrutura dos ésteres de colesterol. Uma das explicações existentes para a diminuição da absorção do colesterol atribui aos ésteres de esteróis a capacidade de bloquear a enzima e diminuir sua atividade. Outra teoria sugere que devido à rápida hidrólise dos ésteres de esteróis, os

esteróis livres podem substituir o colesterol nas micelas, provocando uma acumulação de colesterol e dos seus ésteres na fase lipídica. Estas evidências servem de base para a compreensão do efeito hipocolesterolémico de ésteres de esteróis (ROZNER & GARTI, 2006; TRAUTWEIN *et al.*, 2003).

### 2.2.3. *Técnicas de modificação química*

Várias técnicas de modificação química têm sido aplicadas aos esteróis. Estas têm como principal objetivo aumentar a sua solubilidade e disponibilidade, mantendo a bioeficiência. Incluindo, uma área de trabalho importante, tem sido o uso de diversos métodos de modificação química visando aumentar a solubilidade de fitoesteróis em meios apolares. Basicamente são realizadas reações de esterificação com ácidos gordos, interesterificação com ésteres metílicos de ácidos gordos e reações com anidridos ou halogenetos de ácidos gordos (HE *et al.*, 2016; MORINAGA *et al.*, 2011; TORRES *et al.*, 2007). No entanto, há poucos estudos disponíveis na literatura sobre a modificação química de micoesteróis. As técnicas mais utilizadas incluem reações de esterificação que vão desde o uso de enzimas até reações em sistemas isentos de solvente (CHAIBAKHSH *et al.*, 2012; HE *et al.*, 2014).

Apesar de os esteróis na sua forma livre serem também capazes de diminuir o nível de colesterol sanguíneo, a sua solubilidade na fase lipídica é maior na forma esterificada podendo alcançar valores de 20% e 2% (m/m), respetivamente para a forma esterificada e forma livre (CARR *et al.*, 2009). Assim, na formulação de um alimento seria necessária a adição de uma menor quantidade de éster de esterol, quando comparada à sua forma livre, para se atingir efeitos semelhantes no organismo. Sabe-se que, tornar as moléculas de esteróis mais apolares através de reações de esterificação não prejudica a sua atividade hipocolesterolémica (MORINAGA *et al.*, 2011). Segundo alguns estudos, as duas formas de esteróis apresentam efeitos hipocolesterolémicos semelhantes (MOREAU *et al.*, 2002). No entanto, a forma esterificada apresenta outras vantagens em relação à forma livre como, por exemplo, maior atividade antioxidante em meio lipídico (TAN & SHAHIDI, 2012; WANG *et al.*, 2015).

## 2.3. Estabilidade e solubilidade de micoesteróis

### 2.3.1. Principais problemas

A estrutura química singular dos micoesteróis torna-os moléculas insolúveis em água, mas também com solubilidade limitada em meios apolares, o que limita drasticamente a sua aplicação em formulações quer sejam alimentares, farmacêuticas ou cosméticas (HE *et al.*, 2016). As moléculas de micoesteróis podem ser dissolvidas apenas em éter, clorofórmio, etanol a quente, ou outro solvente orgânico, mas dificilmente são solubilizadas em água ou num meio apolar à temperatura ambiente (YI *et al.*, 2013a). Apesar da solubilidade ser superior em solventes apolares, comparativamente com a água, a quantidade dissolvida nestes solventes é muito pequena (ENGEL & SCHUBERT, 2005). Já em formulações alimentares, o problema da aplicação de esteróis na sua forma livre está relacionado com o facto de, devido à baixa solubilidade, estes terem que ser incorporados em doses elevadas para que sejam alcançados efeitos benéficos significativos no organismo (MORAN-VALERO *et al.*, 2012). Quanto à estabilidade, é aconselhável acondicionamento adequado uma vez que são afetados pelo contato com a luz e atmosfera circundante.

É de salientar que as moléculas menos polares e compostas por grupos metilo e acetilo atravessam com maior facilidade as paredes biológicas penetrando mais facilmente nas células. Por outro lado, caso a sua aplicação em matrizes alimentares hidrofílicas seja o objetivo, esta também deve apresentar afinidade com o meio. Neste contexto, para a aplicação de micoesteróis em alimentos hidrofílicos, nomeadamente iogurtes (teor de água de 78-87 g/100 g), uma abordagem interessante consiste na sua encapsulação com um material de parede compatível com o meio hidrofílico. Desta forma, a molécula manterá (ou até aumentará) a sua solubilidade/disponibilidade, ao mesmo tempo em que apresentará afinidade pelo alimento em questão.

### 2.3.2. Principais soluções

#### 2.3.2.1. Micro e nano encapsulação

Os compostos bioativos na sua forma livre são propensos à degradação, quer durante o processamento ou armazenamento, podendo ser instáveis frente a fatores físicos, químicos ou enzimáticos, resultando em transformações e perda de bioatividade. Assim, fatores relacionados com o processamento, biodisponibilidade e características organolépticas destes compostos limitam a sua aplicação em matrizes alimentares. A encapsulação surge como uma técnica capaz de superar tais problemas, possibilitando a incorporação destas substâncias em alimentos (DIAS *et al.*, 2015).

A técnica de encapsulação consiste em armazenar pequenas partículas sólidas, gases ou líquidos dentro de uma camada de revestimento ou de uma matriz, normalmente polimérica. Desta forma, a substância encapsulada é protegida de fatores ambientais como a luz, humidade, calor e oxigênio, podendo ser libertada de forma controlada (SOBEL *et al.*, 2014).

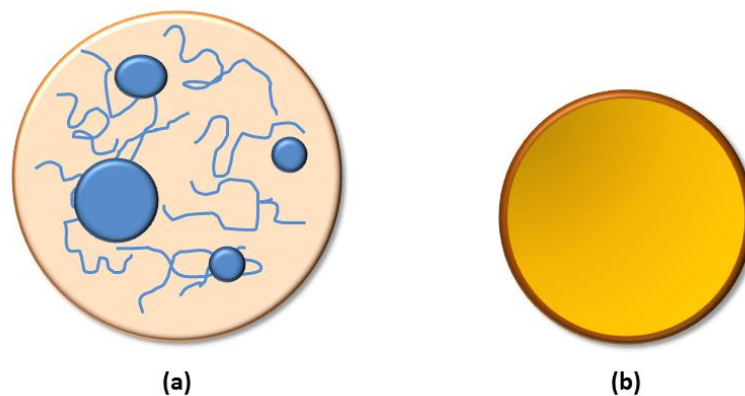
Um sistema eficiente para a encapsulação e transporte de um composto bioativo, e adequado para a incorporação em matrizes alimentares, deve apresentar as seguintes características: (1) ser formulado com ingredientes de preferência naturais, adequados para o consumo humano e através de sistemas isentos de solvente; (2) proporcionar a incorporação de compostos bioativos estáveis, físico- e quimicamente, a matrizes alimentares, sem alterar as características organolépticas do produto; (3) evitar ou minimizar a interação do composto encapsulado com outros ingredientes do alimento, além de o proteger de fatores como luz, temperatura, oxigênio e pH, (4) maximizar a absorção do composto encapsulado e garantir a libertação controlada como resposta a estímulos ambientais específicos, e (5) ser de fácil aplicação à escala industrial (ĐORĐEVIĆ *et al.*, 2014).

As partículas obtidas podem ser classificadas como microencapsulados ou nanoencapsulados caso estejam nas faixas de 100-1000 nm ou 1-100 nm, respetivamente. As micropartículas podem apresentar duas morfologias mais comuns: (1) microcápsula, onde o composto bioativo é protegido por uma membrana; (2) microesfera, onde o composto bioativo se encontra disperso numa matriz (DIAS *et al.*, 2015). A **Figura 5** representa estas duas possíveis morfologias.

Na literatura é possível encontrar vários estudos que têm aplicado diferentes técnicas para a encapsulação de ergosterol. Exemplos disso são, as formulações de lipossomas, nanopartículas, microemulsões e micelas poliméricas. Entre os principais objetivos estão o aumento da sua solubilidade, biodisponibilidade, melhoramento da distribuição em tecidos e efeito antitumoral (YI *et al.*, 2012, 2013a, 2013b; ZHANG *et al.*, 2016).

No caso das moléculas de esteróis, as técnicas de encapsulação podem atuar de forma a: (1) evitar a interação com outros ingredientes presentes nos alimentos; (2) conseguir proteção contra luz, oxigênio e outros agentes adversos; e (3) permitir sua dispersão em água facilitando o seu uso em formulações aquosas, como, por exemplo, bebidas (COMUNIAN & FAVARO-TRINDADE, 2016).

Através da encapsulação, a molécula de ergosterol poderá ser incorporada em alimentos aquosos sem que haja precipitação e deposição de matéria. Sabe-se atualmente, que grande parte dos alimentos enriquecidos em fitoesteróis é de base lipídica, como por exemplo, queijos e gorduras de barrar, maionese e molhos para saladas (CHAWLA *et al.*, 2016; MOREAU *et al.*, 2002). Considerando que um dos principais efeitos bioativos do ergosterol é a sua atividade hipocolesterolêmica, a sua adição a produtos alimentares de base aquosa surge como uma via mais adequada, uma vez que os consumidores que procuram este efeito funcional também procuram uma dieta restrita quanto à ingestão de gorduras.



**Figura 5.** Ilustração esquemática das morfologias de microesfera (a) e microcápsula (b).  
**FONTE:** Adaptado de Đorđević *et al* (2014).

#### 2.3.2.2. Técnicas de emulsificação

Quando formulados e processados de forma correta, os sistemas coloidais tais como emulsões, constituem matrizes adequadas para a proteção e distribuição de compostos

bioativos lipídicos, como por exemplo, o ergosterol. Se aplicado em produtos alimentares, o composto bioativo em questão é capaz de suportar alterações decorrentes dos processos de manufatura mantendo as estabilidades física e química por períodos de tempo prolongados (RAIKOS & RANAWANA, 2017).

As emulsões consistem em dois líquidos imiscíveis, geralmente água e óleo, estando um dos líquidos disperso no outro, na forma de gotículas esféricas. As emulsões biofuncionais óleo/água podem ser produzidas através da solubilização do componente hidrofóbico na fase lipídica, que é então dispersa na fase aquosa através de um homogeneizador de alta velocidade. Os dois sistemas mais comuns baseados em emulsões são as emulsões convencionais (diâmetros maiores que 100 nm) e as nanoemulsões (diâmetros menores que 100 nm). Ambos os sistemas são instáveis termodinamicamente e se diferenciam apenas pelo tamanho de suas gotículas, o que acarreta algumas diferenças nas suas propriedades físico-químicas e comportamento fisiológico (RAIKOS & RANAWANA, 2017; ZHANG & MCCLEMENTS, 2016).

Os métodos de obtenção destes sistemas podem dividir-se em duas categorias, os de alta energia e os de baixa energia. Os métodos de alta energia se baseiam na aplicação de grandes quantidades de energia para que seja alcançada a emulsificação. Este processo envolve o uso de forças mecânicas, como turbulência, cisalhamento e cavitação que promovem a ruptura das gotas aumentando a sua área superficial. Os métodos de baixa energia consistem na emulsificação espontânea através do controle de propriedades físico-químicas do sistema. A grande vantagem dos métodos de alta energia é a possibilidade de serem aplicados a uma grande variedade de óleos e emulsificantes, além de serem capazes de gerar pequenas gotas com razões emulsificante/óleo relativamente baixas. Já os métodos de baixa energia limitam-se a uma pequena faixa de óleos e emulsificantes, necessitando de uma maior razão emulsificante/óleo; entretanto, ao contrário dos métodos anteriores, os equipamentos requeridos para sua obtenção são mais baratos (ACEVEDO-FANI *et al.*, 2016; ZHANG & MCCLEMENTS, 2016).

A aplicação de compostos bioativos como o ergosterol na fase lipídica de nanoemulsões pode contribuir de forma eficiente para: (1) melhorar a dispersão do composto em solução aquosa, ou seja, viabilizar a aplicação em produtos maioritariamente hidrofílicos, minimizando a segregação em diferentes fases; (2) proteção do composto, impedindo a sua reação com outros ingredientes do alimento a que foi aplicado, mantendo as suas características funcionais e prevenindo reações de oxidação do

alimento; (3) minimizar o impacto nas propriedades organolépticas do alimento a que foi aplicado; assim como (5) aumentar a sua absorção e biodisponibilidade, devido ao tamanho subcelular das nanopartículas formadas, o que melhora os mecanismos de transporte passivo através das membranas celulares (DONSÌ *et al.*, 2011).

Outra abordagem eficiente na aplicação de compostos lipofílicos são as duplas emulsões, que segundo estudos, permite a formação de sistemas com maior estabilidade face a mudanças químicas e físicas em diferentes condições ambientais. No caso de uma dupla emulsão do tipo água/óleo/água, o sistema contém três fases, duas aquosas (uma interna e outra externa), geralmente de composições distintas, e uma fase lipídica localizada entre estas e separada por duas interfaces que são estabilizadas por surfactantes hidrofílicos e lipofílicos. Uma característica que se destaca nesse tipo de sistemas é a possibilidade de proteção de compostos bioativos e a sua libertação interna de uma fase para outra (BORTNOWSKA, 2015; JIMÉNEZ-COLMENERO, 2013).

Existem já diversos estudos onde as técnicas de emulsificação são aplicadas a esteróis com o objetivo de obter formulações com baixo teor de gordura capazes de se dispersarem em água (ENGEL & SCHUBERT, 2005). Assim, o uso destas técnicas, possibilita o aparecimento de novas aplicações de compostos bioativos lipofílicos em alimentos e bebidas, nomeadamente de base aquosa, gerando uma maior variabilidade de produtos, de acordo com as necessidades dos consumidores.

#### **2.4. Técnica de *spray drying***

A técnica de *spray drying* é a mais antiga de entre todos os métodos de encapsulação utilizados na indústria alimentar, estando bem estabelecida atualmente. É considerada uma técnica flexível, que permite a operação em contínuo e apresenta um custo de produção baixo, comparativamente a diversos processos de encapsulação disponíveis. O baixo custo de operação se traduz em fácil aplicação à escala industrial, sendo necessários equipamentos e materiais pouco dispendiosos, se comparados com outras metodologias (DIAS *et al.*, 2015).

O processo de *spray drying* é composto, basicamente, por três etapas: (1) dissolução, emulsificação ou dispersão do princípio ativo; (2) atomização e (3) secagem. O primeiro passo consiste em dissolver (caso seja hidrossolúvel) ou dispersar (caso seja lipossolúvel) o composto que se deseja encapsular numa solução aquosa do material

encapsulante (também hidrossolúvel). Essa solução/dispersão é então pulverizada diretamente numa câmara aquecida que promove a evaporação da água, ocorrendo a formação de partículas de 10-300 µm. O processo de secagem é realizado com uso de ar aquecido (160-220°C). Esta etapa é rápida, sendo realizada em alguns milissegundos, pelo que, até mesmo compostos termossensíveis podem ser encapsulados através desta técnica, sem perdas significativas (ĐORĐEVIĆ *et al.*, 2014).

Os principais parâmetros que influenciam a eficiência de encapsulação são a razão mássica entre princípio ativo e material encapsulante, e a temperatura de entrada do ar na câmara de secagem. Em geral, os valores de eficiência possuem uma ampla margem de variação, cerca de 10-90%. As micropartículas obtidas por este processo apresentam morfologia do tipo matriz, onde o princípio ativo se encontra disperso no material encapsulante (ĐORĐEVIĆ *et al.*, 2014; RAY *et al.*, 2016).

Assim, através do planeamento e determinação de parâmetros de processo e materiais adequados, é possível a encapsulação de moléculas hidrofóbicas, tal como o ergosterol, a partir da técnica de *spray drying*. Através dessa metodologia, é possível aumentar a solubilidade de um composto num dado sistema através do uso de revestimentos específicos e operações que aumentem a sua área superficial, além de promover maior estabilidade quando adicionado à matriz alimentar. Desta forma, utilizando-se materiais encapsulantes compatíveis, tanto com o composto a encapsular como com a matriz alimentar, é possível obter partículas de ergosterol adequadas para serem aplicadas a uma vasta gama de alimentos.

#### **2.4.1. Aplicação na área alimentar**

Por se tratar de uma técnica bem estabelecida e amplamente desenvolvida no setor alimentar, diversos estudos têm aplicado processos de encapsulação por *spray drying* a uma vasta gama de ingredientes e compostos bioativos com o objetivo de superar fatores que limitam a sua aplicação em matrizes alimentares (DIAS *et al.*, 2015). Alguns dos exemplos disponíveis na literatura incluem: óleos de linhaça, chia, noz, coco e peixe (CARNEIRO *et al.*, 2013; ENCINA *et al.*, 2016; HEE *et al.*, 2015; MARTÍNEZ *et al.*, 2015); extratos de cogumelos (RIBEIRO *et al.*, 2015); aromas como D-limoneno e bioaroma de queijo (DA COSTA *et al.*, 2015; FISK *et al.*, 2013); curcumina (LIU *et al.*,

2016); antocianinas (CARVALHO *et al.*, 2016) e fitoesteróis (DI BATTISTA *et al.*, 2015).

Como materiais encapsulantes utilizados na técnica de *spray drying* é possível encontrar gomas e proteínas, sendo a goma arábica o material mais utilizado. Materiais como maltodextrinas, além da mistura destes com gomas, proteínas e amidos modificados também têm sido aplicados nestes sistemas (ĐORĐEVIĆ *et al.*, 2014).

Alguns exemplos da aplicação da técnica de *spray drying* na área alimentar, assim como os parâmetros processuais utilizados, estão descritos na **Tabela 2**.

**Tabela 2. Aplicações da técnica de *spray drying* na área alimentar e parâmetros do processo.**

Princípio ativo	Material encapsulante	Formulação (sólidos (%); p.a (%))	Condições de atomização	Referência
Óleo de linhaça	Maltodextrina com goma arábica, proteína de soro concentrada ou amido modificado	sólidos: 30 p.a: 20	Te: 182°C Ts: 110°C Fluxo de entrada: 12 g/min	Carneiro <i>et al.</i> (2013)
	D-limoneno	Capsul® ou lecitina	sólidos: 30 Te: 180°C Ts: 85°C Aspiração 90%	
Óleo de coco virgem	Maltodextrina e caseinato de sódio em combinação com goma arábica, gelatina ou proteína de soro concentrada	sólidos: 30 p.a: 40	Te: 180°C Ts: 85°C Fluxo de entrada: 10 mL/min	Hee <i>et al.</i> (2015)
Bioaroma de queijo suíço	Amido modificado	sólidos: 25 m.e/p.a: 4:1	Te: 175°C Fluxo de entrada: 2,97 x 10 <sup>-7</sup> m <sup>3</sup> /s	Da Costa <i>et al.</i> (2015)
Óleos de chia e noz	Maltodextrina em combinação com hidroxipropilmetilcelulose	m.e/p.a: 2:1	Te: 163°C Aspiração 100%	Martínez <i>et al.</i> (2015)
Vitamina A	Goma arábica	ND	Te: 150°C Ts: 88°C Fluxo de entrada: 3-6mL/min	Gonçalves <i>et al.</i> (2017)
Extrato hidroalcoólico de cogumelos	Maltodextrina	sólidos: 21 m.e/p.a: 20:1	Te: 170°C Ts: 95°C Fluxo de entrada: 6 mL/min	Ribeiro <i>et al.</i> (2015)
Fitoesteróis	Maltodextrina em combinação com goma arábica	ND	Te: 160°C Ts: <102°C Fluxo de entrada: 2 mL/min	Di Battista <i>et al.</i> (2015)
Extrato hidroalcoólico de açafraão	Maltodextrina em combinação com goma arábica e/ou gelatina	sólidos: 30 ou 40 m.e/p.a: 1:20	Te: 180°C Ts: 90°C Fluxo de entrada: 5 mL/min	Rajabi <i>et al.</i> (2015)

ND: não disponível; sólidos (%): teor de sólidos totais em %; p.a (%): teor de princípio ativo em % (base teor de sólidos); m.e/p.a: razão material encapsulante/princípio ativo; Te: temperatura de entrada; Ts: temperatura de saída.

#### **2.4.2. Técnicas de caracterização**

A caracterização das micropartículas produzidas é uma etapa importante do processo de encapsulação de compostos bioativos. Através de técnicas específicas é possível verificar se os materiais obtidos são adequados ao fim pretendido. Geralmente são caracterizados aspectos como tamanho de partícula, distribuição do tamanho de partícula, potencial zeta, morfologia, fluidez, eficiência de encapsulação, e estabilidade (KWAK, 2014).

Em processos de encapsulação, técnicas como Microscopia Eletrônica de Varrimento (MEV) têm sido comumente aplicadas para estudar a morfologia dos sistemas microencapsulados. Além disso, as análises de humidade, atividade da água ( $A_w$ ) e higroscopicidade dos pós obtidos também são realizadas com frequência (CARNEIRO *et al.*, 2013; DA COSTA *et al.*, 2015; CARVALHO *et al.*, 2016). Adicionalmente, a eficiência de encapsulação é um fator determinante na qualificação de um processo de encapsulação de compostos bioativos. Esta é expressa como a razão entre a quantidade encapsulada (soma da quantidade dentro das partículas e absorvida na superfície) e a quantidade inicialmente adicionada à formulação (KWAK, 2014). Outros parâmetros que se costumam caracterizar são o rendimento do processo e a carga de bioativo nas microcápsulas.

Outras técnicas de grande interesse também na caracterização dos sistemas microencapsulados são a espectroscopia de infravermelhos (FTIR, Infravermelho por transformada de Fourier (do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*)), a análise térmica (Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC, do inglês *Differential Scanning Calorimetry*) e Análise Termogravimétrica (TGA, do inglês *Thermogravimetric analysis*)) e Difração de raios-X (XDR, do inglês *X-ray Powder Diffraction*), este último para uma melhor compreensão da estrutura do estado sólido das partículas (DI SABATINO *et al.*, 2012; MASCHKE *et al.*, 2007; MATOS-JR *et al.*, 2015; PASSERINI *et al.*, 2006).

#### **2.5. Técnica de reticulação de biopolímeros**

A técnica de encapsulação apresenta, entre outros aspectos, a capacidade de promover a compatibilidade do composto que se deseja encapsular com um meio específico.

Através do uso de um material de parede adequado, é possível encapsular um composto bioativo para posterior incorporação num alimento no qual, na sua forma livre, o composto em questão não apresenta boas características de solubilidade.

Os polissacarídeos são moléculas naturais que apresentam capacidade de gelificação, sendo adequados para a encapsulação de uma grande variedade de substâncias com propriedades diversas, mas também, estruturas biológicas complexas (SANTIAGO & CASTRO). As maltodextrinas são moléculas obtidas a partir da hidrólise parcial do amido e apresentam um Dextrose Equivalente inferior a 20. São substâncias que compreendem uma mistura de moléculas com diferentes pesos moleculares (polissacarídeos e oligossacarídeos), sendo, contrariamente ao amido, solúveis em água (CHRONAKIS, 1998).

