

**Extratos fenólicos de *Suillus luteus* e *Coprinopsis atramentaria*:  
avaliação de sinergismos no seu potencial antioxidante e encapsulação  
por *spray drying* para fins nutracêuticos**

**Andreia Sofia Silva Ribeiro**

Trabalho de projeto apresentado à  
**Escola Superior de Tecnologia e Gestão**  
**Instituto Politécnico de Bragança**  
para obtenção do grau de Mestre em  
**Tecnologia Biomédica**

Este trabalho foi efetuado sob orientação de:

**Professora Doutora Filomena Barreiro**  
**Professora Doutora Isabel Ferreira**

outubro de 2014



Dedico em especial aos meus PAIS e ao Bruno  
por todo o Amor, Carinho e Força que me transmitiram  
ao longo deste percurso académico.



## **Agradecimentos**

Em primeiro quero citar um especial agradecimento às Professoras Doutoras Filomena Barreiro e Isabel Ferreira pela oportunidade concedida, por todo o conhecimento transmitido, apoio e disponibilidade para a realização deste trabalho.

À Lillian Barros pela dedicação, apoio, atenção e ajuda proporcionada a nível laboratorial. A todos os investigadores que de forma direta ou indireta ajudaram para a realização do trabalho laboratorial.

Aos laboratórios BioChemCore-CIMO, LSRE – IPB e LSRE – FEUP pelo material dispensado para a elaboração deste trabalho. À Cargill pelo fornecimento de maltodextrina (referência C\*Dry MD 01915). À empresa, Queijos Casa Matias, Lda. pelo fornecimento dos requeijões e ao Márcio Carcho que teve a prestabilidade de os fabricar.

A todos os meus Amigos pela ajuda e apoio proporcionado durante estes anos e por todos os momentos magníficos que partilhamos que jamais serão esquecidos.

Este trabalho foi elaborado no âmbito dos projetos:

PRODER No. 46577: PlantLact: New functional lactic products without synthetic conservatives.



NORTE-07-0124-FEDER-000014 - RL2\_P3 Polymer Reaction Engineering.



## Resumo

Atualmente, muitos consumidores procuram nos alimentos um caráter funcional para além das suas propriedades nutricionais. Assim, o conceito de alimento funcional e/ou nutracêuticos torna-se muito atual, possibilitando a obtenção de benefícios adicionais para a saúde, nomeadamente na prevenção de doenças. Neste contexto, a incorporação de extratos de cogumelos em matrizes alimentares configura um exemplo de desenvolvimento de nutracêuticos/alimentos funcionais. Contudo, estes extratos ricos em moléculas bioativas (e.g., compostos fenólicos) são reconhecidos por possuírem instabilidade quando expostos a condições adversas ou até mesmo durante o processamento dos alimentos. Neste sentido, a técnica de microencapsulação pode ajudar a ultrapassar estas restrições. No presente trabalho, foram estudadas as propriedades bioativas dos extratos alcoólicos de duas espécies de cogumelos, *Suillus luteus* e *Coprinopsis atramentaria*, quer de forma individualizada, quer através da sua combinação em diferentes proporções, a fim de avaliar potenciais efeitos sinérgicos. As microesferas foram produzidas através da técnica de *spray drying* utilizando maltodextrina como agente encapsulante, uma vez que esta é frequentemente aplicada na área alimentar com o objetivo de proteger compostos, principalmente da oxidação. Os estudos por microscopia eletrónica de varrimento mostraram microesferas pequenas e com invaginações na superfície, no entanto, houve um bom rendimento e eficiência de encapsulação. Após terem sido avaliadas as propriedades antioxidantes do extrato microencapsulado e de se ter verificado a sua manutenção relativamente ao extrato livre, procedeu-se à incorporação de uma mistura dos extratos (isentos de metanol) de cogumelos (*S. luteus* e *C. atramentaria* (1:1)), na forma microencapsulada e livre, em requeijões. A incorporação do extrato livre conduziu a produtos com atividade antioxidante inicial superior (t=0) tendo-se verificado a sua diminuição para t=7 dias, o que pode estar associado à sua degradação; no entanto, apesar dos requeijões enriquecidos com o extrato microencapsulado terem mostrado uma atividade inferior para o tempo inicial em comparação com o extrato livre, para t=7 houve uma melhoria da atividade o que pode ser justificado pelo facto das microesferas protegerem o extrato e propiciarem uma libertação gradual do mesmo. As análises efetuadas nas amostras de requeijão enriquecidas com o extrato livre e encapsulado revelaram que não houve alteração das suas propriedades nutricionais.