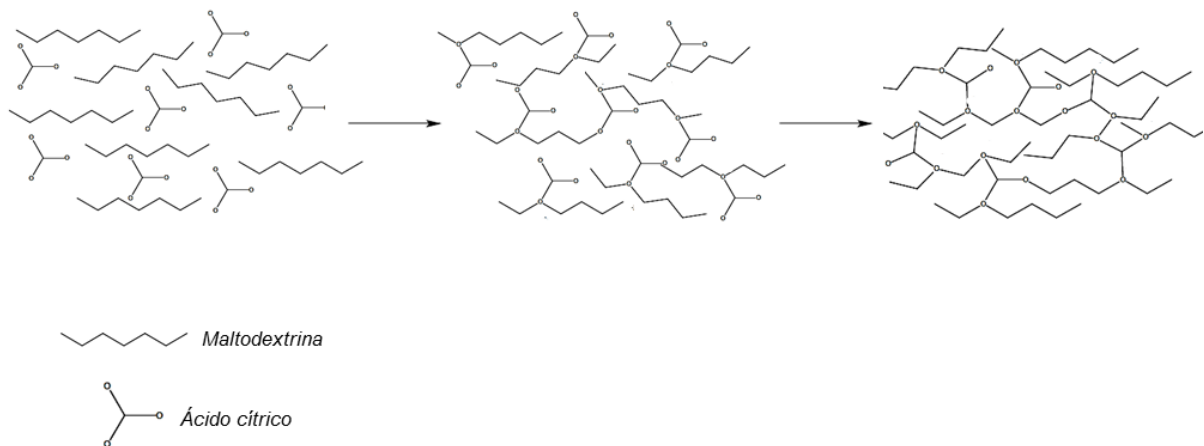
Apesar de ser um material de parede muito utilizado para a encapsulação de produtos alimentares, as maltodextrinas apresentam limitações de uso em alguns produtos de base aquosa dado a elevada solubilidade em água. Dessa forma, a aplicação de micropartículas formuladas a partir de maltodextrinas em matrizes alimentares hidrofílicas, pode apresentar dificuldades práticas de aplicação, uma vez que, em contato com o alimento, as partículas podem desagregar-se e seu conteúdo libertado de forma quase instantânea, levando à desproteção do material encapsulado e, a mais longo prazo, à sua precipitação.

Nesse contexto, podem ser aplicadas diferentes técnicas com o objetivo de aumentar a estabilidade das partículas formadas e diminuir a solubilidade destas em água, permitindo a libertação controlada do seu conteúdo (WANG *et al.*, 2015; GHANBARZADEH *et al.*, 2011). A técnica de reticulação é comumente utilizada para a modificação de biopolímeros, como derivados de proteínas e polissacarídeos, e consiste num processo de formação de ligações covalentes ou não covalentes entre as cadeias poliméricas, respetivamente para a reticulação química e física, resultando na formação de uma rede tridimensional (AZEREDO & WALDRON, 2016). O produto formado apresenta propriedades mecânicas superiores e maior estabilidade em ambientes aquosos e fisiológicos (REDDY *et al.*, 2015).

O ácido cítrico é o ácido orgânico maioritário encontrado em frutas cítricas, tem propriedades conservantes, emulsificantes e sequestrantes, sendo amplamente utilizado na indústria alimentar (CIRIMINNA *et al.*, 2017). É um ácido trifuncional, apresentando três grupos carboxílicos, permitindo a formação de interações

intermoleculares e formação de ligações covalentes por reação química. A aplicação como agente reticulante de biopolímeros, nomeadamente proteínas e polissacarídeos, tira partido da existência de grupos amina e hidroxilo nas proteínas (formação de ligações amida e éster, respetivamente) e hidroxilo nos polissacarídeos (formação de ligações éster), conduzindo à formação de materiais com propriedades mecânicas e térmicas melhoradas (CASTRO-CABADO, *et al.*, 2016a; GHANBARZADEH *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2008; ZAND-RAJABI & MADADLOU, 2016).

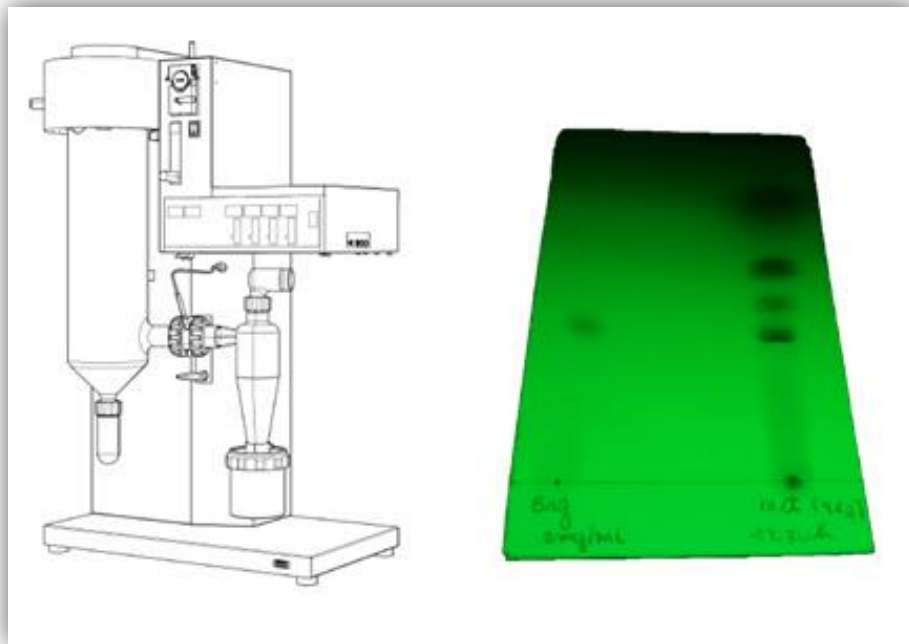
No caso particular da maltodextrina, um polissacarídeo, o ácido cítrico atua como agente reticulante formando ligações éster através da reação dos grupos carboxílicos do ácido com os grupos hidroxilo do polissacarídeo (reticulação química) (**Figura 6**). As interações de hidrogénio podem também contribuir para a formação de uma rede tridimensional mais resistente, isto é, com propriedades físicas melhoradas (reticulação física) (CASTRO-CABADO *et al.*, 2016b).



**Figura 6.** Reação de reticulação entre ácido cítrico e maltodextrina.



### 3.MATERIAL E MÉTODOS





### 3.1. Padrões e reagentes

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

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

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

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

O Kit Griess Reagent System foi adquirido da Promega (Madison, WI, EUA).

A argila Montmorillonite K-10 em grânulos foi adquirida da Acrós Organics (New Jersey, EUA). O ácido mirístico foi adquirido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

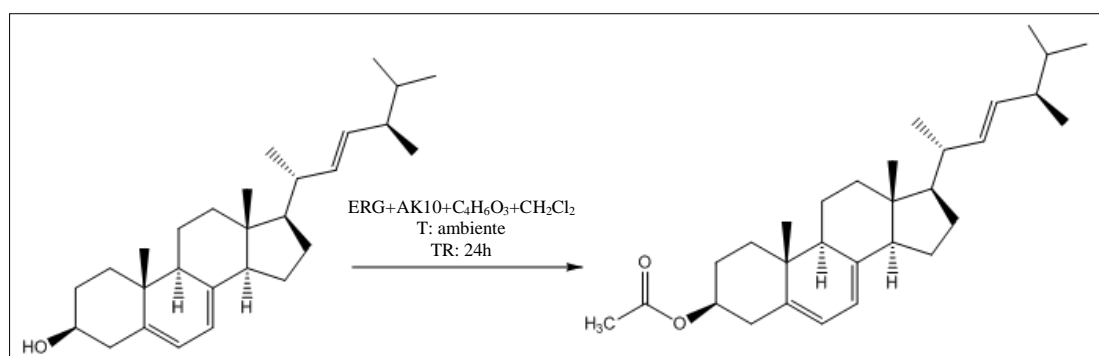
A maltodextrina foi gentilmente cedida pela Cargill (Wayzata MN, EUA) possuindo um DE de 18.

A água foi tratada em um sistema de purificação Mili-Q (TGI Sistemas de água pura, Greenville, SC, EUA). Todos os demais produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram adquiridos de fornecedores portugueses.

### 3.2. Modificação química da molécula de ergosterol

#### 3.2.1. Acetilação do ergosterol

O procedimento de acetilação foi realizado conforme descrito por Maria *et al.* (2009) com algumas modificações. Deste modo, argila (2,6 g) e ergosterol (0,3 g) foram dissolvidos numa mistura de anidrido acético (1,3 mL) e diclorometano (44 mL); o sistema foi mantido sob refluxo e agitação durante 24 horas à temperatura ambiente. A reação foi monitorizada por cromatografia em camada delgada (TLC, do inglês *Thin-layer chromatography*) até não apresentar progressão. Após o decorrer da reação a suspensão foi filtrada (filtros Whatman nº4) e, por fim, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida no evaporador rotativo. O produto (E-ACT) foi posteriormente isolado por cromatografia em coluna. O esquema da reação é representado na **Figura 7**.

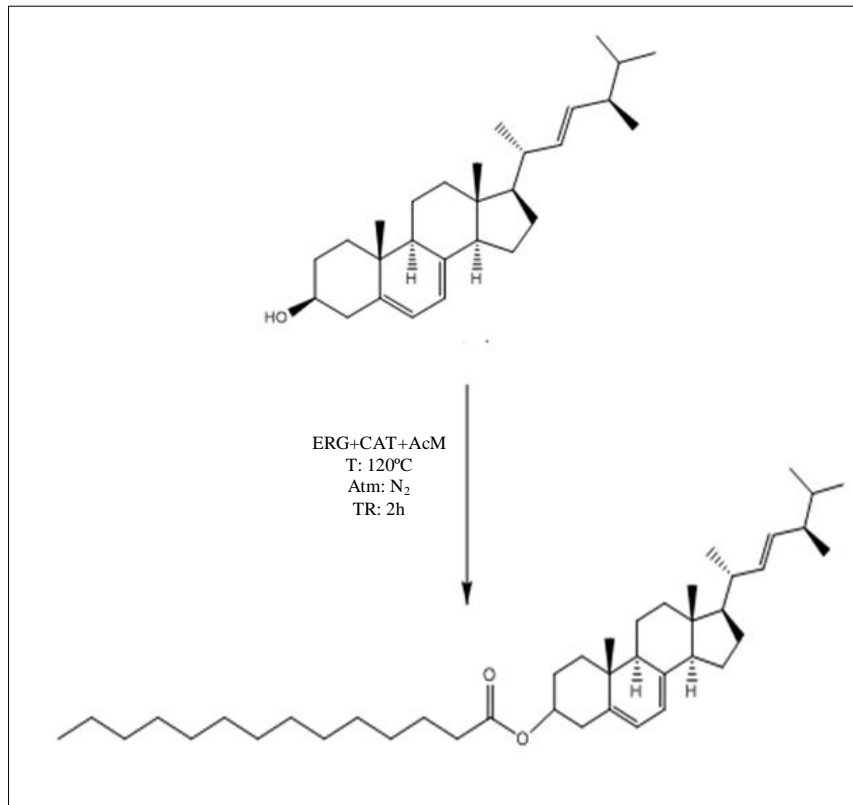


**Figura 7.** Reação de síntese química de ergosterol acetilado.

#### 3.2.2. Esterificação do ergosterol com ácido mirístico

Para a esterificação com um ácido gordo, nomeadamente o ácido mirístico, utilizou-se uma mistura de lauril sulfato de sódio e ácido clorídrico como catalisador. A preparação do catalisador e a reação de esterificação foram realizadas conforme os procedimentos otimizados por He *et al.* (2014). O catalisador foi preparado a partir da mistura de lauril sulfato de sódio (0,3 g) e ácido clorídrico (0,2 mL); estes foram macerados em hotte durante 10 minutos; após este tempo, a mistura foi mantida durante 20 minutos para a completa evaporação do ácido. A reação de esterificação foi realizada em atmosfera de azoto e foram utilizados uma razão molar de 2:1 (ácido mirístico:ergosterol) e 4% (m/m) de catalisador. O ácido mirístico (0,342 g) e o catalisador (0,027 g) foram

transferidos para um balão e mantidos sob agitação até ser atingida a completa homogeneização e fusão da mistura a 120°C. De seguida foi adicionado o ergosterol (0,3 g) e a mistura foi mantida em atmosfera de azoto sob agitação à 120°C por 2 horas. A reação foi monitorizada por TLC até não apresentar evolução. O produto (E-EST) foi posteriormente isolado por cromatografia em coluna. O esquema da reação é representado na **Figura 8**.

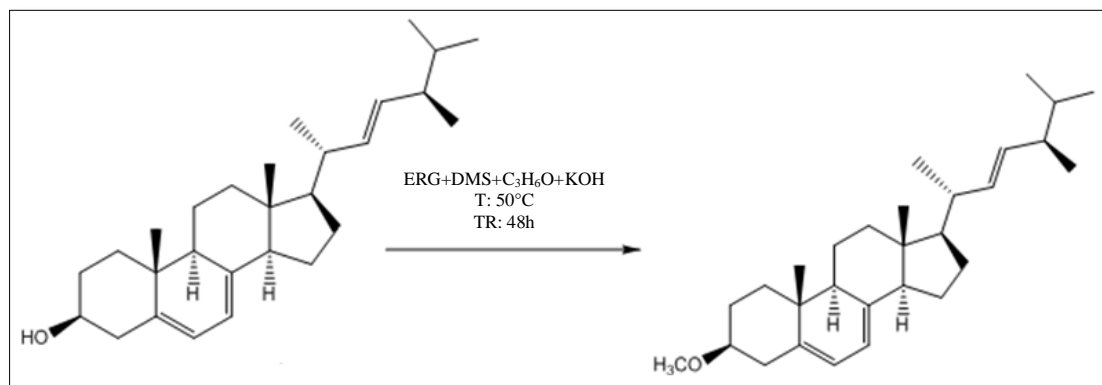


**Figura 8.** Reação de síntese química de ergosterol esterificado com ácido mirístico.

### 3.2.3. *Metilação do ergosterol*

O procedimento de metilação foi realizado de acordo com Heleno *et al.* (2014), com algumas modificações. O ergosterol (0,3 g) foi mantido sob agitação e refluxo com dimetil sulfato (2 Eq), KOH (4 Eq), acetona (60 mL) a 50°C durante 48 horas. A reação foi monitorizada por TLC até não apresentar evolução. Após o tempo de reação, o solvente foi evaporado sob baixa pressão e o resíduo foi ressuscitado com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1M). Em seguida, foi realizada extração com acetato de etilo (3x3 mL), os resíduos de água foram retirados da fase orgânica pela secagem com MgSO<sub>4</sub> e, por fim, esta foi

evaporada sob baixa pressão. O produto (E-MET) foi posteriormente isolado por cromatografia em coluna. O esquema da reação é representado na **Figura 9**.



**Figura 9.** Reação de síntese química de ergosterol metilado.

#### 3.2.4. Cromatografia em camada fina (TLC) e purificação dos produtos por cromatografia em coluna

Durante o decorrer das reações de modificação química da molécula de ergosterol foram retiradas amostras periodicamente para ser avaliada a conversão de ergosterol em outros produtos. Para isso, as amostras foram analisadas por cromatografia em camada delgada com placas DC-Fertigfolien ALUGRAM<sup>®</sup> Xtra SIL G/UV<sub>254</sub> (Düren, Germany) de 6,5x4 (cmxcm). O eluente utilizado foi éter de petróleo (60-80°C)/acetato de etilo (9:1, v/v).

A amostra obtida no final de cada reação foi diluída em éter de petróleo (60-80°C)/acetato de etilo e aplicada numa coluna (14x230 mm) contendo sílica em gel Geduran<sup>®</sup> Si 60 (Darnstadt, Germany). O eluente foi recolhido e a pureza do produto foi monitorizada por TLC por comparação com as manchas dos reagentes iniciais. Apenas as frações contendo o produto de interesse foram separadas e, posteriormente, o solvente foi evaporado sob pressão reduzida, permitindo o isolamento dos derivados, acetilado, esterificado e metilado. Após isolamento, os compostos foram caracterizados por <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

### 3.2.5. *Elucidação estrutural das moléculas obtidas por modificação química*

As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e analisadas em um espectrômetro de ressonância magnética nuclear Varian modelo Mercury Vx 400 MHz, usado para a obtenção dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H. Nestas análises, foi utilizado como referencial interno, o sinal do tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm).

### 3.2.6. *Avaliação de propriedades bioativas*

#### 3.2.6.1. Atividade captadora de radicais DPPH

Para a análise da atividade captadora de radicais DPPH, as amostras foram dissolvidas em clorofórmio de forma a obter uma concentração de 5 mg/mL e submetidas a diluições sucessivas, obtendo concentrações no intervalo de 0,078 a 5 mg/mL. Foram colocadas em tubos de ensaio (0,3 mL) juntamente com solução de DPPH (2,7 mL) preparada em clorofórmio (6x10<sup>-5</sup> mol/L). A mistura foi mantida em repouso durante 60 minutos ao abrigo da luz e, em seguida, foi realizada a leitura da absorvância a 515 nm. Foi utilizado um espectrofotômetro (UV-160A, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan). A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada a partir da equação [1].

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

Onde, **A<sub>A</sub>** corresponde ao valor da absorvância da solução contendo a amostra em análise e **A<sub>DPPH</sub>** corresponde a absorvância da solução de DPPH. Posteriormente, os resultados foram convertidos em EC<sub>50</sub>, que correspondem a ACR igual a 50%, a partir dos gráficos da percentagem de ACR em função da concentração da amostra, conforme Heleno *et al.* (2012). Foi utilizado trolox como padrão.

### 3.2.6.2. Atividade citotóxica em linhas celulares tumorais humanas

Para a análise da atividade citotóxica em linhas celulares tumorais, as moléculas obtidas por síntese química foram dissolvidas em DMSO:água destilada (50:50, v/v) de forma a obter uma concentração de 10 mM e submetidas a diluições sucessivas, obtendo concentrações na faixa de 1,95 a 125  $\mu$ M. Foram utilizadas as seguintes linhas celulares humanas: MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) obtidas no DSMZ – Leibniz – Institut DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH ECACC (*European Collection of Cell Cultures*). As células foram mantidas rotineiramente como culturas de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de FBS, inativado pelo calor, e glutamina a 2 mM (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), a 37°C, numa incubadora de ar humidificado contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para avaliar a citotoxicidade, foi realizado o ensaio da Sulforodamina B (SRB) de acordo com o procedimento previamente descrito por Abreu *et al.* (2011). Para isso, as linhas celulares foram colocadas em microplacas de 96 poços, juntamente com as diferentes diluições da amostra em análise, a uma densidade adequada (7,5x10<sup>3</sup> células/poço para MCF-7 e NCI-H460 e 1,0x10<sup>4</sup> células/poço para HeLa e HepG2) e foram incubadas durante 48 horas. Após o período de incubação, as células aderentes foram fixadas pela adição de ácido tricloroacético 10% previamente refrigerado (100  $\mu$ L) e incubadas por 60 minutos a 4°C. Decorrido esse período, as microplacas foram lavadas com água desionizada e secas. Em seguida, foi adicionado SRB (0,1% em ácido acético a 1%, 100 $\mu$ L) nos poços da microplaca e esta foi incubada por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foi removida a SRB não aderida pela lavagem com solução de ácido acético a 1% e novamente a placa foi seca. A SRB aderida foi solubilizada com Tris 10 mM (200  $\mu$ L) e a absorvância foi lida em comprimento de onda de 540 nm, no leitor de microplacas mencionado na seção 2.6.1. Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração da amostra que inibe 50% do crescimento celular). A elipticina foi utilizada como padrão.

### 3.2.6.3. Atividade citotóxica em células não tumorais

Para a análise da atividade citotóxica em células não tumorais, foram utilizadas as diluições dos produtos de síntese química descritas na seção 3.2.6.2. Uma cultura de

células foi preparada a partir de fígado de porco obtido num matadouro local, que foi designada PLP2 (*porcine liver primary culture*; cultura primária de células de fígado de porco). O tecido de fígado foi lavado com solução salina equilibrada de Hank (HBSS) (solução contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e divididos em explantes de 1x1mm<sup>3</sup>. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de 25cm<sup>2</sup> em DMEM suplementado com 10% de FBS, 2 mM de aminoácidos não essenciais e 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina, e incubados a 37°C em atmosfera humidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi renovado a cada dois dias e o crescimento celular foi acompanhado com um microscópio com contraste de fase. As células foram subcultivadas e plaqueadas em microplaca de 96 poços a uma densidade de 1,0x10<sup>4</sup> células/poço.

As células foram tratadas durante 48 horas com as diferentes diluições da amostra em análise seguindo o ensaio SRB anteriormente descrito, segundo Abreu *et al.* (2011). Os resultados foram expressos em valores de IG<sub>50</sub> (concentração de amostra que inibe 50% do crescimento celular na cultura primária PLP2). A elipticina foi utilizada como padrão.

#### 3.2.6.4. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada seguindo o procedimento descrito por Taofiq *et al.* (2015). Em resumo, a linha celular de macrófagos RAW 264.7 foi cultivada em meio DMEM e suplementada com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor, glutamina e antibióticos, mantida a 37°C sob 5% de CO<sub>2</sub>, em ar humidificado. Para cada ensaio foram utilizadas soluções a uma concentração de 5x10<sup>5</sup> células/mL. O teste de exclusão de corante azul de tripano foi utilizado para determinar a proporção de células mortas que se verificou ser inferior a 5%. As células foram transferidas para placas de 96 poços com 150.000 células/poço e permaneceram assim durante a noite para uma adequada aderência a placa. Em seguida, as células foram tratadas com soluções dos compostos em análise (concentrações descritas na secção 3.2.6.2) por 1 hora. Foi utilizada dexametasona como controlo positivo. A seguir, as células de macrófagos tratadas com os compostos foram estimuladas com LPS (1 µg/mL) durante um período de 18 horas. O efeito de todas as amostras testadas na ausência de LPS (lipopolissacárido) também foi avaliado, a fim de observar se estes induziram alterações

nos níveis basais de óxido nítrico (NO). Em controlos negativos não foi adicionado LPS. As amostras e o LPS foram dissolvidos em DMEM suplementado. Foi utilizado o kit de reagentes Griess que contém sulfanilamida, cloreto de hidrocloreto etilenodiamina N-(1-naftil) (NED), e soluções de nitrito foram utilizadas na quantificação de óxido nítrico. O sobrenadante da cultura celular (100 µL) foi transferido para outra placa e misturado com sulfanilamida e soluções NED, mantidos em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente. O óxido nítrico produzido foi determinado por medição da absorvância a 540 nm (leitor de microplacas ELX800 Biotek, Bio-Tek Instruments, Inc., Winooski, VT, EUA) e comparado com a curva de calibração padrão. Os valores IC<sub>50</sub> foram calculados a partir do gráfico que descreve a percentagem de inibição da produção de NO versus a concentração da amostra.

### **3.3. Microencapsulação de extrato de *A. bisporus* pela técnica de *spray drying***

#### **3.3.1. Amostras de *Agaricus bisporus* L.**

As amostras de *Agaricus bisporus* L., foram cedidas por uma empresa local produtora de cogumelos “Mogaricus Cogumelos - Sociedade Unipessoal Ltda”. Foram utilizados maioritariamente bioresíduos desta indústria, tais como exemplares que apresentavam características visuais menos apelativas (por exemplo, pé ou chapéu partidos). As amostras foram pesadas, congeladas, liofilizadas (liofilizados Freezone 4.5 modelo 7.750.031, Labconco, Kansas City, MO, EUA), reduzidas a pó e guardadas num exsiccador até posterior análise.

#### **3.3.2. Obtenção dos extratos**

Os extratos foram obtidos por extração assistida com ultrassons num equipamento QSonica modelo CI-334 (Newton, CT, EUA). O equipamento contém uma fonte de ultrassom capaz de operar numa faixa entre 100 e 500 W de potência, com frequência de 20 kHz e está equipado com um temporizador digital. As extrações foram realizadas de acordo com os procedimentos otimizados por Heleno *et al.* (2016). Assim, para cada extração foram pesados 3 g de amostra, que foram diluídas em 100 mL de etanol. As condições utilizadas foram 375 W e 15 minutos, para a potência e o tempo, respetivamente. Decorridos os 15 minutos para o tempo de extração, os extratos foram

filtrados (filtros Whatman n°4) e, em seguida, o solvente evaporado em condições de pressão reduzida.

Os resíduos secos obtidos foram redissolvidos em etanol para análise da atividade captadora de radicais DPPH conforme descrito na secção 3.2.5.1, porém numa faixa de concentração de 0,3125 a 20 mg/mL. Para a análise da atividade citotóxica em linha celular não tumoral (PLP2), o extrato foi dissolvido, primeiramente, numa mistura DMSO:água destilada (50:50, v/v) de forma a obter uma concentração de 400 µg/mL e posteriormente submetido a diluições sucessivas, obtendo-se concentrações na faixa de 1,56 µg/mL a 400 µg/mL que foram analisadas conforme descrito na secção 3.2.6.3.

### **3.3.3. *Quantificação de ergosterol***

O conteúdo em ergosterol foi determinado por HPLC-UV (cromatografia líquida de elevada eficiência acoplada a um detetor de ultra-violeta/visível (UV)). O extrato foi redissolvido em metanol de forma a obter uma concentração de 10 mg/mL e filtrado através de um filtro de nylon de 0,2 µm, de acordo com o procedimento descrito por Barreira *et al.* (2014). O cromatógrafo utilizado corresponde a um sistema integrado composto por uma bomba (Knauer, sistema Smartiline 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartiline manager 5000) e um injetor automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD, EUA), acoplado a um detector de UV (Knauer Smartline 2500). A separação cromatográfica foi obtida numa coluna de fase reversa Inertsil 100A ODS-3 (4,6 x 150 mm, 5 µm, BGB Analytik AG, Boeckten, Suíça) operando a 35°C (forno Grace 7971R). A fase móvel utilizada foi acetonitrilo/metanol (70:30, v/v), a um fluxo de 1 mL/min, e o volume de injeção foi de 20 µL. A detecção foi realizada a 280 nm. Quantificou-se o ergosterol por comparação da área do pico com a sua curva de calibração obtida a partir de um padrão comercial. A quantificação foi realizada usando o método do padrão interno, tendo-se neste caso utilizando colecalciferol. Os dados foram analisados usando o Software Clarity 2.4 (DataApex).

### ***3.3.4. Avaliação da reatividade do ácido cítrico com a maltodextrina e com o extrato e da estabilidade térmica do extrato às condições de encapsulação***

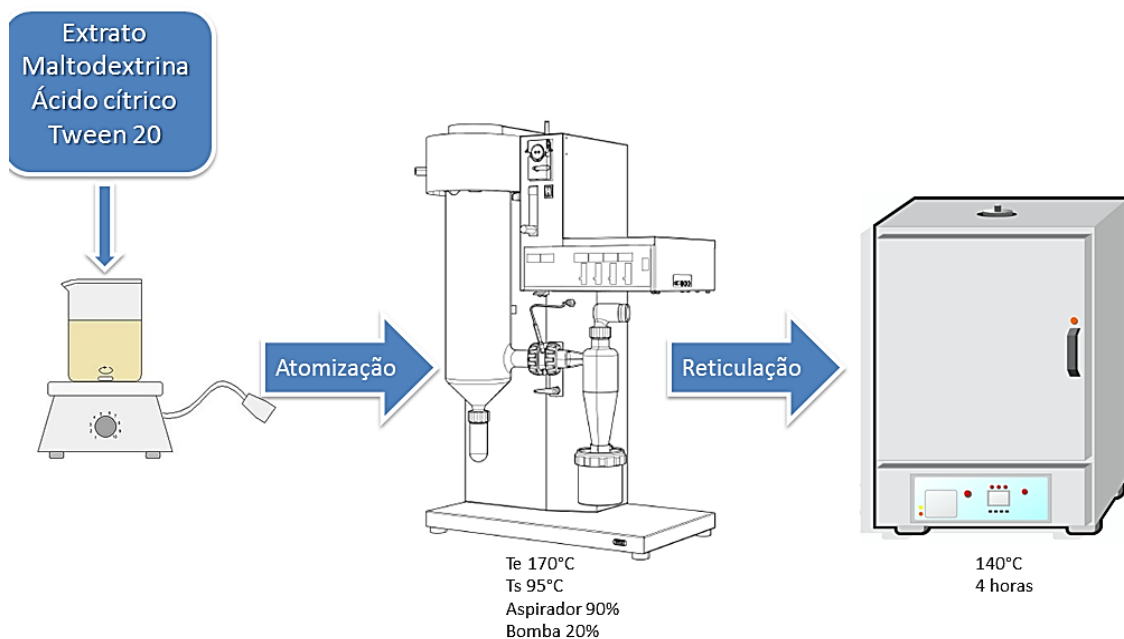
Este teste visou avaliar a capacidade de o ácido cítrico reagir com a maltodextrina e o extrato. O procedimento realizado seguiu o procedimento descrito por Castro-Cabado *et al.* (2016b) com algumas modificações. Em síntese, a maltodextrina foi solubilizada em água destilada sob agitação, seguida da adição de ácido cítrico (10%, base maltodextrina) mantendo a agitação até completa solubilização dos compostos. Esta solução (5 mL) foi vertida para uma placa de petri e colocada numa estufa à temperatura de 140°C durante 4 horas (condições selecionadas tendo em consideração que não se pretendiam utilizar temperaturas muito elevadas nem tempos muito longos). Para o extrato este foi solubilizado em uma mistura água:etanol (9:1, v/v) sob agitação, seguido da adição de ácido cítrico (10%, base maltodextrina) mantendo agitação até completa solubilização dos compostos. Esta solução (5 mL) foi vertida para uma placa de petri e colocada numa estufa à temperatura de 140°C durante 4 horas. Adicionalmente, foram preparadas soluções contendo apenas maltodextrina ou extrato nas mesmas concentrações que foram submetidas às mesmas condições anteriormente descritas. As amostras obtidas foram analisadas por TG e FTIR. A maltodextrina não submetida a tratamento térmico foi designada por (MAL-ST), a maltodextrina submetida a tratamento térmico foi designada por (MAL-CT) e a maltodextrina com ácido cítrico submetidos a tratamento térmico foi designada (MAL+AC-CT). Designações equivalentes foram atribuídas às amostras contendo extrato (EXT-ST, EXT-CT e EXT+AC-CT).

### ***3.3.5. Estudos de microencapsulação***

A microencapsulação foi realizada pela técnica de *spray drying* utilizando a maltodextrina reticulada com ácido cítrico como material encapsulante. O procedimento realizado e as condições de operação utilizadas foram adaptados do descrito por RIBEIRO *et al.* (2015) com algumas modificações. Tal compreendeu a preparação de uma solução com uma razão extrato/maltodextrina de 1/20 (m/m) e ácido cítrico (10%, base maltodextrina) resultando numa solução com uma fração de sólidos de 24,5%. As condições de operação foram as seguintes: temperatura de entrada 170°C, temperatura de saída 95°C, aspirador a 90% e bomba a 20% (6 mL/min). Para preparar a solução de

atomização, o extrato (1 g) foi dissolvido primeiramente em etanol (10 mL) seguido pela adição de água (90 mL) para a obtenção de uma solução homogênea. Posteriormente o ácido cítrico (3,5 g) foi adicionado sob agitação até completa dissolução, seguida da adição do Tween 20 (20 µL) e por fim foi adicionada a maltodextrina (20g) mantendo a agitação até a completa homogeneização da solução. Este procedimento foi realizado imediatamente antes da atomização da solução. O equipamento utilizado foi um Mini Spray Dryer B-290 Buch (Flawil, Switzerland) em conjunto com um Inert Loop B-295 para promover uma circulação em circuito fechado sob atmosfera de azoto. O bocal utilizado tinha um diâmetro de 0,7 mm e o volume atomizado foi de 100 mL. Foram também produzidas microesferas contendo apenas maltodextrina ou maltodextrina e ácido cítrico com o objetivo de serem utilizadas como controlos. Após atomização, uma amostra das microesferas recolhidas foi mantida na estufa a 140°C durante 4 horas para avaliar a extensão da reação de reticulação. Estas esferas designaram-se por ESF-CT. As correspondentes esferas sem tratamento foram designadas por ESF-ST. As correspondentes esferas vazias, i.e. sem incluir extrato, foram designadas por ESFV-ST e ESFV-CT, respetivamente para o caso de não terem sido submetidas ao tratamento térmico e para o caso de o tratamento ter sido efetuado.

A **Figura 10** esquematiza o processo de encapsulação pela técnica de *spray drying* adotado no presente estudo.



**Figura 10.** Esquematização do processo de encapsulação do extrato pela técnica de *spray drying*.

### 3.3.6. Caracterização das microesferas

#### 3.3.6.1. Rendimento de encapsulação (R)

O rendimento de encapsulação (R) foi determinado gravimetricamente como a razão entre a massa de microesferas recolhida no final do processo e a massa dos materiais atomizados, conforme a equação [2].

$$R = \frac{M_f}{M_i} \times 100 \quad [2]$$

Onde **M** se refere à soma das massas dos materiais utilizados na encapsulação **i** e **f** se referem ao início e ao fim do processo, respetivamente. Esse parâmetro fornece uma estimativa das perdas de material durante o processo de encapsulação.

#### 3.3.6.2. Eficiência de Encapsulação (EE)

A Eficiência de Encapsulação (EE) foi determinada como a razão entre o extrato encapsulado determinado experimentalmente por HPLC, em termos de ergosterol (o componente maioritário identificado no extrato), e o valor teórico, conforme a equação [3].

$$EE = \frac{ERG_{experimental}}{ERG_{teórica}} \times 100 \quad [3]$$

Onde **ERG<sub>experimental</sub>** refere-se à massa de ergosterol encapsulado determinada experimentalmente e **ERG<sub>teórica</sub>** refere-se à massa de ergosterol teórica adicionada no processo de encapsulação.

A massa de ergosterol encapsulado foi determinada conforme descrito na secção 3.3.3.

### 3.3.6.3. Carga em extrato ( $C_{ext}$ )

O conceito de carga (*load*) em extrato ( $C_{ext}$ ) é utilizado para expressar o teor de extrato nas microesferas produzidas, sendo um parâmetro de grande utilidade para o cálculo da quantidade de microesferas a incorporar num dado produto alimentar. Esse parâmetro foi calculado através da equação [4].

$$C_{ext} = \frac{EXT_{experimental}}{e_f} \quad [4]$$

Onde  $EXT_{experimental}$  refere-se à massa de extrato encapsulado determinada experimentalmente e  $e_f$  a massa de esferas formadas.

### 3.3.6.4. Caracterização biológica

As microesferas obtidas foram solubilizadas em água para análise da atividade captadora de radicais DPPH conforme descrito na secção 3.2.5.1, porém numa faixa de concentração de 7,8 mg/mL a 500 mg/mL. Para a análise da atividade citotóxica em linha celular não tumoral (PLP2), as microesferas foram dissolvidas em DMSO:água destilada (50:50, v/v) de forma a obter uma concentração de 400 µg/mL e submetido a diluições sucessivas, obtendo concentrações na faixa de 1,56 µg/mL a 400 µg/mL que foram analisadas conforme descrito na secção 3.2.6.3.

### 3.3.6.5. Caracterização do tamanho de partícula

As microesferas obtidas na secção 3.3.5. foram analisadas num equipamento Malvern Mastersizer 3000 equipado com uma unidade de dispersão Hydro MV (Malvern, Reino Unido). Os dados foram obtidos com o *software* Mastersizer versão 3.10.

### 3.3.7. *Análise Termogravimétrica (TGA)*

A análise termogravimétrica foi realizada em um equipamento NETZSCH modelo TG 209 F3 Tarsus (Selb, Alemanha) nas condições descritas por Castro-Cabado *et al.*

(2016b). Os materiais de base descritos e as amostras obtidas na secção 3.3.4.1 e as microesferas obtidas na secção 3.3.5 foram aquecidos em cadinho de alumina de 10 a 600°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min sob fluxo de azoto. Os termogramas foram obtidos em *software* Netzsch Proteus – Thermal Analysis, versão 5.2.1.

### **3.3.8. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)**

Os materiais de base descritos e as amostras obtidas na secção 3.3.4.1 e as microesferas obtidas na secção 3.3.5 foram analisadas num equipamento MB300 (ABB, Zurique, Suíça) composto de um cristal de diamante em modo ATR com os seguintes parâmetros: 32 scans/min, resolução de 16 cm<sup>-1</sup> e uma gama de leitura de 4000-550 cm<sup>-1</sup>. Os espectros foram obtidos com o *software* Horizon MB versão 3.4.

## **3.4. Funcionalização de matrizes alimentares lipofílicas e hidrofílicas com micoesteróis**

### **3.4.1. Incorporação do ergosterol e seu derivado acetilado em maionese**

A maionese base foi adquirida num supermercado local da cidade de Bragança – Portugal. A sua composição consiste em: óleo de colza, água, vinagre de álcool, gema de ovo, açúcar, sal, mostarda (água, sementes de mostarda, vinagre de álcool, sal e especiarias), amido modificado, espessante (E415), reguladores de acidez (E262(i) e sumo de limão concentrado) e antioxidantes, com a seguinte declaração nutricional por 100 mL de maionese: energia: 609 kcal; lípidos: 65,7 g das quais 5,1 g correspondendo a ácidos gordos saturados; hidratos de carbono: 3,4 g das quais 2,9 g correspondendo a açúcares; proteínas: 0,8 g e; sal: 1,07g.

A maionese incorporada com ergosterol foi utilizada como controlo positivo (MCP) e a maionese sem adição de qualquer micoesterol foi utilizada como controlo negativo (MCN). Dos três compostos obtidos por modificação química, foi selecionado para incorporação o que apresentou maior bioatividade, o derivado acetilado. Os ensaios de incorporação ergosterol acetilado (ME-ACT), bem como dos controlos negativo e positivo, foram realizados conforme os dados apresentados na **Tabela 3**. A massa de

ME-ACT incorporada foi dez vezes o  $GI_{50}$  obtido para a linha celular MCF-7 (carcinoma de mama) na avaliação da atividade citotóxica.

**Tabela 3. Quantidade de ergosterol (ERG) ou ergosterol acetilado (E-ACT) incorporada em maionese.**

Ensaio	ERG ou E-ACT (g)	Maionese (g)	Total (g)
MCN - Maionese controlo negativo	-	25,000	25,000
MCP - Maionese controlo positivo	0,065 g	24,935	25,000
ME-ACT - Maionese com E-ACT	0,065 g	24,935	25,000

### 3.4.2. Incorporação de extrato de *Agaricus bisporus* com micoesteróis, na forma livre e microencapsulada em iogurte

O iogurte foi adquirido num mercado local da cidade de Bragança – Portugal. e sua composição por 100g de iogurte consiste em: : energia: 75 kcal; lípidos 3,8 g das quais 2,4 g correspondendo a ácidos gordos saturados; hidratos de carbono: 4,7 g correspondendo a açúcares; proteínas: 5,0 g e; sal: 0,15 g.

O iogurte incorporado com extrato livre foi utilizado como controlo positivo (ICP) e o iogurte sem adição de qualquer micoesterol foi utilizada como controlo negativo (ICN). Os ensaios de incorporação do extrato microencapsulado (ESF-ST e ESF-CT), bem como dos controlos negativo e positivo, foram realizados conforme os dados apresentados na **Tabela 4**. A massa de extrato livre incorporada no iogurte foi 40 mg e a massa de microesferas foi de 2,5 g, massa que contém 40 mg de extrato.

**Tabela 4. Quantidade de extrato (EXT) ou extrato microencapsulado (ESF-ST e ESF-CT) incorporada em iogurte.**

Ensaio	EXT ou ESF-ST/CT (g)	Iogurte (g)	Total (g)
ICN - Iogurte controlo negativo	-	50,000	50,000
ICP - Iogurte controlo positivo	0,040 g	49,960	50,000
IESF-ST - Iogurte com ESF-ST	2,500 g*	47,500	50,000
IESF-CT – Iogurte com ESF-CT	2,500 g*	47,500	50,000

\*Massa de microesferas que compreende 40 mg de extrato.

### 3.4.3. Avaliação nutricional e das propriedades bioativas dos produtos finais

#### 3.4.3.1. Composição centesimal

Determinou-se o teor em proteínas, hidratos de carbono, gorduras, humidade e cinzas seguindo os procedimentos oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). A proteína foi determinada pelo método macro-Kjeldahl e foi utilizado o fator 6,38 para a conversão do teor de azoto em proteína total. A gordura foi determinada a partir da extração por maceração com clorofórmio (0,15 g/mL). As cinzas foram determinadas por incineração a  $600 \pm 15^\circ\text{C}$ . Os hidratos de carbono totais foram obtidos por diferença. A energia foi calculada a partir da equação [5].

$$E = 4(p + hc) + 9g \quad [5]$$

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

#### 3.4.3.2. Açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados no sistema de HPLC descrito na secção 3.3.3, mas acoplado a um detector de índice de refração (IR) (Knauer Smartiline 2300). A separação cromatográfica foi obtida com uma coluna Eurospher 100-5 NH2 (5  $\mu\text{m}$ , de 250 mm x 4,6 mm de diâmetro interno, Knauer) operando a  $35^\circ\text{C}$ . A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) a um fluxo de 1 mL/min (HELENO *et al.*, 2009). Os açúcares foram identificados por comparação dos tempos de retenção dos picos obtidos nas amostras com os picos dos padrões. A quantificação baseou-se no sinal do detetor de índice de refração aplicando o método do padrão interno (melezitose). Os dados obtidos foram analisados usando o *software* mencionado na secção 3.3.3. Os resultados obtidos foram expressos em g por 100 g de iogurte.

#### 3.4.3.3. Ácidos gordos

O perfil de ácidos gordos foi determinado a partir da gordura bruta obtida por maceração no caso da maionese e por Soxhlet no caso do iogurte. Para isso, foi realizado procedimento de trans-esterificação conforme descrito por Heleno *et al.* (2009) e os produtos foram analisados em um cromatógrafo gasoso (DANI 1000, Contone, Suíça) equipado com um injetor *split/splitless* e um detetor de ionização em chama (GC-FID a 260°C). Foi utilizada uma coluna Macherey-Nagel (Düren, Alemanha) (50% cianopropilmetilo, fenilmetilpolisiloxano, 30m x 0,32 mm diâmetro interno x 0,25 mm d<sub>f</sub>). O forno teve a seguinte programação de temperatura: temperatura inicial de 50°C, mantida durante 2 minutos, aumento gradual de 30°C/min até 125°C, aumento gradual de 5°C/min até 160°C, aumento gradual de 20°C/min até 180°C, aumento gradual de 3°C/min até 200°C, aumento gradual de 20°C/min até 220°C, mantidos durante 15 minutos. O gás de arraste utilizado foi o hidrogénio, em um fluxo de 4,0mL/min (0,61 bar), medido a 50°C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250°C. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com os tempos de retenção de padrões (FAME). O *software* utilizado foi o CSW 1.7 (DataApex1.7, Praga, República Checa). Os resultados foram expressos em porcentagem relativa de cada ácido gordo.

#### 3.4.3.4. Propriedades bioativas

As amostras de maionese foram avaliadas quanto à atividade citotóxica em células tumorais e não tumorais e atividade anti-inflamatória. As amostras em fresco foram submetidas à extração com clorofórmio conforme descrito na secção 3.4.3.1. Para a avaliação da atividade citotóxica em células tumorais e não tumorais e atividade anti-inflamatória as amostras foram testadas em concentrações na faixa de 1,56 µg/mL a 400 µg/mL e foram seguidos os protocolos descritos nas secções 3.2.6.2, 3.2.6.3 e 3.2.6.4, respetivamente.

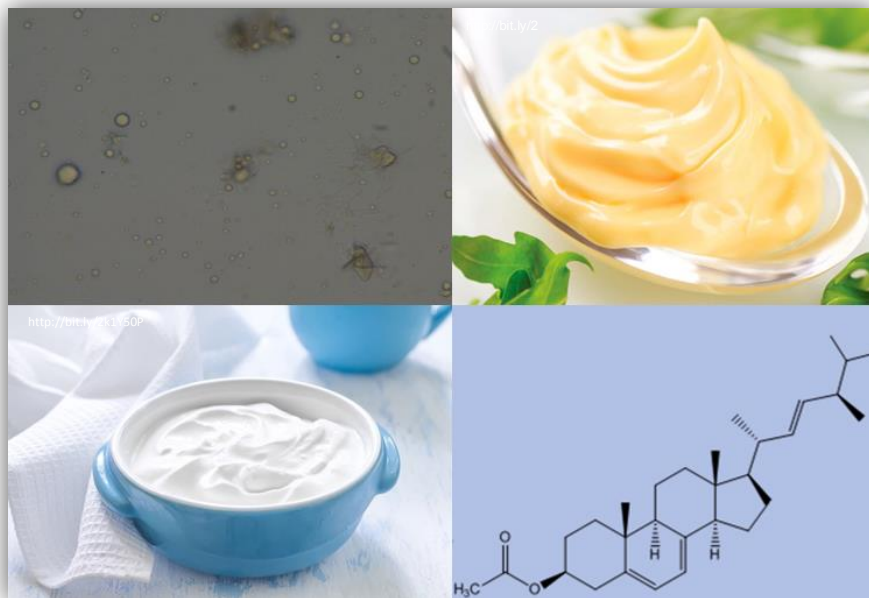
As amostras de iogurte foram avaliadas quanto à atividade captadora de radicais DPPH e atividade citotóxica em células não tumorais. As amostras liofilizadas foram submetidas ao processo de extração com ultrassons aplicado na obtenção dos extratos de

*Agaricus bisporus* e descrito na secção 3.3.2. Para a avaliação da atividade antioxidante foram preparadas diluições na faixa de 6,25 mg/mL a 400 mg/mL.