## Abstract

Currently, many consumers search for food with functional character beyond their nutritional properties. Thus, the concept of functional food and/or nutraceuticals becomes a hot topic, allowing the obtaining of additional health benefits, including disease prevention. In this context the incorporation of mushroom extracts in food matrices configures an example of nutraceuticals/functional foods development. However, these extracts are rich in bioactive molecules (in general, phenolic compounds), known to present instability when exposed to adverse conditions or even during food processing; in this regard, the technique of microencapsulation can overcome such constraints. In this work, the bioactive properties of alcoholic extracts of two mushrooms species, *Suillus luteus* and *Coprinopsis atramentaria*, were studied individually or combined at different proportions in order to evaluate potential synergistic effects. The microspheres were produced by spray drying, using maltodextrin as the encapsulating agent, a material widely used in the food sector aiming at protecting compounds, e.g. from oxidation. Studies by scanning electron microscopy showed minor invaginations on microspheres surface, however, a good yield and encapsulation efficiency was attained. After evaluation of encapsulated extracts antioxidant properties and their maintenance, comparatively to the free extract, the work proceeded with the incorporation of a mushroom extracts mixture (*S. luteus* and *C. atramentaria* (1:1)), in the microencapsulated and free forms, in a cottage cheese. The incorporation of free extracts resulted in products with higher initial antioxidant activity (t=0 days) but declining for t=7 days, which may be associated with their degradation. However, the cottage cheese enriched with the microencapsulated extracts, that revealed a lower activity at initial time, showed for t=7 days an increase. This improvement in the antioxidant activity may be explained by an effective protection provided by the microspheres together with a gradual release. Analyses performed on samples of cottage cheese enriched with free and encapsulated extracts showed the maintenance of the nutritional properties.



# Conteúdo

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas	xv
Motivação e Objetivos	xvii
Estrutura da tese	xviii
<b>1 Revisão Bibliográfica</b>	<b>1</b>
1.1 Cogumelos silvestres como alimentos funcionais e fonte de nutracêuticos	1
1.1.1 Atividade antioxidante	2
1.1.2 Atividade antitumoral	5
1.1.3 Outras potencialidades	6
1.1.4 Espécies em estudo: <i>Suillus luteus</i> e <i>Coprinopsis atramentaria</i>	7
1.2 Microencapsulação	9
1.2.1 Método de encapsulação – <i>spray drying</i>	11
1.2.2 Materiais de encapsulação	12
1.2.3 Material encapsulante - Maltodextrina	13
1.2.4 Microencapsulação de compostos fenólicos	16
1.2.5 Incorporação em alimentos	17
<b>2 Materiais e Métodos</b>	<b>19</b>
2.1 Avaliação da atividade antioxidante	19
2.1.1 Preparação dos extratos metanólicos	19
2.1.2 Métodos para a avaliação da atividade antioxidante e fenóis totais	21
2.1.3 Avaliação da atividade antitumoral – SRB	25
2.2 Microencapsulação dos extratos	27
2.2.1 Processo de encapsulação	28
2.2.2 Caracterização das microesferas	29

2.3	Incorporação na matriz alimentar	31
2.3.1	Avaliação da cor dos requeijões	32
2.3.2	Avaliação do valor nutricional	33
2.4	Análise estatística	34
3	<i>Resultados e Discussão</i>	35
3.1	Atividade antioxidante dos extratos livres	35
3.2	Atividade antitumoral dos extratos livres	39
3.3	Microencapsulação	42
3.3.1	Caracterização das Mic	43
3.4	Incorporação numa matriz alimentar	51
3.4.1	Avaliação das propriedades antioxidantes	51
3.4.2	Avaliação da cor dos requeijões	52
3.4.3	Valor nutricional	53
4	<i>Conclusões e Trabalho futuro</i>	59
5	<i>Referências Bibliográficas</i>	63
6	ANEXOS	I