### **3.5. Análise estatística**

Foram utilizadas três repetições das amostras e triplicados para cada leitura de concentração em todos os ensaios. Os resultados foram expressos como valores médios  $\pm$  desvio padrão. Os resultados foram analisados utilizando a análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste HSD de Tukey com  $p = 0,05$ . Para cada parâmetro com apenas dois valores disponíveis, foi aplicado um teste t de Student para determinar a diferença significativa entre as amostras correspondentes, com  $p = 0,05$ . Quando o valor p foi inferior a 0,05, foram consideradas diferenças significativas entre as amostras. As análises foram realizadas com o IBM SPSS Statistics, versão 23.0. (IBM Corp., Armonk, Nova York, EUA).

# 4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

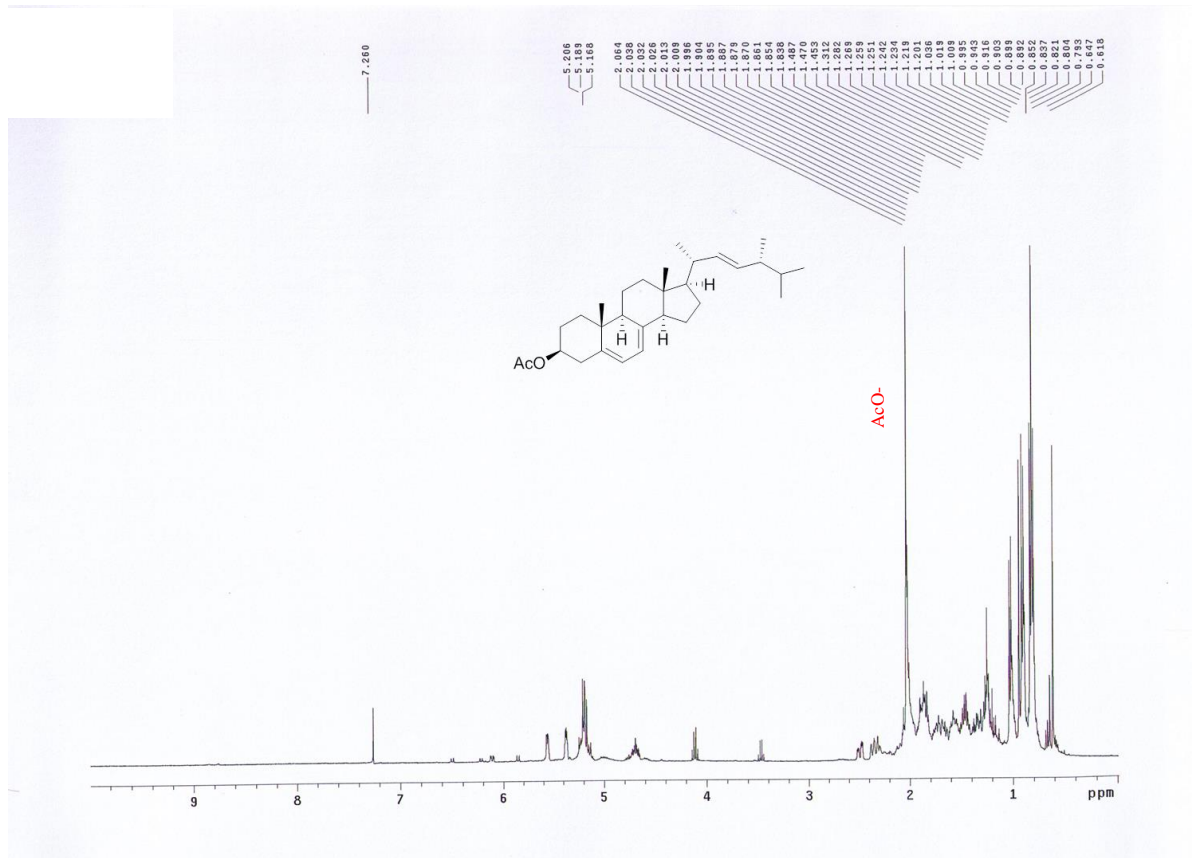






sinal do hidrogénio do grupo hidroxilo com um desvio químico de 3,6 ppm, conforme representado na **Figura 11**.

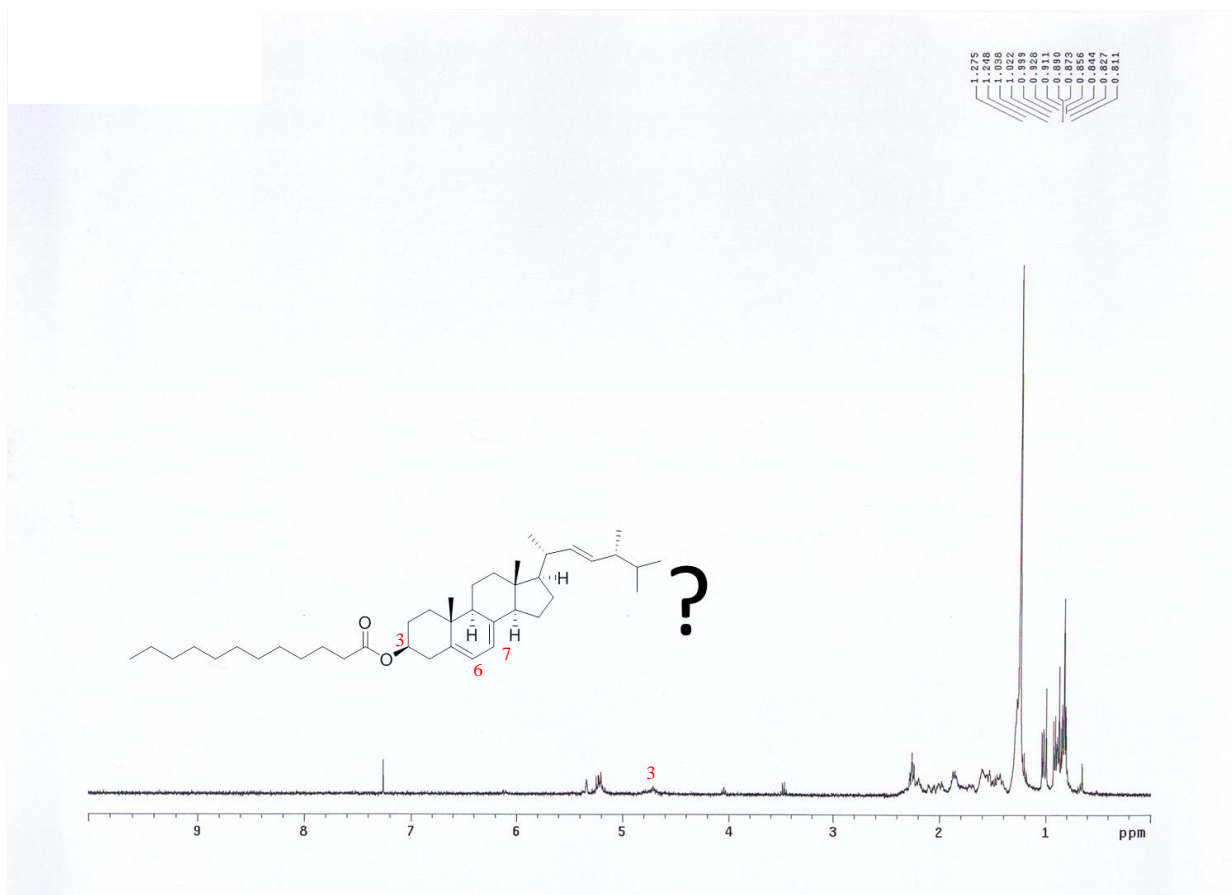
### Derivado acetilado:



**Figura 12.** Espectro de <sup>1</sup>HRMN da molécula de ergosterol acetilada.

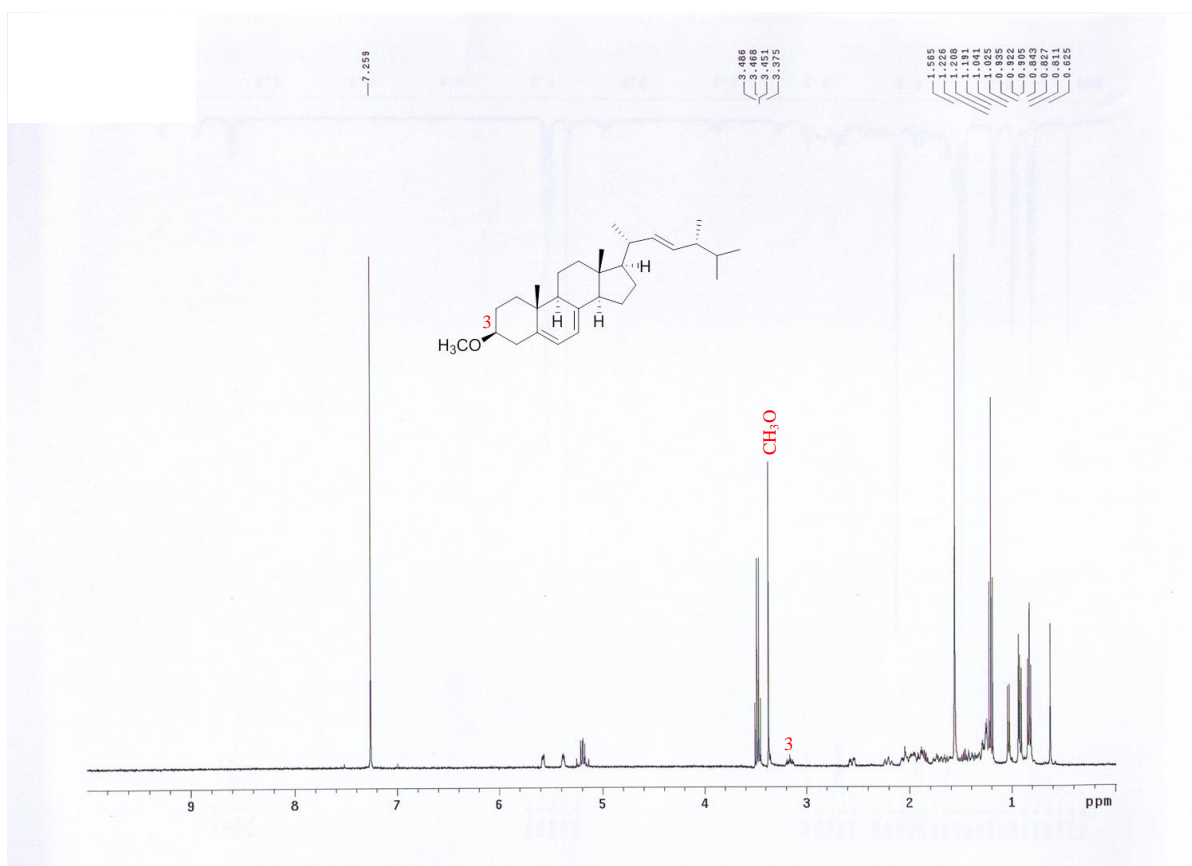
A molécula obtida pela reação de acetilação (E-ACT), por sua vez, apresenta os mesmos sinais com o desvio químico de 0,6-1,0 ppm referentes aos grupos metilo. No entanto apresenta a 2,0 ppm, o sinal característico do metilo do grupo acetilo. De salientar a alteração do desvio relativo ao hidrogénio do grupo hidroxilo de 3,6 ppm para 4,7 ppm, provocado pelo grupo acetilo que confere menor proteção a este hidrogénio, conforme representado na **Figura 12**.

## Derivado esterificado:



**Figura 13.** Espectro de  $^1\text{H}$ RMN da molécula obtida pela reação de esterificação do ergosterol com ácido mirístico.

O espectro de  $^1\text{H}$ RMN obtido para a molécula resultante da reação de esterificação do ergosterol com ácido mirístico (E-EST) apresenta sinais que podem indicar a formação de uma ligação éster entre o ergosterol e o ácido mirístico, uma vez que, foram identificados sinais referentes a ambos os reagentes de partida e também um pequeno multiplete, a 4,7 ppm, correspondente ao H-3 de um éster de ergosterol, conforme representado na **Figura 13**. Entretanto, só foi observado um dos dois prótons do anel B (H-6 e H-7) da molécula de ergosterol, embora seja possível que a conformação da molécula com a grande cadeia linear (ácido gordo) possa afetar estes hidrogénios, modificando o desvio químico. No entanto, não foi possível confirmar a formação da molécula esperada, pelo que outras análises serão realizadas para a confirmação de sua estrutura, nomeadamente espectroscopia de massa.

**Derivado metilado:**

**Figura 14.** Espectro de  $^1\text{HRMN}$  da molécula de ergosterol metilada.

A molécula obtida por metilação (E-MET), foi caracterizada pela presença do sinal referente ao grupo metoxilo a 3,38 ppm e o deslocamento (proteção) do sinal referente ao sinal do hidrogénio do grupo hidroxilo da molécula de ergosterol anteriormente a 3,6 ppm para 3,2 ppm, confirmando a metilação da molécula de ergosterol, conforme representado na **Figura 14**.

#### **4.1.2. Avaliação das propriedades bioativas do ergosterol e derivados**

A **Tabela 5** apresenta os resultados obtidos referentes às propriedades bioativas avaliadas para o ergosterol e as moléculas obtidas por síntese química, sendo estas atividades antioxidante, citotóxica e anti-inflamatória.

Estudos sugerem que o ergosterol é a principal molécula responsável pela atividade antioxidante de extratos de cogumelos (SHAO *et al.*, 2012). O  $\text{EC}_{50}$ , que representa a concentração responsável por 50% de atividade captadora de radicais livres de DPPH, verificado para a molécula de ergosterol foi de 0,2 mg/mL. Sabe-se que a atividade

antioxidante de compostos bioativos está relacionada com a presença de grupos hidroxilo na sua estrutura. As três técnicas de modificação da molécula de ergosterol realizadas nesse trabalho caracterizam-se pela substituição do grupo hidroxilo da molécula de ergosterol por grupos mais apolares. Dessa forma e tal como esperado, as moléculas sintetizadas, caracterizadas pela ausência de grupos hidroxilo, não apresentaram atividade captadora de radicais DPPH.

Relativamente aos resultados obtidos na avaliação da atividade citotóxica em células tumorais destaca-se a molécula de ergosterol como agente eficiente na inibição do crescimento celular, uma vez que, em todas as linhas celulares analisadas, apresentou, dentre todas as amostras em estudo, o menor  $GI_{50}$  que é a concentração responsável por 50% da inibição do crescimento celular. Entre os compostos obtidos por síntese química, aquele que melhor apresentou atividade antitumoral foi a molécula de ergosterol acetilada, resultando num  $GI_{50}$  inferior ao de todas as moléculas sintetizadas, em todas as linhas celulares analisadas, sendo apenas menos eficiente que a molécula precursora, o ergosterol. Já a molécula esterificada foi a que apresentou os resultados menos promissores, verificando-se apenas atividade para a linha celular tumoral de carcinoma de mama (MCF-7).

Por outro lado, através dos resultados obtidos em células não tumorais- PLP2 ( $GI_{50}$  de 89,54  $\mu\text{g/mL}$ ), pode-se concluir que a molécula de ergosterol não é seletiva apenas para linhas celulares tumorais. Por seu lado, apesar de apresentarem uma atividade antitumoral relativamente inferior à do ergosterol, nenhuma das moléculas sintetizadas apresentou toxicidade para as células normais, à máxima concentração testada. De realçar a importância destes resultados, uma vez que ao não apresentarem toxicidade em células não-tumorais, podem ser utilizados numa concentração maior de forma a obter a atividade pretendida.

A atividade anti-inflamatória, que foi avaliada como a capacidade da molécula inibir 50% da formação de NO durante um processo de inflamação, confirmou que o ergosterol apresenta uma boa atividade, resultando num  $IC_{50}$  de 8,29  $\mu\text{g/mL}$ , valor bastante inferior a 137,56 e 280,71  $\mu\text{g/mL}$ , obtidos para as moléculas acetilada e metilada, respetivamente. A molécula esterificada não apresentou atividade anti-inflamatória.

**Tabela 5. Propriedades bioativas do ergosterol e dos seus derivados obtidos por síntese química.**

<b>Atividade Antioxidante (EC<sub>50</sub>, mg/mL)</b>	<b>ERG</b>	<b>E-ACT</b>	<b>E-MET</b>	<b>E-EST</b>
Atividade captadora de radicais DPPH	0,20 ± 0,01	-	-	-
<b>Atividade citotóxica (GI<sub>50</sub>, µg/mL)</b>				
MCF-7 (carcinoma de mama)	30 ± 2 <sup>c</sup>	260 ± 17 <sup>b</sup>	290 ± 11 <sup>a</sup>	267 ± 12 <sup>b</sup>
NCI-H460 (carcinoma de pulmão)	119 ± 8 <sup>c</sup>	162 ± 7 <sup>b</sup>	338 ± 14 <sup>a</sup>	>400
HeLa (carcinoma cervical)	38 ± 2 <sup>c</sup>	196 ± 12 <sup>b</sup>	273 ± 13 <sup>a</sup>	>400
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	94 ± 1 <sup>c</sup>	221 ± 11 <sup>b</sup>	256 ± 12 <sup>a</sup>	>400
PLP2 (células não tumorais de fígado de porco)	89 ± 4	>400	>400	>400
<b>Atividade anti-inflamatória (IC<sub>50</sub>, µg/mL)</b>				
Inibição de NO	8 ± 1 <sup>c</sup>	138 ± 41 <sup>b</sup>	281 ± 12 <sup>a</sup>	>400

Valores de EC<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante. Valor de EC<sub>50</sub> para o Trolox (controlo positivo): 42 µg/mL (atividade captadora DPPH). Valores de GI<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% de inibição do crescimento nas linhas celulares tumorais humanas ou na cultura primária de células de fígado - PLP2. Valores de GI<sub>50</sub> para a Elipticina (controlo positivo): 1,0 µg/mL (MCF-7), 1,0 µg/mL (NCI-H460), 2,0 µg/mL (HeLa), 1,0 µg/mL (HepG2) e 3 µg/mL (PLP2). Valores de IC<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% da inibição da produção de NO em comparação com o controle negativo (100% da produção de NO). Valor de IC<sub>50</sub> para a Dexametasona (controlo positivo): 16 µg/mL. ERG: ergosterol; E-ACT-ergosterol acetilado; E-MET: ergosterol metilado; E-EST: ergosterol esterificado. Em cada linha, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

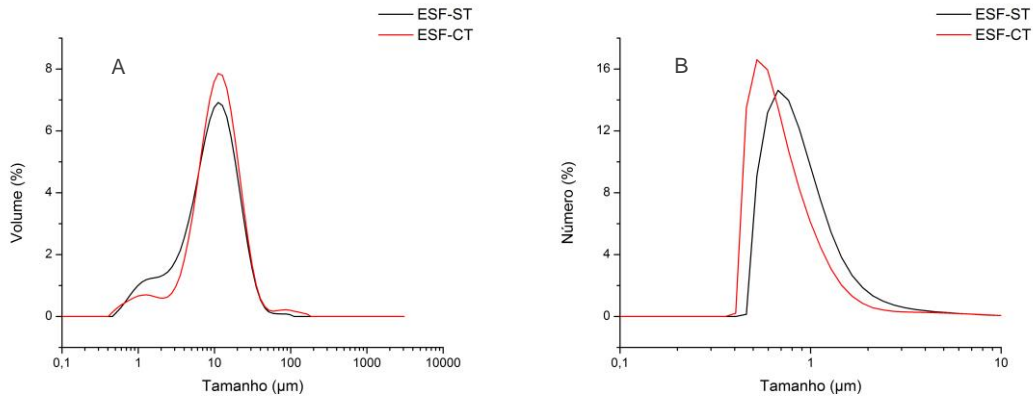
## **4.2. Microencapsulação de extrato de *Agaricus bisporus* pela técnica de *spray drying***

### **4.2.1. *Rendimento e eficiência de encapsulação do processo e carga em extrato das microesferas***

As microesferas contendo o extrato foram caracterizadas quanto ao rendimento do processo (R) que relaciona a massa obtida após atomização com a massa inicial, sendo um parâmetro que quantifica a perda global de material durante o processo de atomização, tendo-se obtido um rendimento de 35%. A eficiência de encapsulação (EE), determinada por HPLC, é o parâmetro que quantifica as perdas de princípio ativo (extrato) durante o processo de atomização. No presente estudo a EE foi de 40,2%. Adicionalmente, a carga em extrato (*load*) das microesferas, parâmetro que representa a massa de extrato presente em 1g de microesferas foi determinada foi de 16,4 mg EXT/g microesferas. Na prática, esse parâmetro é fundamental pois fornece o teor do princípio ativo no material final obtido sendo útil para determinar a massa de esferas a incorporar para a funcionalização de matrizes alimentares.

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

A **Figura 15** representa a distribuição de tamanho de partícula (em volume e em número) das microesferas obtidas pela técnica de *spray drying*. Os dados foram expressos em  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  que correspondem, respectivamente, ao tamanho de partícula máximo correspondente a 10, 50 e 90% das partículas.



**Figura 15.** Distribuição do tamanho de partícula das microesferas obtidas pela técnica de *spray drying*. Distribuição em volume para as esferas com e sem tratamento (A) Distribuição em número para as esferas com e sem tratamento (B).

As microesferas apresentaram uma distribuição de tamanhos em volume que varia entre 2,3000 e 25,3000  $\mu\text{m}$  (tamanho médio de 11,34 e 13,42  $\mu\text{m}$ , respetivamente para as microesferas ST e CT) e em número entre 0,5050 e 1,6800  $\mu\text{m}$  (tamanho médio de 1,03 e 0,85  $\mu\text{m}$ , respetivamente para as microesferas ST e CT). Através da análise da **Figura 15A** pode-se verificar que a distribuição de tamanho em volume é semelhante para os dois tipos de microesferas (ESF-ST e ESF-CT). No que respeita à distribuição em número (**Figura 15B**), as microesferas sem tratamento térmico (ESF-CT) apresentam uma distribuição ligeiramente deslocada para uma gama de tamanhos inferiores.

Os valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  para as distribuições em volume e número são apresentados na **Tabela 6**. De acordo com os valores obtidos, para a distribuição em número, 90% das ESF-ST possuem tamanhos inferiores a 1,6800  $\mu\text{m}$ , enquanto que para as ESF-CT esse valor é de 1,3100  $\mu\text{m}$ .

**Tabela 6.** Valores de  $D_{10}$ ,  $D_{50}$  e  $D_{90}$  obtidos para as distribuições em volume e em número das microesferas obtidas.

		$D_{10}(\mu\text{m})$	$D_{50}(\mu\text{m})$	$D_{90}(\mu\text{m})$
<b>Distribuição em volume</b>	ESF-ST	2,3000 $\pm$ 0,0300	10,2000 $\pm$ 0,0800	24,2000 $\pm$ 0,5900
	ESF-CT	3,8100 $\pm$ 0,0040	11,5000 $\pm$ 0,0200	25,3000 $\pm$ 0,1200
<b>Distribuição em número</b>	ESF-ST	0,6000 $\pm$ 0,0010	0,8660 $\pm$ 0,0010	1,6800 $\pm$ 0,0070
	ESF-CT	0,5050 $\pm$ 0,0001	0,7000 $\pm$ 0,0004	1,3100 $\pm$ 0,0008

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

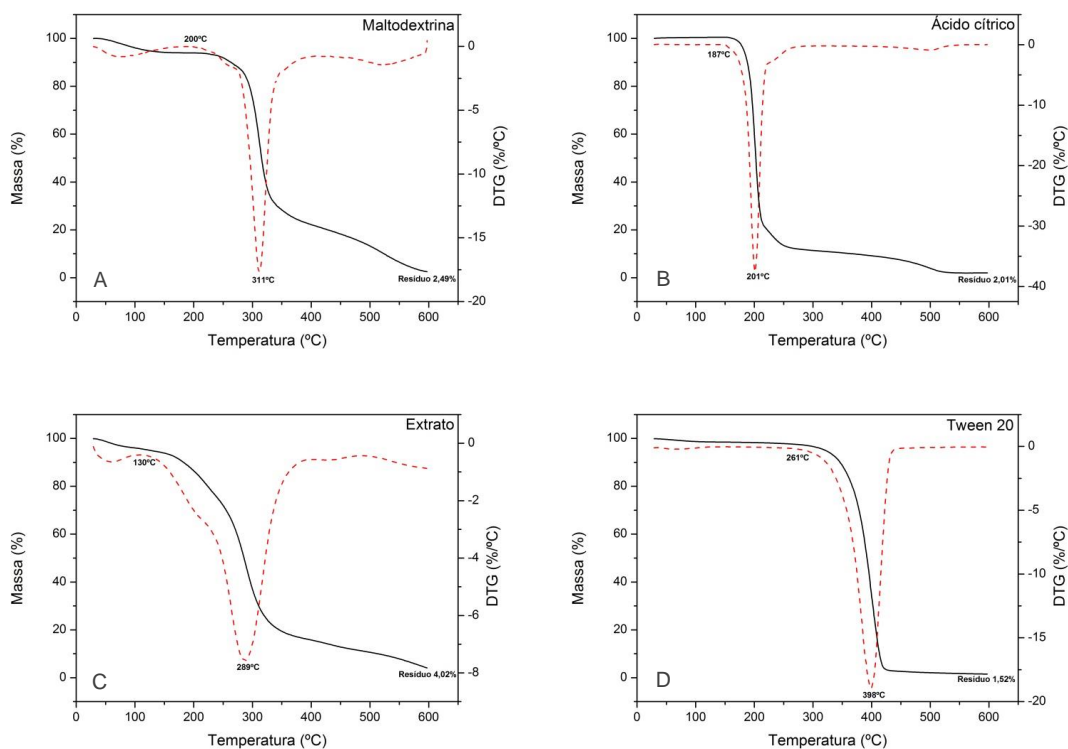
### 4.2.3. Análise termogravimétrica (TGA)

#### 4.2.3.1. Caracterização dos materiais de base

Os materiais de base (maltodextrina, ácido cítrico, extrato e Tween 20) foram analisados previamente por TG/DTG visando a caracterização do sistema utilizado no processo de encapsulação. A **Figura 16** apresenta os termogramas obtidos.

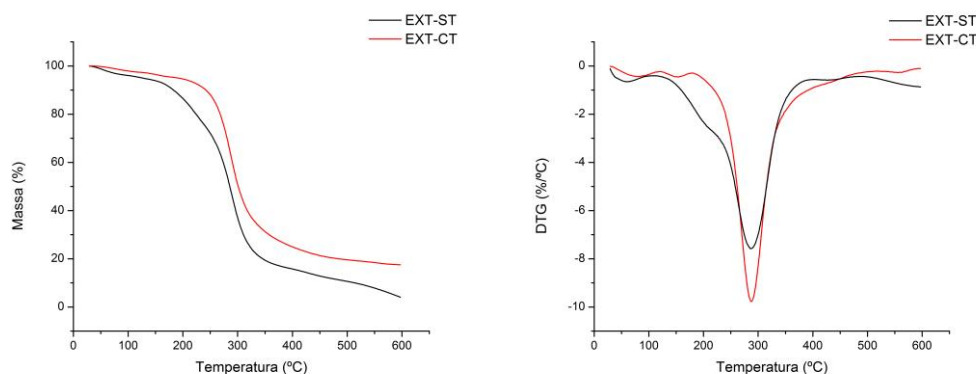
A maltodextrina apresenta uma degradação térmica que se inicia a 200°C e uma temperatura máxima de degradação de 311°C (temperatura correspondente ao máximo do pico no registo DTG). Para o ácido cítrico a temperatura inicial de degradação é de 152°C e a temperatura máxima de 201°C. O extrato de *Agaricus bisporus*, por sua vez, apresenta perda de massa numa ampla faixa de temperaturas; tal como esperado dado a heterogeneidade associada a este tipo de amostras (são uma mistura de vários componentes). Assim, é possível verificar que o extrato apresenta uma fração termicamente menos estável com uma degradação a iniciar-se a 111°C e uma temperatura máxima de degradação a 205°C. Seguidamente é possível identificar uma segunda zona de degradação caracterizada por uma temperatura máxima de degradação a 286°C. No que respeita o Tween 20 este apresenta uma degradação que se inicia a 280°C e uma temperatura máxima de degradação de 399°C.

Os resultados sugerem que os materiais de base são resistentes à temperatura de atomização (170°C), com exceção de uma fração do extrato que apresenta sobreposição com esta gama. Contudo, e uma vez que o processo de atomização no *spray drying* é praticamente instantâneo, é de esperar que a degradação (mesmo desta fração) não seja significativa.



**Figura 16.** Espectros de degradação da maltodextrina (A), ácido cítrico (B), Extrato (C) e Tween 20 (D).

De acordo com a literatura, a reticulação entre a maltodextrina e o ácido cítrico é favorecida numa gama de temperaturas na faixa de 140-170°C (CASTRO-CABADO, 2016a). Com base em estudos preliminares realizados (dados não apresentados) selecionou-se como tratamento térmico a aplicar após a atomização: 140°C durante 4 horas. De forma a obter mais informação sobre a estabilidade do extrato a estas condições, procedeu-se à comparação do extrato sem tratamento com o extrato após tratamento térmico. Conforme apresentado na **Figura 17**, verificou-se, tal como esperado, que a fração com resistência térmica inferior foi degradada. Não obstante, e como o foco da utilização destes extratos reside na sua composição em ergosterol, esta não é afetada (o ergosterol apresenta uma degradação que se inicia a 206°C e apresenta uma temperatura máxima de degradação de 345°C). É de esperar também que este efeito, uma vez tendo o extrato protegido nas microesferas, não seja tão marcante. Adicionalmente, optou-se com o sistema real de produção das microesferas utilizar um tratamento térmico de 4 horas a 140°C.



**Figura 17.** Espectro de degradação do extrato de *Agaricus bisporus* sem (EXT-ST) e com tratamento térmico (EXT-CT).

#### 4.2.3.2. Análise dos microencapsulados obtidos

As microesferas obtidas pelo processo de *spray drying*, sem tratamento térmico posterior e as microesferas sujeitas a tratamento térmico (acondicionamento em estufa a 140°C durante 4 horas após atomização), foram analisadas por TG/DTG. O objetivo deste ponto consistiu em avaliar se as condições utilizadas na atomização são, *per se*, suficientes para garantir a reticulação entre a maltodextrina e o ácido cítrico e quais as vantagens de se realizar a etapa adicional de tratamento térmico após a atomização. Assim, foram analisadas as esferas contendo extrato com e sem tratamento (ESF-CT e ESF-ST, respetivamente) assim como as respetivas esferas vazias com e sem tratamento (ESFV-CT e ESFV-ST, respetivamente).

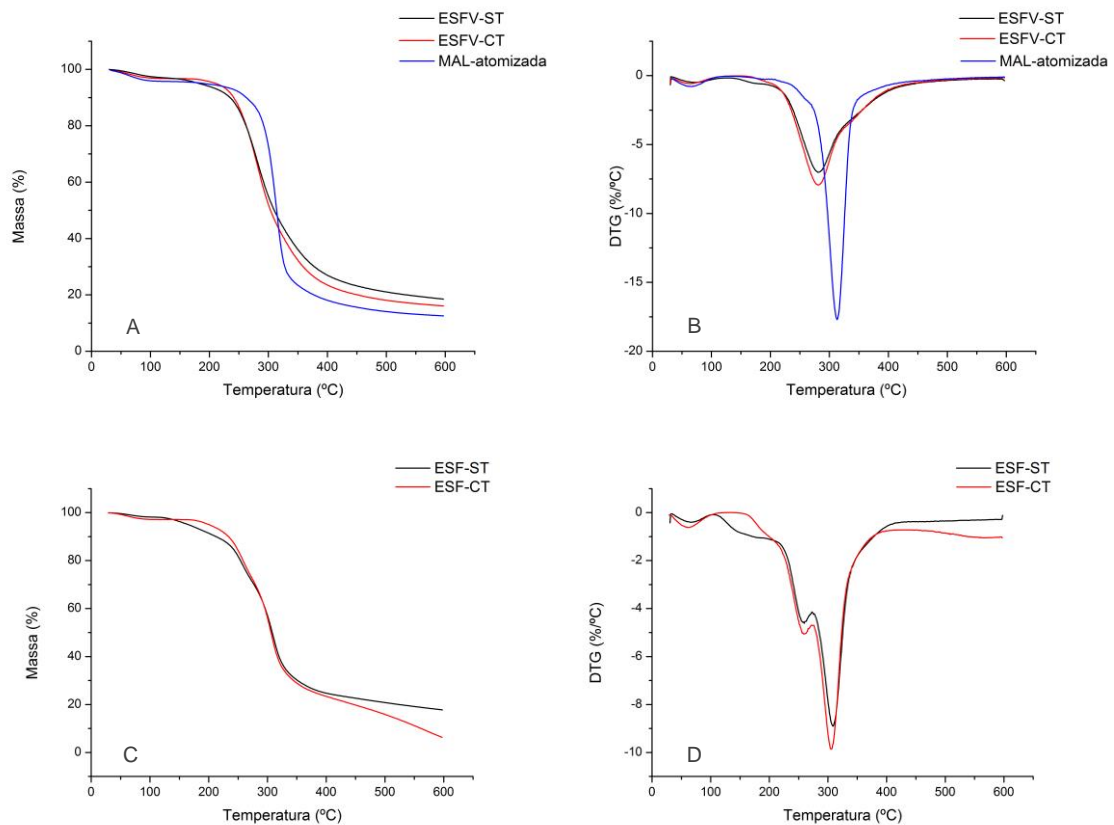
Na **Figura 18** estão representados os perfis de degradação das esferas contendo extrato (com e sem tratamento) e respetivas esferas vazias (sem extrato). Através da análise destes registos pode verificar-se que o perfil de degradação das esferas vazias (sistema contendo maltodextrina, ácido cítrico e Tween 20) difere do da maltodextrina pura atomizada, confirmando a ocorrência de modificação química. Para as esferas vazias, a degradação do material inicia-se a uma temperatura inferior e a temperatura máxima de degradação ocorre também para um valor inferior ao da maltodextrina pura. Adicionalmente, verifica-se a ocorrência de uma degradação mais lenta do material (prolonga-se para temperaturas superiores), confirmando que ambas as amostras (com e sem tratamento) possuem na sua composição uma fração de material mais resistente termicamente que a maltodextrina pura. O mesmo foi observado por Stone *et al.* (2013), onde a reação com o ácido cítrico foi capaz de retardar significativamente a degradação de nanofibras, o que indica uma estabilidade térmica superior quando comparada com

as nanofibras não reticuladas. Awadhiyna *et al.* (2016) verificou, em estudos feitos com filmes de agarose reticulados com ácido cítrico, que estes apresentaram uma taxa de degradação inferior à da amostra de controlo, fato evidenciado por um declive superior observado para a curva de perda de massa da amostra controlo. Tal como no presente estudo, foi também observado que a maltodextrina reticulada com o ácido cítrico originou uma fração de resíduo por degradar superior, comparativamente à maltodextrina pura, o que pode ser atribuído à produção de compostos mais resistentes através da reticulação do material.

Desta forma foi possível verificar que para as esferas vazias, com e sem tratamento, existe evidência de que a reticulação com o ácido cítrico foi efetiva. Aparentemente as ESFV-ST após atomização apresentam maior resistência térmica já que a temperatura máxima de degradação ocorre para um valor ligeiramente superior, comparativamente com as ESFV-CT. Adicionalmente, apresenta um perfil de degradação mais lento e resulta também numa fração de resíduo superior. Pode ainda verificar-se a existência de ácido cítrico residual nas ESFV-ST, aparentemente consumido após tratamento em estufa, uma vez que não é observado nas ESFV-CT. Face a estes resultados, o tratamento térmico parece não introduzir vantagens do ponto de vista da reação de reticulação da maltodextrina com o ácido cítrico.

As microesferas contendo o extrato apresentaram também evidências de ocorrência de reticulação entre a maltodextrina e o ácido cítrico; a temperatura máxima de degradação observada para uma das frações identificadas ocorre para um valor próximo da temperatura máxima de degradação das esferas vazias (280°C), valor que caracteriza o material de encapsulação. Adicionalmente, é possível distinguir uma fração de material caracterizado por uma maior resistência térmica (temperatura máxima de degradação de 306°C) que pode ser atribuído a uma degradação conjunta da maltodextrina reticulada (fração termicamente mais resistente, de acordo com os registos observados com as esferas vazias), maltodextrina por reagir e extrato. Pode ainda verificar-se, tal como foi observado com as esferas vazias, a existência de ácido cítrico residual nas ESF-ST, sendo este consumido após tratamento em estufa, uma vez que não se observa esta fração nas ESF-CT. Assim, tal como observado para as esferas vazias, aparentemente as ESF-ST apresentam maior resistência térmica já que a temperatura máxima de degradação é registrada para um valor ligeiramente superior, comparativamente com as ESF-CT. Igualmente, o perfil de degradação das ESF-ST é mais lento do que o

observado com as ESF-CT, resultando também numa fração de resíduo superior. Assim, e em concordância com o que foi observado para as esferas vazias, o tratamento térmico não apresenta, aparentemente, grande vantagem do ponto de vista da reação de reticulação da maltodextrina com o ácido cítrico. Foi ainda observado, no caso das esferas contendo extrato que a aplicação do tratamento conduziu à obtenção de um resíduo inferior às correspondentes esferas vazias sem tratamento, o que poderá estar associado com a ocorrência de alguma reação entre o ácido cítrico e o extrato.



**Figura 18.** Espectro de degradação das esferas vazias (A e B) e das esferas contendo extrato (C e D).

#### 4.2.4. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

##### 4.2.4.1. Caracterização dos materiais de base e das microesferas produzidas

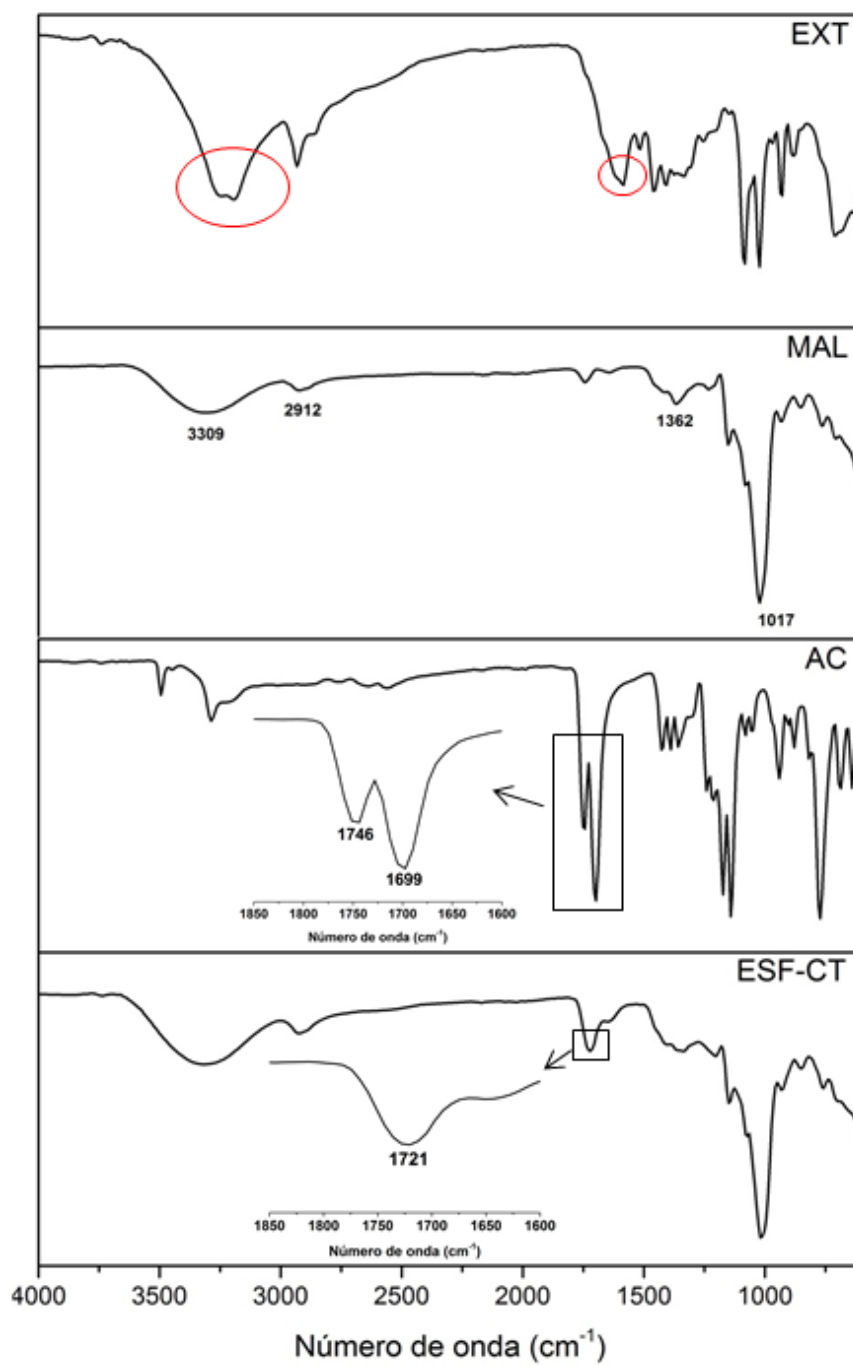
A **Figura 19** apresenta os espectros de FTIR obtidos para os materiais de base e para as microesferas contendo extrato com tratamento (ESF-CT). Adicionalmente, a análise feita tem por objetivo registrar a ocorrência dos principais grupos químicos que podem participar em reações de esterificação, assim como verificar a ocorrência desta reação.

Entre as características observadas no espectro de FTIR do extrato de *Agaricus bisporus*, um espectro complexo dado que corresponde a uma mistura de componentes, de destacar a presença de bandas características de grupos amina, nomeadamente na gama 3400-3100  $\text{cm}^{-1}$  (estiramento) e 1590-1550  $\text{cm}^{-1}$  (deformação angular simétrica no plano). Também é observada a contribuição dos grupos hidroxilo, cuja vibração se centra em 3220  $\text{cm}^{-1}$ ; esta pode estar relacionada com a presença de frações de açúcares, compostos fenólicos e esteróis no extrato (BARREIRA, *et al.*, 2014; BARROS *et al.*, 2008; BARROS *et al.*, 2009; REIS *et al.*, 2012).

No caso da maltodextrina, as principais características a assinalar correspondem às bandas registadas a 1000  $\text{cm}^{-1}$ , características dos anéis de anidroglicose (estiramento); na gama 800-1500  $\text{cm}^{-1}$  relacionadas com a ligação C-O (estiramento); entre 2800-3000  $\text{cm}^{-1}$  referente à deformação das ligações C-H e por fim entre 3000-3600  $\text{cm}^{-1}$  relacionada com a vibração por estiramento dos grupos hidroxilo.

Para o ácido cítrico de destacar as bandas de absorção a 1699 e 1748  $\text{cm}^{-1}$  referentes às vibrações por estiramento do grupo C=O; estas são as bandas a serem tomadas em consideração na avaliação da reação de esterificação.

Na análise do espectro obtido para a amostra ESF-CT observa-se o aparecimento da vibração do grupo C=O associado ao éster (1721  $\text{cm}^{-1}$ ), simultaneamente com o desaparecimento das bandas características do ácido cítrico (1699 e 1748  $\text{cm}^{-1}$ ), de acordo com o observado por Castro-Cabado *et al.* (2016) e que apontam para a ocorrência, com sucesso, da reação de esterificação. O mesmo comportamento foi observado para as microesferas sem tratamento (ESF-ST) (dados não apresentados). Esta observação está de acordo com o verificado nas análises de TG, em que se concluiu que o tratamento térmico em estufa, aparentemente, não oferece vantagem do ponto de vista da reação de reticulação entre a maltodextrina e o ácido cítrico.