## Lista de Figuras

<i>Figura 1.1</i> - Causas e consequências dos radicais livres no organismo. (Adaptado de: Ferreira et al. (2009)).	3
<i>Figura 1.2</i> – A – Microesfera. B – Microcápsula. (Adaptado de: Suave et al. (2006)).	9
<i>Figura 1.3</i> – Esquemática do processo de encapsulação por <i>spray drying</i> . (Adaptado de: Brasileiro, (2011)).	12
<i>Figura 1.4</i> - Estruturas químicas individuais do amido. A) – Amilose e B) – Amilopectina. (Carvalho et al., 2005)).	14
<i>Figura 1.5</i> - Representação da maltodextrina.	15
<i>Figura 2.1</i> – Demonstração das diluições efetuadas.	20
<i>Figura 2.2</i> – Metodologia para poder redutor.	21
<i>Figura 2.3</i> – Redução do DPPH (Pereira, 2011).	22
<i>Figura 2.4</i> – Procedimento no efeito captador de radicais livres.	22
<i>Figura 2.5</i> – Procedimento a realizar para os ensaios da inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno.	24
<i>Figura 2.6</i> – Procedimento para o ensaio de determinação de fenóis totais.	25
<i>Figura 2.7</i> – Procedimento adotado na realização da atividade antitumoral.	27
<i>Figura 2.8</i> – Büchi mini <i>spray dryer</i> B290.	29
<i>Figura 2.9</i> – Esquemática do processo de encapsulação.	29
<i>Figura 2.10</i> – Principais parâmetros do estudo da estabilidade das Mic.	31
<i>Figura 2.11</i> – Representação no espaço da cor.	33
<i>Figura 3.1</i> – Crescimento das células tumorais HeLa para diferentes concentrações de extrato. A:400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; B: 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; C: 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; D: 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; E: 1,56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ .	40
<i>Figura 3.2</i> – Avaliação da taxa de proliferação de células tumorais em função da concentração de extrato de <i>Suillus luteus</i> .	41
<i>Figura 3.3</i> – Cor das microesferas obtidas, com e sem extrato de cogumelo.	43
<i>Figura 3.4</i> – MEV das Mic de SI:Ca (1:1). A) Ampliação 530x. B) Ampliação 1300x. C) Ampliação 2300x. As setas a laranja indicam Mic com superfície lisa e a área a vermelho Mic com superfície rugosa.	43
<i>Figura 3.5</i> - Diâmetro médio das Mic SI:Ca (1:1).	44
<i>Figura 3.6</i> – A) Cromatograma MD. B) Cromatograma extrato livre SI. C) Cromatograma Mic com SI incorporado. 1 – Ácido cinâmico.	46

<i>Figura 3.7</i> – Ensaio da atividade antioxidante para os ensaios DPPH e PR. A e B para as Mic placebo e C e D para as Mic Sl, Ca, Sl:Ca (1:1) e Mic Sl + Mic Ca. _____	47
<i>Figura 3.8</i> – Preparação das amostras. _____	48
<i>Figura 3.9</i> - Cromatograma individual dos ácidos gordos das amostras de requeijão controlo, requeijão com extrato livre e requeijão com extrato microencapsulado. ____	57
<i>Figura 6.1</i> – Espetro FTIR para o extrato de <i>Suillus luteus</i> (Sl), Sl incorporado com maltodextrina (MD) e também para o polímero utilizado MD. _____	V
<i>Figura 6.2</i> - Espetro FTIR para o extrato de <i>Coprinopsis atramentaria</i> (Ca), Ca incorporado com maltodextrina (MD) e também para o polímero utilizado MD. ____	VI
<i>Figura 6.3</i> - Espetro FTIR para a mistura de extrato de <i>Suillus luteus</i> (Sl) e <i>Coprinopsis atramentaria</i> (Ca), Sl:Ca(1:1) incorporado com maltodextrina (MD) e também para o polímero utilizado MD. _____	VII
<i>Figura 6.4</i> - A) Cromatograma MD. B) Cromatograma extrato livre Ca. C) Cromatograma Mic com Ca incorporado. 1 – Ácido cinâmico. _____	VIII
<i>Figura 6.5</i> - A) Cromatograma MD. B) Cromatograma extrato livre Sl:Ca(1:1). C) Cromatograma Mic com Sl:Ca(1:1) incorporado. 1 – Ácido cinâmico. _____	IX