**Figura 19.** Espetros de infravermelho obtidos para os materiais de base (EXT, MAL, AC) e microesferas (ESF-CT).

#### 4.2.4.2. Ensaios de reticulação dos componentes individuais (maltodextrina e extrato) com o ácido cítrico

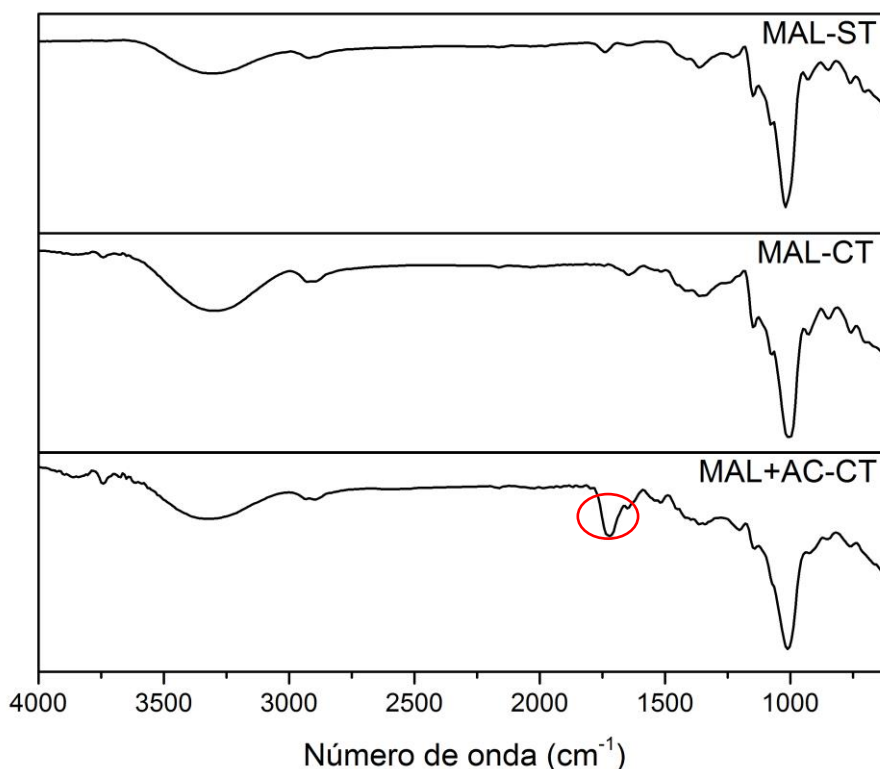
De forma a avaliar a possibilidade da maltodextrina e do extrato poderem reagir com o ácido cítrico, através dos seus grupos hidroxilo e amina (estes últimos no caso do extrato) procedeu-se à realização de ensaios simulando as condições de concentração de cada um dos componentes na formulação utilizada para preparar as microesferas. Estas reações foram, contudo, realizadas em meio homogéneo, tendo-se preparado para o efeito uma solução aquosa contendo os componentes de interesse que foi colocada numa estufa a 140°C durante 4 horas.

A **Figura 20** apresenta os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de maltodextrina sem tratamento (MAL-ST), maltodextrina com tratamento (MAL-CT), e maltodextrina com tratamento na presença de ácido cítrico (MAL+AC-CT). Comparando as duas amostras de maltodextrina (MAL-ST e MAL-CT) não se observaram diferenças significativas entre os dois espectros. Assim, comprova-se que a maltodextrina é estável à temperatura seleccionada para o tratamento (140°C), tal como anteriormente concluído com base nos ensaios de TG. Quando na presença de ácido cítrico, verifica-se o aparecimento da banda centrada a 1721  $\text{cm}^{-1}$ , característica da ligação éster, e diminuição da intensidade da banda associada aos grupos hidroxilo (3000-3600  $\text{cm}^{-1}$ ). De notar que o desaparecimento total desta última banda não se observou podendo tal estar relacionado com a elevada concentração de grupos hidroxilo da maltodextrina. De facto, a maltodextrina, um polissacarídeo, é o componente maioritário no sistema químico utilizado para a microencapsulação.

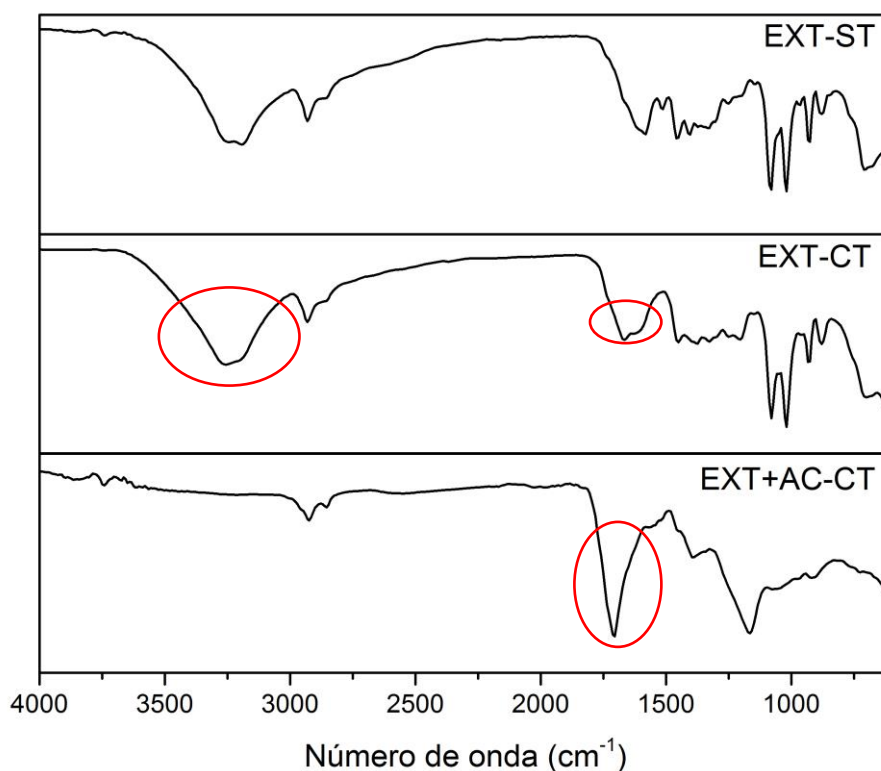
A **Figura 21** apresenta os espectros de infravermelho obtidos para as amostras de extrato sem tratamento (EXT-ST), extrato com tratamento (EXT-CT) e extrato com tratamento na presença de ácido cítrico (EXT+AC-CT). Assim, pode concluir-se que quando o extrato é submetido a tratamento térmico em estufa se verificam alterações ao nível das vibrações registadas na gama 1190-1450  $\text{cm}^{-1}$  e 1520-1780  $\text{cm}^{-1}$ , esta última associada com a presença de grupos amina, que será uma característica das frações do extrato menos resistentes à temperatura que se degradam neste processo, tal como também observado nos ensaios de TG. Quando o extrato é submetido a tratamento térmico na presença de ácido cítrico, observa-se o desaparecimento da banda na gama 2990-3630  $\text{cm}^{-1}$  (banda associada à presença de grupos amina e grupo hidroxilo) e surgimento da

banda a  $1707\text{ cm}^{-1}$ , associada à formação de ligações éster. Estes resultados estão também de acordo com a análise de TG (dados não apresentados) onde se verificou que a amostra EXT+AC-CT apresentou um perfil de degradação diferente do perfil de degradação do extrato (EXT-ST e EXT-CT). Dessa forma, pode-se verificar que o ácido cítrico reage também com o extrato.

Em síntese, pode-se concluir que a maltodextrina e o extrato podem reagir com o ácido cítrico. No entanto, as condições utilizadas neste estudo diferem das condições reais em que é feito o tratamento térmico. Na prática, em condições reais, o tratamento térmico é feito após produção das microesferas (meio heterogéneo) e também em condições em que a reação do ácido cítrico com os grupos hidroxilo da maltodextrina é favorecido dado estarem em concentração superior relativamente aos grupos reativos do extrato.



**Figura 20.** Espetros de infravermelho da maltodextrina sem tratamento (MAL-ST), maltodextrina com tratamento (MAL-CT) e maltodextrina com ácido cítrico com tratamento (MAL+AC-CT).



**Figura 21.** Espectros de infravermelho do extrato sem tratamento (EXT-ST), extrato com tratamento (EXT-CT) e extrato com ácido cítrico com tratamento (EXT+AC-CT).

#### 4.2.5. *Propriedades bioativas do extrato de Agaricus bisporus livre e microencapsulado*

O extrato de *Agaricus bisporus* obtido pela técnica de ultrassons foi caracterizado cromatograficamente quanto ao teor de ergosterol. A quantidade identificada no extrato foi de 19,4 mg ERG/g EXT. Este valor é inferior ao descrito por RUDKE et al (2016), sendo que esta diferença pode ser atribuída às diferenças de cultivo dos cogumelos, uma vez que, as amostras do presente trabalho correspondem a um lote diferente.

A **Tabela 7** apresenta os resultados obtidos referentes às propriedades bioativas avaliadas para o extrato e para as microesferas obtidas pela técnica de *spray drying*.

O resultado obtido para a atividade captadora de radicais DPPH do extrato foi de 4,29 mg/mL, valor condizente com descrito anteriormente pelo grupo (RUDKE et al., 2016). Das amostras analisadas, as microesferas contendo extrato e submetidas a tratamento térmico em estufa após atomização (ESF-CT) apresentaram um EC<sub>50</sub> de 13,03 mg/mL,

valor inferior ao obtido para as microesferas sem tratamento térmico (ESF-ST), portanto com atividade antioxidante superior. Estes resultados podem ser justificados pela reação do ácido cítrico com o extrato, tal como indicada pelos ensaios de TG e FTIR. De facto está relatado na literatura que as reações de esterificação, por exemplo com o ergosterol, podem incrementar a sua bioatividade, nomeadamente a atividade antioxidante.

Através da análise das esferas vazias foi possível verificar que o material encapsulante revelou atividade antioxidante quando foi efetuado tratamento térmico (ESFV-CT) ( $EC_{50}$  de 234,39 mg/mL); o mesmo não se verificou quando não se efetuou tratamento térmico (ESFV-ST). Desta forma, embora o efeito não seja muito marcante, o tratamento térmico do material da cápsula pode também ter contribuído para o aumento de atividade antioxidante observada para as esferas contendo extrato e sujeitas a tratamento térmico.

Adicionalmente, o extrato não apresentou atividade em células não tumorais, o que representa um aspeto muito positivo apontando a ausência de toxicidade do material. De realçar ainda o facto das esferas também não terem apresentado toxicidade em células não tumorais para a máxima concentração testada. Esta observação comprova também a ausência de toxicidade dos produtos decorrentes da reação com o ácido cítrico. Tendo em consideração o aumento da atividade antioxidante da amostra ESFV-CT, a estratégia utilizada para a encapsulação dos extratos de *Agaricus bisporus* pode aportar vantagens adicionais que merecem ser exploradas no âmbito de trabalhos futuros.

**Tabela 7. Propriedades bioativas do extrato de *Agaricus bisporus*, do extrato microencapsulado e das microesferas vazias.**

<b>Atividade Antioxidante (EC<sub>50</sub>, mg/mL)</b>	<b>EXT</b>	<b>ESF-ST</b>	<b>ESF-CT</b>	<b>ESFV-ST</b>	<b>ESFV-CT</b>
Atividade captadora de radicais DPPH	4,3 ± 0,1 <sup>d</sup>	64,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	13,0 ± 0,2 <sup>c</sup>	>400	234 ± 3 <sup>a</sup>
<b>Atividade citotóxica (GI<sub>50</sub>, µg/mL)</b>					
PLP2 (células não tumorais de fígado de porco)	>400	>400	>400	>400	>400

Valores de EC<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante. Valor de EC<sub>50</sub> para o Trolox (controlo positivo): 42 µg/mL (atividade captadora DPPH). Valores de GI<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% de inibição do crescimento na cultura primária de células de fígado - PLP2. Valor de GI<sub>50</sub> para a Elipticina (controlo positivo): 3 µg/mL (PLP2). EXT: extrato de *Agaricus bisporus*; ESF-ST: microesferas contendo extrato sem tratamento térmico; ESF-CT: microesferas contendo extrato com tratamento térmico; E-ESFV-ST: microesferas vazias sem tratamento térmico; ESFV-CT: microesferas vazias com tratamento térmico. Em cada linha, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 4.3. Funcionalização de matrizes alimentares lipofílicas e hidrofílicas com micoesteróis

#### 4.3.1. Incorporação do ergosterol e seu derivado acetilado em maionese

O ergosterol e o seu derivado acetilado foram incorporados em maionese com o objetivo de verificar se esses seriam uma boa fonte de micoesteróis para produtos alimentares. Para isso, foi realizada uma análise detalhada dos ensaios descritos na **Tabela 3** tendo-se avaliado se as suas propriedades bioativas se mantinham quando incorporados na maionese e se havia, ou não, alteração no perfil nutricional dos produtos finais.

##### 4.3.1.1. Avaliação nutricional de maionese incorporada de ergosterol e seu derivado acetilado

A **Tabela 8** apresenta os perfis nutricionais e energéticos das amostras de maionese estudadas. Como esperado para a maionese, as gorduras correspondem à fração maioritária, variando de 60 a 62 g/100 g. A humidade corresponde à segunda fração maioritária variando de 27,2 a 29 g/100 g, seguida dos hidratos de carbono (8,4 a 9,81 g/100 g) e das proteínas (1,10 a 1,43 g/100 g). A sacarose foi determinada como o açúcar maioritário (3,59 a 3,80 g/100 g), seguida pela glucose (0,27 a 0,32 g/100 g) e frutose (0,170 a 0,190 g/100 g).

A maionese controlo negativo apresentou uma fração de gordura inferior ao alegado no rótulo (65,7%) e uma fração de proteínas superior (0,8 g) o que resultou, para todas as amostras estudadas, num valor de energia ligeiramente inferior ao descrito pelo fabricante (609 kcal). De uma forma geral, as amostras apresentaram perfis nutricionais semelhantes embora em alguns casos tenha sido constatada diferença significativa em certos macronutrientes. No valor de energia obtido para as amostras logo após incorporação dos compostos, por exemplo, foi verificada diferença significativa entre a maionese incorporada com ergosterol acetilado e as demais amostras, porém, no 7º dia de armazenamento não foi verificada diferença significativa entre as amostras. Dessa forma, pode-se concluir que embora tenham sido observadas algumas diferenças nutricionais para as amostras em estudo, isso não acarretará impactos significativos na qualidade padrão da maionese.

A **Tabela 9** apresenta o perfil de ácidos gordos das amostras de maionese estudadas. São apresentados os ácidos gordos mais abundantes identificados nas amostras, assim como as percentagens de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA). O ácido gordo maioritário identificado corresponde ao C18:1 (ácido oleico) que varia de 51,6 a 52,89%, seguido pelo C18:2 (ácido linoleico) que varia de 23,55 a 24,35% e C18:3 (ácido linolénico) que varia de 14-15,11%. De realçar que os ácidos gordos (PUFA) identificados são destacados como benéficos para saúde por apresentarem efeitos de prevenção e combate a diversas doenças (COLUSSI *et al.*, 2017; LOPEZ-HUERTAS, 2010; YANG *et al.*, 2015). O ácido gordo saturado maioritário corresponde ao C16:0 (ácido palmítico) que varia de 4,53 a 4,73%. Destaca-se ainda a maior percentagem de MUFA e PUFA em relação aos MUFA sendo que os primeiros desempenham maiores efeitos benéficos na saúde. De forma geral, o perfil dos ácidos gordos das amostras permanece inalterado devido à adição quer do ergosterol quer do seu derivado acetilado. Em alguns ácidos gordos foi detetada uma diferença estatisticamente significativa entre as amostras, porém tais valores não promoverão alterações da qualidade nutricional ou funcional do produto final. Ainda pôde verificar-se que, com o decorrer do tempo de armazenamento, a fração de SFA decresceu ligeiramente para todas as amostras enquanto as frações MUFA e PUFA mantiveram-se.

#### 4.3.1.2. Avaliação das propriedades bioativas de maionese incorporada com ergosterol e seu derivado acetilado

A **Tabela 10** apresenta os resultados obtidos para atividade citotóxica em células tumorais e não tumorais das maioneses estudadas; os valores são expressos em GI<sub>50</sub> (concentração responsável por 50% da inibição do crescimento celular). Como seria de esperar, a maionese controlo (MCN) não apresentou citotoxicidade nem em células tumorais nem em não tumorais. A atividade observada para as maioneses contendo ergosterol (MCP) e o seu derivado acetilado (ME-ACT) segue o mesmo comportamento das substâncias isoladas. A MCP apresentou maior citotoxicidade (menor GI<sub>50</sub>) em todas as linhas celulares tumorais analisadas quando comparado com ME-ACT. Embora observada uma diferença significativa para o efeito citotóxico de ambos na linha celular NCI-H460 (carcinoma de pulmão), os GI<sub>50</sub> obtidos para ambas as amostras são muito próximos, revelando uma atividade muito semelhante.

Assim como observado para as moléculas isoladas, a MCP apresentou toxicidade para células normais de fígado de porco, enquanto a ME-ACT não provocou inibição do crescimento celular. De salientar a importância destes resultados, uma vez que ao não apresentar toxicidade, uma concentração maior do ergosterol acetilado pode ser utilizada e, desta forma, exercer a atividade pretendida quando incorporada em maionese.

Adicionalmente e de uma forma geral, podem observar-se ligeiras variações da atividade citotóxica no decorrer do tempo de prateleira, quer para a maionese incorporada com o ergosterol quer para a maionese incorporada com o ergosterol acetilado, porém os valores de  $GI_{50}$  são muito semelhantes, representando a não alteração da composição das maioneses em estudo.

A **Tabela 10** também apresenta os resultados obtidos para a atividade anti-inflamatória das maioneses em estudo; os valores são expressos em  $IC_{50}$  (Concentração responsável por 50% da inibição da produção de NO). Assim como para as moléculas isoladas, a MCP apresentou uma atividade anti-inflamatória superior à ME-ACT, sendo o  $IC_{50}$  obtido para a primeira de 29  $\mu\text{g/mL}$  e para a segunda de 116  $\mu\text{g/mL}$ . Também foi verificada uma manutenção da atividade anti-inflamatória durante o período de armazenamento quer para a maionese incorporada com o ergosterol quer para a maionese incorporada com o ergosterol acetilado.

**Tabela 8. Perfil nutricional e energético das amostras de maionese analisadas ao longo do período de armazenamento.**

Valor nutricional		Humidade (g/100g mf)	Cinzas (g/100g mf)	Gorduras (g/100g mf)	Proteínas (g/100g mf)	Hid. de carbono (g/100g mf)	Frutose (g/100g mf)	Glucose (g/100g mf)	Sacarose (g/100g mf)	Energia (kcal/100g mf)
0 Dias	MCN	28,1 ± 0,9 <sup>b</sup>	0,88 ± 0,04 <sup>b</sup>	60,0 ± 0,3 <sup>a</sup>	1,25 ± 0,02 <sup>b</sup>	9,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,190 ± 0,001 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,76 ± 0,01 <sup>a</sup>	584 ± 1 <sup>b</sup>
	MCP	29,0 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,04 <sup>b</sup>	60,6 ± 0,6 <sup>a</sup>	1,10 ± 0,01 <sup>c</sup>	8,6 ± 0,5 <sup>b</sup>	0,170 ± 0,001 <sup>c</sup>	0,28 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,80 ± 0,03 <sup>a</sup>	583 ± 2 <sup>b</sup>
	ME-ACT	27,2 ± 0,3 <sup>c</sup>	0,96 ± 0,02 <sup>a</sup>	60,62 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,43 ± 0,02 <sup>a</sup>	9,81 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,180 ± 0,001 <sup>b</sup>	0,270 ± 0,003 <sup>a</sup>	3,70 ± 0,01 <sup>a</sup>	591 ± 1 <sup>a</sup>
7 Dias	MCN	27,8 ± 0,2 <sup>a</sup>	0,90 ± 0,03 <sup>a</sup>	60,7 ± 0,5 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,1 <sup>a</sup> <sup>b</sup>	9,4 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,170 ± 0,004 <sup>b</sup>	0,27 ± 0,03 <sup>b</sup>	3,59 ± 0,01 <sup>b</sup>	589 ± 4 <sup>a</sup>
	MCP	27,8 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>b</sup>	61 ± 1 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,01 <sup>b</sup>	9,0 ± 0,7 <sup>a</sup>	0,17 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,32 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,65 ± 0,03 <sup>a</sup>	591 ± 6 <sup>a</sup>
	ME-ACT	27,6 ± 0,4 <sup>a</sup>	0,88 ± 0,02 <sup>a</sup>	62 ± 1 <sup>a</sup>	1,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,4 ± 0,5 <sup>a</sup>	0,18 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,27 ± 0,02 <sup>b</sup>	3,500 ± 0,003 <sup>b</sup>	596 ± 6 <sup>a</sup>

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. MCN: maionese controlo sem adição de compostos; MCP: maionese incorporada com ergosterol; ME-ACT: maionese incorporada com ergosterol acetilado. Em cada coluna e para cada tempo de prateleira, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9. Perfil de ácidos gordos das amostras de maionese analisadas ao longo do período de armazenamento.**

		C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	C18:3 (%)	C20:1 (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
0 Dias	MCN	4,72 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,80 ± 0,01 <sup>a</sup>	52,89 ± 0,02 <sup>a</sup>	23,73 ± 0,05 <sup>a</sup>	14,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	1,04 ± 0,01 <sup>c</sup>	7,70 ± 0,02 <sup>b</sup>	54,16 ± 0,04 <sup>a</sup>	38,1 ± 0,1 <sup>a</sup>
	MCP	4,726 ± 0,007 <sup>a</sup>	1,716 ± 0,001 <sup>b</sup>	52,04 ± 0,01 <sup>ab</sup>	23,616 ± 0,001 <sup>a</sup>	14,112 ± 0,001 <sup>ab</sup>	1,16 ± 0,01 <sup>b</sup>	7,96 ± 0,03 <sup>a</sup>	53,80 ± 0,03 <sup>b</sup>	38,242 ± 0,004 <sup>a</sup>
	ME-ACT	4,642 ± 0,004 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,01 <sup>ab</sup>	51,85 ± 0,02 <sup>b</sup>	23,55 ± 0,01 <sup>a</sup>	14,33 ± 0,01 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,01 <sup>a</sup>	7,931 ± 0,001 <sup>a</sup>	53,64 ± 0,01 <sup>b</sup>	38,43 ± 0,01 <sup>a</sup>
7 Dias	MCN	4,650 ± 0,001 <sup>a</sup>	1,850 ± 0,004 <sup>ab</sup>	51,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	24,2 ± 0,1 <sup>b</sup>	15,1 ± 0,1 <sup>b</sup>	0,988 ± 0,001 <sup>a</sup>	7,18 ± 0,02 <sup>a</sup>	53,4 ± 0,2 <sup>ab</sup>	38,4 ± 0,1 <sup>b</sup>
	MCP	4,53 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,84 ± 0,01 <sup>a</sup>	51,65 ± 0,03 <sup>a</sup>	24,27 ± 0,03 <sup>b</sup>	15,11 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,86 ± 0,02 <sup>a</sup>	7,11 ± 0,03 <sup>b</sup>	53,36 ± 0,01 <sup>b</sup>	39,53 ± 0,03 <sup>a</sup>
	ME-ACT	4,59 ± 0,02 <sup>ab</sup>	1,855 ± 0,001 <sup>a</sup>	51,78 ± 0,01 <sup>a</sup>	24,35 ± 0,03 <sup>a</sup>	14,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,1 <sup>ab</sup>	7,18 ± 0,04 <sup>a</sup>	53,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	39,3 ± 0,1 <sup>ab</sup>

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1); Ácido linoleico (C18:2); Ácido linolénico (C18:3); Ácido gondoico (C20:1) SFA *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). A diferença para os 100% corresponde a outros 11 ácidos gordos menos abundantes (dados não apresentados). MCN: maionese controlo sem adição de compostos; MCP: maionese incorporada com ergosterol; ME-ACT: maionese incorporada com ergosterol acetilado. Em cada coluna e para cada tempo de prateleira, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 10. Propriedades bioativas das amostras de maionese analisadas ao longo do período de armazenamento.**

Atividade citotóxica (GI <sub>50</sub> , µg/mL)	0 Dias				7 Dias			
	MCN	MCP	ME-ACT	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> - Student	MCN	MCP	ME-ACT	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> - Student
MCF-7	>400	81 ± 8	321 ± 12	<0.001	>400	83 ± 3	305 ± 12	<0.001
NCI-H460	>400	143 ± 10	178 ± 9	<0.001	>400	147 ± 8	181 ± 6	<0.001
HeLa	>400	78 ± 3	217 ± 6	<0.001	>400	84 ± 6	213 ± 7	<0.001
HepG2	>400	111 ± 6	249 ± 9	<0.001	400	106 ± 2	256 ± 9	<0.001
PLP2	>400	200 ± 7	>400	-	>400	205 ± 13	>400	-
<b>Atividade anti- inflamatória (IC<sub>50</sub>, µg/mL)</b>								
Inibição de NO	>400	29 ± 2	116 ± 3	<0.001	>400	31 ± 3	116 ± 8	<0.001

Os resultados são expressos em µg de extrato de maionese/mL. Valores de GI<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% de inibição do crescimento nas linhas celulares tumorais humanas ou na cultura primária de células de fígado - PLP2. Valores de GI<sub>50</sub> para a Elipticina (controlo positivo): 1,0 µg/mL (MCF-7), 1,0 µg/mL (NCI-H460), 2,0 µg/mL (HeLa), 1,0 µg/mL (HepG2) e 3 µg/mL (PLP2). Valores de IC<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% da inibição da produção de NO em comparação com o controlo negativo (100% da produção de NO). Valor de IC<sub>50</sub> para a Dexametasona (controlo positivo): 16 µg/mL. MCN: maionese controlo sem adição de compostos; MCP- maionese incorporada com ergosterol; ME-ACT: maionese incorporada com ergosterol acetilado

#### **4.3.2. Incorporação de extrato de *A. bisporus* com micoesteróis, na forma livre e microencapsulada em iogurte**

O extrato, na sua forma livre e microencapsulada, foi incorporado em iogurte com o objetivo de verificar se estes seriam uma boa fonte de micoesteróis para produtos alimentares. Para isso, foi realizada uma análise detalhada dos ensaios descritos na **Tabela 4** (avaliação da manutenção das propriedades bioativas e perfil nutricional nos produtos finais).

##### **4.3.2.1. Avaliação nutricional do iogurte incorporado com extrato de *A. bisporus* na forma livre e microencapsulada.**

A **Tabela 11** apresenta os perfis nutricionais e energéticos das amostras de iogurte estudadas. Como esperado para o iogurte, a humidade corresponde à fração maioritária variando de 80 a 86 g/100 g. Os hidratos de carbono correspondem aos macronutrientes maioritários variando de 5,24 a 6,80 g/100 g, seguido das proteínas (4,45 a 4,69 g/100 g) e das gorduras (2,15 a 3,58 g/100 g). A lactose foi determinada como o açúcar maioritário (3,96 a 4,6 g/100 g), seguida pela galactose (0,76 a 0,94 g/100 g).

De uma forma geral, foram observadas diferenças significativas entre os iogurtes incorporados com micoesteróis e o iogurte controlo sem adição de micoesteróis. Um aspeto que pode ser destacado é o facto de que, para algumas frações, tais como a humidade e o teor de lactose, terem sido verificadas diferenças significativas que distinguem os iogurtes contendo extrato microencapsulado (IESF-ST e IESF-CT) dos iogurtes controlo sem adição de micoesteróis (ICN) e iogurte contendo extrato livre (ICP). Tal pode dever-se à quantidade de microesferas incorporada nos iogurtes (2,5 g) que pode interferir nas análises de determinação dessas frações, o que já era espetável. No caso da humidade, a massa de água perdida pelo processo de liofilização foi semelhante para todas as amostras, porém por possuir na sua composição 2,5 g de microesferas, as amostras IESF-ST e IESF-CT apresentaram uma percentagem de humidade (g/100 g) inferior. Tal resultou na determinação de um valor energético inferior para os iogurtes incorporados com microesferas, o que pode ser um aspeto que agrega maior valor aos produtos desenvolvidos.

A **Tabela 12** apresenta o perfil de ácidos gordos das amostras de iogurte estudadas. São apresentados os ácidos gordos mais abundantes identificados nas amostras, assim como as percentagens de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e poliinsaturados (PUFA). O ácido gordo maioritário identificado corresponde ao C16:0 (ácido palmítico) que varia de 28,30 a 31,418%, seguido pelo C18:1 (ácido oleico) que varia de 22,7 a 25,3% e C14:0 (ácido mirístico) que varia de 10,6-11,41%. Apesar de não ser o ácido gordo maioritário, o ácido linoleico é um dos mais abundantes nas amostras, proporcionando assim qualidade em termos nutricionais e biológicos. Destaca-se ainda que as amostras de iogurte apresentam maior percentagem de SFA que varia de 67,48 a 71%. Pequenas variações da percentagem de alguns ácidos gordos fez com que fossem detetadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras, porém na prática tais valores não promoverão alterações da qualidade nutricional ou funcional do produto final. Ainda pôde verificar-se que, com o decorrer do tempo de armazenamento, houveram alterações nas percentagens de SFA, MUFA e PUFA para o iogurte controlo (ICN) o que foi menos perceptível para as demais amostras.

#### **4.3.3. Avaliação das propriedades bioativas do iogurte incorporado com extrato de *Agaricus bisporus* na forma livre e microencapsulada**

A **Tabela 13** apresenta os resultados obtidos para a atividade captadora de radicais DPPH dos iogurtes estudados (valores expressos em EC<sub>50</sub>; concentração responsável por 50% da atividade captadora de radicais DPPH). Como esperado, o iogurte controlo sem adição de qualquer micosterol (ICN) não apresentou atividade antioxidante para ambos os tempos de prateleira considerados no estudo. O iogurte incorporado com microesferas contendo extrato, e que foram submetidas a tratamento térmico (IESF-CT), foi o que apresentou atividade antioxidante superior (EC<sub>50</sub> inferior) seguido do iogurte contendo extrato na forma livre (ICP) e do iogurte incorporado com microesferas contendo extrato não submetidas a tratamento térmico (IESF-ST). Foi observado que as amostras ICP e IESF-ST resultaram em iogurtes com atividade antioxidante elevada inicial (t0). Contudo, verificou-se uma diminuição desta após 7 dias de armazenamento (t7), o que pode estar associado à degradação do extrato. No caso da amostra IESF-ST, é possível que logo após a incorporação das microesferas na matriz do iogurte, o conteúdo das mesmas tenha sido libertado e que, no decorrer do armazenamento, este tenha sofrido degradação. No entanto, a amostra IESF-CT apresentou uma atividade

antioxidante superior à da amostra IESF-ST, tal como observado para as microesferas isoladas. Porém após 7 dias de armazenamento (t7) foi observado um aumento da atividade do iogurte para o caso da amostra IESF-CT. Esse facto pode ser explicado pela proteção efetiva conferida pelo processo de *spray drying* associado a uma libertação controlada do extrato decorrente da reticulação efetiva do material encapsulante. É de salientar que a amostra IEST-CT apresentou uma atividade antioxidante muito superior após 7 dias de armazenamento, assim como observado para as microesferas isoladas. Este facto pode ser atribuído à reação do ácido cítrico tanto com a maltodextrina como com o extrato (nas condições de utilização de tratamento térmico), resultando em substâncias com uma atividade antioxidante melhorada.

A **Tabela 13** também apresenta os resultados obtidos para atividade citotóxica em células não tumorais dos iogurtes estudados; os valores são expressos em GI<sub>50</sub> (concentração responsável por 50% da inibição do crescimento celular). Foi observado que, assim como para o extrato e as microesferas isolados, as amostras de iogurtes desenvolvidas não apresentaram atividade citotóxica para células normais. De realçar a importância desse resultado uma vez que pode-se obter um iogurte funcional com atividade antioxidante elevada e que não oferece perigo a saúde decorrente do seu consumo.

**Tabela 11. Valor nutricional das amostras de iogurte analisadas ao longo do período de armazenamento.**

Valor nutricional		Humidade (g/100 g)	Cinzas (g/100 g)	Gorduras (g/100 g)	Proteínas (g/100 g)	Hid. de carbono (g/100 g)	Galactose (g/100 g)	Lactose (g/100 g)	Energia (kcal/100 g)
0 Dias	ICN	85,3 ± 0,8 <sup>a</sup>	0,86 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,58 ± 0,01 <sup>a</sup>	4,45 ± 0,02 <sup>b</sup>	5,78 ± 0,01 <sup>ab</sup>	0,94 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,5 ± 0,1 <sup>a</sup>	73,16 ± 0,02 <sup>b</sup>
	ICP	85,1 ± 0,3 <sup>a</sup>	0,70 ± 0,04 <sup>b</sup>	3,51 ± 0,08 <sup>a</sup>	4,69 ± 0,07 <sup>a</sup>	5,97 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,03 <sup>c</sup>	4,49 ± 0,05 <sup>a</sup>	74,3 ± 0,2 <sup>a</sup>
	IESF-ST	82 ± 2 <sup>b</sup>	0,80 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,17 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,61 ± 0,01 <sup>a</sup>	5,24 ± 0,07 <sup>c</sup>	0,91 ± 0,01 <sup>b</sup>	3,96 ± 0,09 <sup>b</sup>	67,91 ± 0,02 <sup>c</sup>
	IESF-CT	82 ± 2 <sup>b</sup>	0,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	2,53 ± 0,02 <sup>c</sup>	4,50 ± 0,06 <sup>b</sup>	5,72 ± 0,01 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,0 ± 0,3 <sup>b</sup>	63,62 ± 0,02 <sup>d</sup>
7 Dias	ICN	85 ± 1 <sup>a</sup>	0,83 ± 0,01 <sup>a</sup>	3,48 ± 0,02 <sup>a</sup>	4,67 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,88 ± 0,05 <sup>c</sup>	0,92 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,6 ± 0,2 <sup>a</sup>	73,55 ± 0,03 <sup>a</sup>
	ICP	86 ± 1 <sup>a</sup>	0,78 ± 0,02 <sup>a</sup>	3,29 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,63 ± 0,01 <sup>ab</sup>	5,80 ± 0,02 <sup>c</sup>	0,838 ± 0,02 <sup>b</sup>	4,57 ± 0,05 <sup>a</sup>	71,3 ± 0,1 <sup>b</sup>
	IESF-ST	82 ± 2 <sup>b</sup>	0,76 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,86 ± 0,01 <sup>c</sup>	4,60 ± 0,02 <sup>b</sup>	6,20 ± 0,04 <sup>b</sup>	0,83 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,96 ± 0,07 <sup>b</sup>	62,3 ± 0,1 <sup>c</sup>
	IESF-CT	82 ± 1 <sup>b</sup>	0,75 ± 0,07 <sup>a</sup>	2,15 ± 0,01 <sup>d</sup>	4,60 ± 0,01 <sup>b</sup>	6,80 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,81 ± 0,01 <sup>b</sup>	4,12 ± 0,07 <sup>b</sup>	60,0 ± 0,2 <sup>d</sup>

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. ICN: iogurte controlo sem adição de qualquer micoesterol; ICP: iogurte incorporado com extrato de *Agaricus bisporus*; IESF-ST: iogurte incorporado com microesferas contendo extrato de *Agaricus bisporus* sem tratamento térmico; IESF-CT: iogurte incorporado com microesferas contendo extrato de *Agaricus bisporus* com tratamento térmico. Em cada coluna e para cada tempo de prateleira, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12. Perfil de ácidos gordos das amostras de iogurte analisadas ao longo do período de armazenamento.**

		C6:0 (%)	C10:0 (%)	C12:0 (%)	C14:0 (%)	C16:0 (%)	C18:0 (%)	C18:1 (%)	C18:2 (%)	SFA (%)	MUFA (%)	PUFA (%)
0 Dias	ICN	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,05 ± 0,04 <sup>c</sup>	3,45 ± 0,03 <sup>b</sup>	10,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	28,30 ± 0,01 <sup>d</sup>	9,1 ± 0,1 <sup>c</sup>	25,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,00 ± 0,01 <sup>a</sup>	67,48 ± 0,05 <sup>c</sup>	27,4 ± 0,1 <sup>a</sup>	5,15 ± 0,04 <sup>a</sup>
	ICP	3,27 ± 0,04 <sup>a</sup>	3,210 ± 0,004 <sup>ab</sup>	3,588 ± 0,002 <sup>a</sup>	11,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	31,00 ± 0,01 <sup>b</sup>	10,1 ± 0,4 <sup>a</sup>	23,1 ± 0,2 <sup>c</sup>	2,64 ± 0,01 <sup>c</sup>	70,3 ± 0,3 <sup>a</sup>	25,3 ± 0,3 <sup>d</sup>	4,40 ± 0,01 <sup>c</sup>
	IESF-ST	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,62 ± 0,04 <sup>a</sup>	11,099 ± 0,003 <sup>b</sup>	30,49 ± 0,04 <sup>c</sup>	9,54 ± 0,03 <sup>bc</sup>	23,6 ± 0,1 <sup>b</sup>	2,8 ± 0,1 <sup>b</sup>	69,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	25,8 ± 0,1 <sup>c</sup>	4,8 ± 0,2 <sup>b</sup>
	IESF-CT	2,4 ± 0,1 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>bc</sup>	3,61 ± 0,02 <sup>a</sup>	11,41 ± 0,01 <sup>a</sup>	31,418 ± 0,001 <sup>a</sup>	9,96 ± 0,05 <sup>ab</sup>	23,9 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,56 ± 0,02 <sup>c</sup>	69,2 ± 0,2 <sup>b</sup>	26,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	4,46 ± 0,05 <sup>c</sup>
7 Dias	ICN	2,8 ± 0,2 <sup>b</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,02 <sup>b</sup>	11,1 ± 0,2 <sup>b</sup>	29,8 ± 0,3 <sup>c</sup>	10,6 ± 0,1 <sup>a</sup>	24,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	2,353 ± 0,004 <sup>c</sup>	69,0 ± 0,1 <sup>b</sup>	27,0 ± 0,1 <sup>a</sup>	4,05 ± 0,01 <sup>c</sup>
	ICP	3,3 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,1 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,516 ± 0,003 <sup>b</sup>	11,03 ± 0,03 <sup>b</sup>	30,6 ± 0,2 <sup>b</sup>	9,7 ± 0,1 <sup>c</sup>	22,7 ± 0,2 <sup>b</sup>	2,39 ± 0,02 <sup>b</sup>	70,7 ± 0,3 <sup>a</sup>	25,1 ± 0,3 <sup>b</sup>	4,20 ± 0,03 <sup>b</sup>
	IESF-ST	2,19 ± 0,04 <sup>c</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,7 ± 0,1 <sup>a</sup>	11,8 ± 0,1 <sup>a</sup>	32,9 ± 0,5 <sup>a</sup>	10,3 ± 0,1 <sup>b</sup>	23 ± 1 <sup>b</sup>	2,390 ± 0,001 <sup>b</sup>	71 ± 1 <sup>a</sup>	25 ± 1 <sup>b</sup>	4,20 ± 0,03 <sup>b</sup>
	IESF-CT	3,3 ± 0,2 <sup>a</sup>	3,2 ± 0,1 <sup>a</sup>	3,5 ± 0,1 <sup>b</sup>	10,9 ± 0,1 <sup>b</sup>	30,4 ± 0,2 <sup>b</sup>	9,6 ± 0,1 <sup>c</sup>	22,9 ± 0,4 <sup>b</sup>	2,46 ± 0,01 <sup>a</sup>	70,4 ± 0,3 <sup>a</sup>	25,3 ± 0,3 <sup>b</sup>	4,276 ± 0,004 <sup>a</sup>

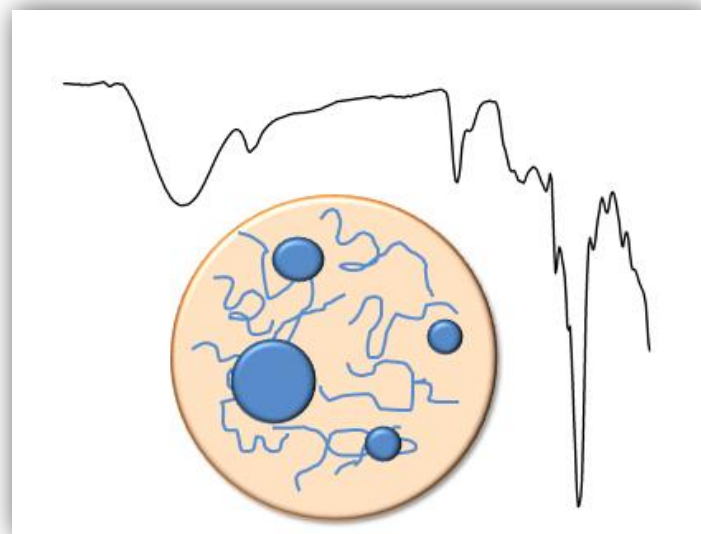
Os resultados são expressos como média ± desvio padrão. Ácido caprónico (C6:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1); Ácido linoleico (C18:2); SFA *saturated fatty acids* (ácidos gordos saturados); MUFA *monounsaturated fatty acids* (ácidos gordos monoinsaturados); PUFA *polyunsaturated fatty acids* (ácidos gordos polinsaturados). A diferença para os 100% corresponde a outros 15 ácidos gordos menos abundantes (dados não apresentados). ICN: iogurte controlo sem adição de qualquer microesterol; ICP: iogurte incorporado com extrato de *Agaricus bisporus*; IESF-ST: iogurte incorporado com microesferas contendo extrato de *Agaricus bisporus* sem tratamento térmico; IESF-CT: iogurte incorporado com microesferas contendo extrato de *Agaricus bisporus* com tratamento térmico. Em cada coluna e para cada tempo de prateleira, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

Tabela 13. Propriedades bioativas das amostras de iogurte analisadas ao longo do período de armazenamento.

	0 Dias				7 Dias			
	ICN	ICP	IESF-ST	IESF-CT	ICN	ICP	IESF-ST	IESF-CT
<b>Atividade antioxidante (EC<sub>50</sub>, mg/mL)</b>								
Atividade captadora de radicais DPPH	>400	214 ± 5 <sup>b</sup>	273 ± 3 <sup>a</sup>	106 ± 2 <sup>c</sup>	>400	248 ± 2 <sup>b</sup>	314 ± 5 <sup>a</sup>	48,7 ± 0,3 <sup>c</sup>
<b>Atividade citotóxica (GI<sub>50</sub>, µg/mL)</b>								
PLP2 (células não tumorais de fígado de porco)	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400

Os resultados são expressos em mg de extrato de iogurte/mL para a atividade captadora de radicais DPPH e em µg de extrato de iogurte/mL para a atividade citotóxica. Valores de EC<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante. Valor de EC<sub>50</sub> para o Trolox (controlo positivo): 42 µg/mL (atividade captadora DPPH). Valores de GI<sub>50</sub> (média ± desvio padrão): Concentração de amostra correspondente a 50% de inibição do crescimento na cultura primária de células de fígado - PLP2. Valor de GI<sub>50</sub> para a Elipticina (controlo positivo): 3 µg/mL (PLP2). EXT: extrato de *Agaricus bisporus*; ESF-ST: microesferas contendo extrato sem tratamento térmico; ESF-CT: microesferas contendo extrato com tratamento térmico; E-ESFV-ST: microesferas vazias sem tratamento térmico; ESFV-CT: microesferas vazias com tratamento térmico. Em cada coluna e para cada tempo de prateleira, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSÃO E TRABALHO FUTURO





O presente estudo teve como objetivos aplicar técnicas de modificação química e de microencapsulação para aumentar a compatibilidade/bioatividade de micosteróis visando uma aplicação mais eficaz em matrizes lipofílicas e hidrofílicas, contribuindo assim para a obtenção de alimentos funcionais capazes de exercerem efeitos benéficos ao consumidor, nomeadamente por apresentarem atividade antioxidante e citotóxica para células tumorais.

Através da modificação química do ergosterol pelas técnicas de acetilação, metilação e esterificação obtiveram-se compostos com atividade citotóxica para células tumorais relativamente inferiores às da molécula precursora (ergosterol). Contudo, a sua utilização é promissora uma vez que não provocaram a inibição do crescimento de células normais, facto que foi observado para a molécula precursora.

A abordagem selecionada para a microencapsulação dos extratos de *Agaricus bisporus* obtidos pela técnica de ultrassons recorreu à utilização da técnica de *spray drying* e baseou-se num sistema químico onde a reticulação da maltodextrina com ácido cítrico foi explorada para formar o material encapsulante. Como resultados importantes da aplicação deste método observou-se que maltodextrina reagiu com o ácido cítrico conduzindo à reticulação desejada. No entanto, foi também verificado que o extrato apresenta potencial de reagir com o ácido cítrico. Este ponto, que à partida parecia constituir um problema, veio a revelar-se uma estratégia interessante já que foi possível observar um aumento da atividade antioxidante do extrato encapsulado (efeito intensificado com a aplicação de tratamento térmico). Em síntese, os resultados obtidos sugerem que a aplicação processo de *spray drying* nas condições utilizadas (170°C, contato instantâneo), *per se*, garantem as condições favoráveis para a ocorrência da reticulação do material encapsulante, porém, a aplicação do tratamento térmico do material após atomização (140°C, 4 horas) potencia a reação do extrato com o ácido cítrico levando à formação de compostos com atividade biológica superior. Adicionalmente, estes produtos não apresentaram toxicidade para células não tumorais.

A prova de conceito da utilização dos produtos desenvolvidos (derivado do ergosterol e extratos de *Agaricus bisporus* encapsulados) como agentes funcionalizantes de alimentos foi testada pela incorporação em maionese e iogurte, respetivamente. A funcionalização da maionese foi feita com o derivado acetilado do ergosterol (composto sintetizado que apresentou melhor atividade citotóxica) e a sua performance comparada

com a da maionese aditivada com ergosterol. Destaca-se que a maionese incorporada com ergosterol apresentou atividade citotóxica para células tumorais e células normais. Entretanto, a maionese contendo seu derivado acetilado, apesar de um efeito inferior ao da molécula precursora, não apresentou inibição de células normais. Este resultado é interessante uma vez que ao não apresentar toxicidade, uma concentração maior do ergosterol acetilado pode ser utilizada e, desta forma, maximizar a atividade pretendida quando incorporada em maionese.

O extrato de *Agaricus bisporus* incorporado na forma livre e microencapsulada em iogurtes resultou em produtos com propriedades bioativas promissoras. Os resultados obtidos comprovam que o uso da técnica de *spray drying* e a ocorrência de reticulação do material encapsulante são eficientes para promover a proteção e liberação controlada do extrato durante o tempo de armazenamento das amostras. Destaca-se ainda que a ocorrência da reação do extrato com o ácido cítrico conduziu a produtos com atividade biológica mais promissora potenciando os efeitos benéficos para a saúde, nomeadamente no que respeita à atividade antioxidante. A aplicação industrial dos iogurtes funcionalizados com extrato microencapsulado mostra-se assim uma alternativa interessante uma vez que o princípio ativo (extrato) pode ser obtido a partir de bioresíduos da produção de cogumelos e os materiais de base para a formulação das microesferas (maltodextrina e ácido cítrico) são de origem natural e considerados de baixo custo. Destaca-se ainda que o ácido cítrico apresenta adicionalmente efeitos conservantes, antioxidantes e antimicrobianos, sendo utilizado a nível industrial para este fim.

O presente trabalho, não obstante os resultados importantes obtidos, pode ainda ser explorado nas seguintes vertentes:

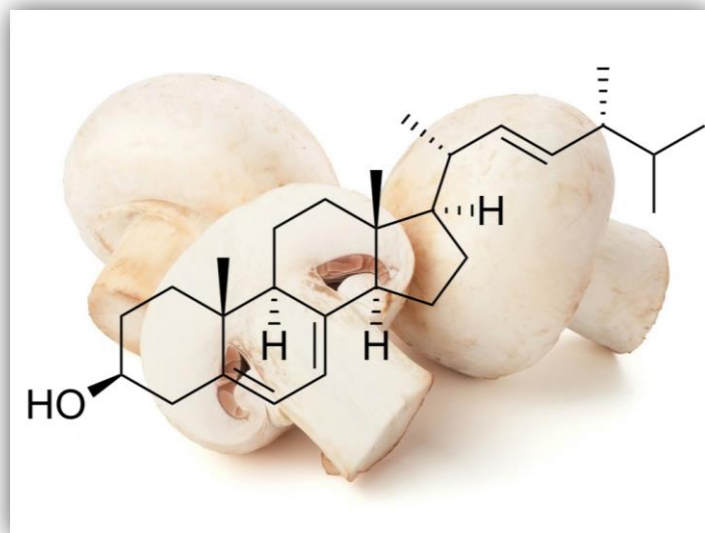
- Proceder a caracterização da molécula obtida através da reação de esterificação do ergosterol por espectroscopia de massa e infravermelho, visando complementar os dados obtidos por <sup>1</sup>HMRN para a elucidação de sua estrutura química;
- Continuar os estudos de modificação química do ergosterol e estender as estratégias desenvolvidas a extratos reais;
- Otimizar o processo de microencapsulação visando a obtenção de eficiências de microencapsulação superiores e compreender melhor o processo que conduz ao

incremento da bioatividade, que se identificou como estando mais relacionado com a etapa de pós-tratamento;

- Continuar a explorar outras técnicas de microencapsulação, materiais e agentes de reticulação, levando sempre em consideração a utilização de materiais de origem natural, de baixa toxicidade e compatíveis com produtos alimentares;
- Explorar o potencial de incorporação dos produtos obtidos (derivados do ergosterol e extratos de *Agaricus bisporus* encapsulados) como ingredientes alimentares mediante o estudo de outras matrizes alimentares.



## 6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS





- ABREU *et al.* Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3- aminothieno[3,2-b]pyridine-2- carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 5800-5806, 2011.
- ACEVEDO-FANI, A.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍN-BELLOSO, O. Nanostructured emulsions and nanolaminates for delivery of active ingredients: Improving food safety and functionality. **Trends in Food Science & Technology**, p. 1–11, 2016.
- ALCAZAR-FUOLI, L. *et al.* Ergosterol biosynthesis pathway in *Aspergillus fumigatus*. **Steroids**, v. 73, n. 3, p. 339–347, 2008.
- AOAC. Official methods of analysis of AOAC international. **AOAC international**, 20<sup>a</sup> ed., 2016.
- ASH, M. M. *et al.* Phytosterol stearate esters elicit similar responses on plasma lipids and cholesterol absorption but different responses on fecal neutral sterol excretion and hepatic free cholesterol in male Syrian hamsters. **Nutrition Research**, v. 31, p. 537-543, 2011.
- AWADHIYA, A.; KUMAR, D.; VERMA, V. Crosslinking of agarose bioplastic using citric acid. **Carbohydrate Polymers**, v.151, p. 60-67, 2016.
- AZEREDO, H. M. C.; WALDRON, K. W. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 52, p. 109-122, 2016.
- BARREIRA, J. C. M.; FERREIRA, I. C. F. R. Steroids in natural matrices. **Biotechnology of Bioactive Compounds**, p. 395–431, 2015.
- BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P.; FERREIRA, I. C. F. R. Development of a Novel Methodology for the Analysis of Ergosterol in Mushrooms. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p. 217–223, 2014.
- BARROS, L. *et al.* Effect of fruiting body maturity stage on chemical composition and antimicrobial activity of *Lactarius sp.* mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 21, p. 8766–8771, 2007.
- BARROS, L. *et al.* Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2742-2747, 2008.
- BARROS, L. *et al.* Phenolic acids determination by HPLC–DAD–ESI/MS in sixteen different Portuguese wild mushrooms species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 1076-1079, 2009.
- BOK, J. W. *et al.* Antitumor sterols from the mycelia of *Cordyceps sinensis*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 891–898, 1999.
- BORTNOWSKA, G. Multilayer Oil-in-Water Emulsions: Formation, Characteristics and Application as the Carriers for Lipophilic Bioactive Food Components – a Review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 65, n. 3, p. 157–166, 2015.

- BRUFAU, G.; CANELA, M. A.; RAFECAS, M. Phytosterols: physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties. **Nutrition Research**, v. 28, n. 4, p. 217–225, 2008.
- CARNEIRO, H. C. F. *et al.* Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by *spray drying* using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443–451, 2013.
- CARR, T. P. *et al.* Stearate-enriched plant sterol esters lower serum LDL cholesterol concentration in normo- and hypercholesterolemic adults. **The Journal of Nutrition**, v. 139, n. 8, p. 1445–1450, 2009.
- CARVALHO, A. G. DA S. *et al.* Physical properties and morphology of spray dried microparticles containing anthocyanins of jussara (*Euterpe edulis Martius*) extract. **Powder Technology**, v. 294, p. 421–428, 2016.
- CASTRO-CABADO, M.; CASADO, A. L.; ROMÁN, J. S. Bio-based thermosets: Effect of the structure of polycarboxylic acids on the thermal crosslinking of maltodextrins. **European Polymer Journal**, v. 78, p. 91-105, 2016a.
- CASTRO-CABADO, M. *et al.* Thermal Crosslinking of Maltodextrin and Citric Acid. Methodology to Control the Polycondensation Reaction under Processing Conditions. **Polymers & Polymer Composites**, v. 24, p. 643-654, 2016b.
- CHAIBAKHSH, N. *et al.* Lipase-catalyzed synthesis of ergosterol ester. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 1, p. 51–56, 2012.
- CHAWLA, R.; S., S.; GOEL, N. Phytosterol and its esters as novel food ingredients: A review. **Asian Journal of Dairy and Food Research**, v. 35, n. 3, p. 217–226, 2016.
- CHRONAKIS, S. On the Molecular Characteristics, Compositional Properties, and Structural-Functional Mechanisms of Maltodextrins: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, p. 599-637, 1998.
- CIRIMINNA, R. *et al.* Citric acid: Emerging Applications of a Key Biotechnology Industrial Product. **Chemistry Central Journal**, v. 11, p. 1-9, 2017.
- COLUSSI, G. *et al.* Impact of omega-3 polyunsaturated fatty acids on vascular function and blood pressure: Relevance for cardiovascular outcomes. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 27, p. 191-200, 2017.
- COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 442–457, 2016.
- DA COSTA, J. M. G. *et al.* Microencapsulation of Swiss cheese bioaroma by spray-drying: Process optimization and characterization of particles. **Powder Technology**, v. 274, p. 296–304, 2015.
- DE JONG, A.; PLAT, J.; MENSINK, R. P. Metabolic effects of plant sterols and stanols (Review). **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, n. 7, p. 362–369, 2003.

- DI BATTISTA, C. A. *et al.* The use of arabic gum, maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by *spray drying*. **Powder Technology**, v. 286, p. 193–201, 2015.
- DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food & Function**, v. 6, n. 4, p. 1035–1052, 2015.
- DI SABATINO, M. *et al.* Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 5, p. 346–356, 2012.
- DONSÌ, F. *et al.* Encapsulation of bioactive compounds in nanoemulsion- based delivery systems. **Procedia Food Science**, v. 1, p. 1666–1671, 2011.
- DORĐEVIĆ, V. *et al.* Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, p. 452-490, 2014.
- DUPONT, S. *et al.* Ergosterol biosynthesis: a fungal pathway for life on land? **Evolution**, v. 66, p. 2961-2968, 2012.
- ENCINA, C. *et al.* Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. **Trends in Food Science and Technology**, v. 56, p. 46–60, 2016.
- ENGEL, R.; SCHUBERT, H. Formulation of phytosterols in emulsions for increased dose response in functional foods. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, n. 2, p. 233–237, 2005.
- FISK, I. D. *et al.* Entrapment of a volatile lipophilic aroma compound (d-limonene) in spray dried water-washed oil bodies naturally derived from sunflower seeds (*Helianthus annuus*). **Food Research International**, v. 54, n. 1, p. 861–866, 2013.
- FRYBERG, M.; OEHLISCHLAGER, A. C.; UNRAU, A. M. Biosynthesis of ergosterol in yeast. Evidence for multiple pathways. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 17, p. 5747–5757, 1973.
- GAO, J. M. *et al.* Ergosterol peroxides as phospholipase A2 inhibitors from the fungus *Lactarius hatsudake*. **Phytomedicine**, v. 14, n. 12, p. 821–824, 2007.
- GHANBARZADEH, B.; ALMASI, H.; ENTEZAMI, A. A. Improving the barrier and mechanical properties of corn starch-based edible films: Effect of citric acid and carboxymethyl cellulose. **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 229-235, 2011.
- GIL-RAMÍREZ, A. *et al.* Sterol enriched fractions obtained from *Agaricus bisporus* fruiting bodies and by-products by compressed fluid technologies (PLE and SFE). **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 101–107, 2013.
- GIL-RAMÍREZ, A. *et al.* Effect of ergosterol-enriched extracts obtained from *Agaricus bisporus* on cholesterol absorption using an in vitro digestion model. **Journal of Functional Foods**, v. 11, p. 589–597, 2014.
- GONÇALVES, A.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Design and characterization of controlled-release vitamin A microparticles prepared by a spray-drying process. **Powder Technology**, v.305, p. 411-417, 2017.

- GYLLING, H. *et al.* Plant sterols and plant stanols in the management of dyslipidaemia and prevention of cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v. 232, n. 2, p. 346–360, 2014.
- GYLLING, H.; SIMONEN, P. Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. **Nutrients**, v. 7, n. 9, p. 7965–7977, 2015.
- HE, W. *et al.* Efficient Synthesis and Characterization of Ergosterol Laurate in a Solvent-Free System. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 11748–11755, 2014.
- HE, W. SEN *et al.* A novel chemo-enzymatic synthesis of hydrophilic phytosterol derivatives. **Food Chemistry**, v. 192, p. 557–565, 2016.
- HEE, Y. Y. *et al.* Influence of different wall materials on the microencapsulation of virgin coconut oil by *spray drying*. **International Journal of Food Engineering**, v. 11, n. 1, p. 61–69, 2015.
- HELENO, S. A. *et al.* Cytotoxicity of Coprinopsis atramentaria extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. **Food Research International**, v. 55, p. 170-175, 2014.
- HELENO, S. A. *et al.* Optimization of ultrasound-assisted extraction to obtain mycosterols from *Agaricus bisporus L.* by response surface methodology and comparison with conventional Soxhlet extraction. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1054–1063, 2016.
- HELENO, S. A. *et al.* Phenolic, Polysaccharidic, and Lipidic Fractions of Mushrooms from Northeastern Portugal: Chemical Compounds with Antioxidant Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4634-4640, 2012.
- IKEDA, I. Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols. **Journal of Oleo Science**, v. 64, p. 9-18, 2015.
- JIMÉNEZ-COLMENERO, F. Potential applications of multiple emulsions in the development of healthy and functional foods. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 64–74, 2013.
- KWAK, H. S. Overview of Nano- and Microencapsulation for Foods. **Nano- and Microencapsulation for Foods**, p. 1–14, 2014.
- KOZARSKI *et al.* Antioxidative and immunomodulating activities of polysaccharide extracts of the medicinal mushrooms *Agaricus bisporus*, *Agaricus brasiliensis*, *Ganoderma lucidum* and *Phellinus linteus*. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1667-1675, 2011.
- LEAL, A. R. *et al.* Portuguese wild mushrooms at the “pharma-nutrition” interface: Nutritional characterization and antioxidant properties. **Food Research International**, v. 50, n. 1, p. 1–9, 2013.
- LIU, W. *et al.* On enhancing the solubility of curcumin by microencapsulation in whey protein isolate via *spray drying*. **Journal of Food Engineering**, v. 169, p. 189–195, 2016.

- LIU, Y. T. *et al.* Chemical composition of five wild edible mushrooms collected from Southwest China and their antihyperglycemic and antioxidant activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 5, p. 1238–1244, 2012.
- LOPEZ-HUERTAS, E. Health effects of oleic acid and long chain omega-3 fatty acids (EPA and DHA) enriched milks. A review of intervention studies. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 200-207, 2010.
- MARIA, T. M. R. *et al.* Argilas como catalisadores verdes na esterificação do colesterol. Caracterização espectroscópica e identificação de polimorfos por métodos de análise térmica. Uma proposta laboratorial interdisciplinar para o 1º ciclo universitário. **Química Nova**, v. 32, p. 2225-2229, 2009.
- MARTÍNEZ, M. L. *et al.* Oxidative stability of walnut (*Juglans regia L.*) and chia (*Salvia hispanica L.*) oils microencapsulated by *spray drying*. **Powder Technology**, v. 270, p. 271–277, 2015.
- MASCHKE, A. *et al.* Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p. 175–187, 2007.
- MATOS-JR, F. E. *et al.* Development and characterization of solid lipid microparticles loaded with ascorbic acid and produced by spray congealing. **Food Research International**, v. 67, p. 52–59, 2015.
- MATTILA, P. *et al.* Sterol and vitamin D2 contents in some wild and cultivated mushrooms. **Food Chemistry**, v. 76, n. 3, p. 293–298, 2002.
- MESINK, R. P. *et al.* Effects of plant stanol esters supplied in low-fat yoghurt on serum lipids and lipoproteins, non-cholesterol sterols and fat soluble antioxidant concentrations. **Atherosclerosis**, v. 160, p. 205-213, 2002.
- MORAN-VALERO, M. I. *et al.* Phytosterols esterified with conjugated linoleic acid. *in vitro* intestinal digestion and interaction on cholesterol bioaccessibility. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11323–11330, 2012.
- MOREAU, R. A.; WHITAKER, B. D.; HICKS, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. **Progress in Lipid Research**, v. 41, n. 6, p. 457–500, 2002.
- MORINAGA, N. *et al.* Synthesis of fatty acid sterol esters using cholesterol esterase from *Trichoderma sp. AS59*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 48, n. 6–7, p. 498–504, 2011.
- NDUNGUTSE, V.; MEREDDY, R.; SULTANBAWA, Y. Bioactive Properties of Mushroom (*Agaricus bisporus*) Stipe Extracts. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 39, n. 6, p. 2225–2233, 2015.
- NES, W. D. Biosynthesis of cholesterol and other sterols. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6423–6451, 2011.
- OTHMAN, R. A.; MYRIE, S. B.; JONES, P. J. H. Non-cholesterol sterols and cholesterol metabolism in sitosterolemia. **Atherosclerosis**, v. 231, p. 291-299, 2013.

- PASSERINI, N. *et al.* Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, n. 1–2, p. 92–102, 2006.
- PHILLIPS, K. M. *et al.* Vitamin D and sterol composition of 10 types of mushrooms from retail suppliers in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7841–7853, 2011.
- RAIKOS, V.; RANAWANA, V. Designing emulsion droplets of foods and beverages to enhance delivery of lipophilic bioactive components - a review of recent advances. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 52, n. 1, p. 68–80, 2017.
- RAJABI, H. *et al.* Retention of saffron bioactive components by *spray drying* encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 327–337, 2015.
- RAJU, M. P. *et al.* The Role of Phytosterols Enriched Foods-A Review. **IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology And Food Technology (IOSR-JESTFT)**, v. 7, n. 6, p. 40–47, 2013.
- RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation of active compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76–83, 2016.
- REDDY, N.; REDDY, R.; JIANG, Q. Crosslinking biopolymers for biomedical applications. **Trends in Biotechnology**, v. 33, p. 362–369, 2015.
- REIS, F. S. *et al.* Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: An inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 191–197, 2012.
- RIBEIRO, A. *et al.* Spray-drying microencapsulation of synergistic antioxidant mushroom extracts and their use as functional food ingredients. **Food Chemistry**, v. 188, p. 612–618, 2015.
- ROZNER, S.; GARTI, N. The activity and absorption relationship of cholesterol and phytosterols. **Colloids and Surfaces A**, v. 283, p. 435–456, 2006.
- RUDKE, A. R. Obtenção de extratos de *Agaricus bisporus* com ergosterol para incorporação em iogurtes e procedimentos de microencapsulação. 102 f. Tese (mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar). Instituto Politécnico de Bragança, 2016.
- SANTIAGO, L. G.; CASTRO, G. R. Novel Technologies for the encapsulation of bioactive food compounds. **Current Opinion in Food Science**, v. 7, p. 78–85, 2016.
- SHAO, S. *et al.* Ergosterol profiles, fatty acid composition, and antioxidant activities of button mushrooms as affected by tissue part and developmental stage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p. 11616–11625, 2010.
- SOBEL, R.; VERSIC, R.; GAONKAR, A. G. Introduction to Microencapsulation and Controlled Delivery in Foods. [s.l.] **Elsevier Inc.**, 2014.
- STOJKOVIĆ *et al.* Cultivated strains of *Agaricus bisporus* and *A. brasiliensis*: chemical characterization and evaluation of antioxidant and antimicrobial properties for the final

- healthy product – natural preservatives in yoghurt. **Food & Function**, v. 5, p. 1602-1612, 2014.
- STONE, S. *et al.* In situ citric acid crosslinking of alginate/polyvinyl alcohol electrospun nanofibers. **Materials Letters**, v.112, p. 32-35, 2013.
- SUBBIAH, M. T. R.; ABPLANALP, W. Ergosterol ( Major Sterol of Baker's and Brewer's Yeast Extracts ) Inhibits the Growth of Human Breast Cancer Cells in vitro and the Potential Role of its Oxidation Products. **International Journal for Vitamin and Nutrition Research**, v. 73, n. 613, p. 19–27, 2003.
- TAN, Z.; SHAHIDI, F. A novel chemoenzymatic synthesis of phytosteryl caffeates and assessment of their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 133, n. 4, p. 1427–1434, 2012.
- TAOFIQ, O. *et al.* Development of Mushroom-Based Cosmeceutical Formulations with Anti-Inflammatory, Anti-Tyrosinase, Antioxidant, and Antibacterial Properties. **Molecules**, v. 21, p. 1-12, 2016.
- TEICHMANN, A. *et al.* Sterol and vitamin D2 concentrations in cultivated and wild grown mushrooms: Effects of UV irradiation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 815–822, 2007.
- TORRES, C. F. *et al.* A two steps enzymatic procedure to obtain sterol esters, tocopherols and fatty acid ethyl esters from soybean oil deodorizer distillate. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 9, p. 1335–1341, 2007.
- TRAUTWEIN, E. A. *et al.* Proposed mechanisms of cholesterol-lowering action of plant sterols. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, n. 3, p. 171–185, 2003.
- VILLARES, A. *et al.* Identification and quantification of ergosterol and phenolic compounds occurring in *Tuber spp.* truffles. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1–2, p. 177–182, 2012.
- WANG *et al.* Intestine-Specific Delivery of Hydrophobic Bioactives from Oxidized Starch Microspheres with an Enhanced Stability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, p. 8669-8675, 2015.
- WANG, Z.; HWANG, S. H.; LIM, S. S. Lipophilization of phenolic acids with phytosterols by a chemoenzymatic method to improve their antioxidant activities. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 117, n. 7, p. 1037–1048, 2015.
- YANG *et al.* Review of the roles of conjugated linoleic acid in health and disease. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 314-325, 2015.
- YASUKAWA, K. *et al.* Inhibitory effects of ergosterol isolated from the edible mushroom *Hypsizygus marmoreus* on TPA-induced inflammatory ear oedema and tumour promotion in mice. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 1, p. 10–13, 1994.
- YI, C. *et al.* Enhanced oral bioavailability of a sterol-loaded microemulsion formulation of *Flammulina velutipes*, a potential antitumor drug. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 5067–5078, 2012.

- YI, C. *et al.* Cytotoxic effect of novel *Flammulina velutipes* sterols and its oral bioavailability via mixed micellar nanoformulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 448, n. 1, p. 44–50, 2013a.
- YI, C. *et al.* Enhanced oral bioavailability and tissue distribution of a new potential anticancer agent, *Flammulina velutipes* sterols, through liposomal encapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 25, p. 5961–5971, 2013b.
- ZAND-RAJABI, H.; MADADLOU, A. Citric acid cross-linking of heat-set whey protein hydrogel influences its textural attributes and caffeine uptake and release behaviour. **International Dairy Journal**, v. 61. p. 142-147, 2016.
- ZHANG, H. *et al.* Ergosterol-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles with enhanced in vitro antitumor activity and oral bioavailability. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 37, n. 6, p. 834–844, 2016.
- ZHANG, R.; MCCLEMENTS, D. J. Enhancing nutraceutical bioavailability by controlling the composition and structure of gastrointestinal contents: Emulsion-based delivery and excipient systems. **Food Structure**, v. 10, p. 21–36, 2016.