---

## Lista de Tabelas

<i>Tabela 1.1</i> - Estruturas básicas de compostos fenólicos. (Adaptado de: Bravo (1998), Crozier et al. (2009) e Carocho & Ferreira (2013b)).	5
<i>Tabela 1.2</i> - Informações relativas às espécies de cogumelos silvestres comestíveis em estudo.	7
<i>Tabela 1.3</i> - Técnicas de síntese de micropartículas (Adaptado de: Ré (1998); Azeredo (2005); Suave et al. (2006)).	10
<i>Tabela 1.4</i> – Exemplos de princípios ativos microencapsulados pela técnica de <i>spray drying</i> .	13
<i>Tabela 1.5</i> – Dados nutricionais referentes a uma maltodextrina comercial (Costa, 2012).	16
<i>Tabela 1.6</i> – Microencapsulação por <i>spray drying</i> aplicada em extratos naturais.	17
<i>Tabela 2.1</i> – Massa de cogumelos utilizada para a preparação dos extratos metanólicos.	20
<i>Tabela 3.1</i> – Comparação dos valores de EC <sub>50</sub> (mg/mL) com os da bibliografia (média±DP).	36
<i>Tabela 3.2</i> – Valores relativos à atividade antioxidante das espécies de cogumelos avaliadas individualmente e em misturas com diferentes proporções (média±DP).	37
<i>Tabela 3.3</i> - Conteúdo de fenóis totais das espécies de cogumelos avaliadas individualmente e em misturas com diferentes proporções (média±DP).	38
<i>Tabela 3.4</i> – Valores da atividade antitumoral e hepatotoxicidade das espécies de cogumelos testadas individualmente (média±DP).	40
<i>Tabela 3.5</i> – Massa de microesferas obtidas no <i>spray drying</i> e o rendimento do processo.	42
<i>Tabela 3.6</i> – Eficiência de encapsulação obtida para os extratos individuais e para a combinação (média ± DP).	45
<i>Tabela 3.7</i> – Valores relativos à atividade antioxidante (EC <sub>50</sub> (mg/mL)) das microesferas (média±DP).	47
<i>Tabela 3.8</i> – Valores de EC <sub>50</sub> (mg/mL) para o extrato livre de SI e respetivo encapsulado, para tempo 0 e 30 dias (média±DP).	50
<i>Tabela 3.9</i> - Valores de EC <sub>50</sub> (mg/mL) para o extrato livre de Ca e respetivo encapsulado, para tempo 0 e 30 dias (média±DP).	50

*Tabela 3.10* – Atividade antioxidante, resultados em valores de EC<sub>50</sub> (mg/mL), dos requeijões controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 7 dias de armazenamento (média±DP). \_\_\_\_\_ 51

*Tabela 3.11* – Cor CIE L\*, a\* e b\* dos requeijões controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 7 dias de armazenamento (média±DP). \_\_ 53

*Tabela 3.12* - Valor nutricional dos requeijões controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 7 dias de armazenamento (média ± DP). \_ 54

*Tabela 3.13* – Ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados (percentagem relativa) dos requeijões controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e passados 7 dias de armazenamento (média ± DP). \_\_\_\_\_ 55

*Tabela .6.1* - Imagens MEV das várias microesferas produzidas por spray drying. \_\_ III

*Tabela 6.2* – Quantificação de ácidos gordos (percentagem relativa) presentes nos requeijões controlo, com extrato SiCa livre e microencapsulado no tempo inicial. \_\_\_ X

*Tabela 6.3* - Quantificação de ácidos gordos (percentagem relativa) presentes nos requeijões controlo, com extrato SiCa livre e microencapsulado decorridos 7 dias. \_\_ XI

## Lista de Abreviaturas

<b>ACR</b>	Atividade Captadora de Radicais
<b>AG</b>	Ácido Gordo
<b>Ca</b>	<i>Coprinopsis atramentaria</i>
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CIMO</b>	Centro de Investigação da Montanha
<b>DE</b>	Equivalente de Dextrose
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
<b>EAG</b>	Equivalentes de Ácido Gálico
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
<b>EE</b>	Eficiência de Encapsulação
<b>FAME</b>	Ésteres Metílicos de Ácidos Gordos
<b>FBS</b>	Soro Fetal de Bovino
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama
<b>FTIR</b>	Infravermelho por transformada de Fourier
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa
<b>GI<sub>50</sub></b>	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
<b>GPH-Px</b>	Glutathiona peroxidase
<b>GPH-R</b>	Glutathiona redutase
<b>GSH</b>	Glutathiona
<b>HBSS</b>	Solução salina
<b>HCT15</b>	Cancro do colón
<b>HeLa</b>	Cancro de cervical
<b>HepG2</b>	Cancro de fígado
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta performance
<b>LOO·</b>	Radical livre linoleato
<b>LOOH</b>	Ácido linoleico
<b>LSRE</b>	Laboratório de Processos de Separação e Reação
<b>MCF7</b>	Cancro de mama

<b>MD</b>	Maltodextrina
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrónica de Varrimento
<b>Mic</b>	Microesferas
<b>MUFA</b>	Ácidos Gordos Monoinsaturados
<b>m/v</b>	Relação massa por volume
<b>PDA</b>	Detetor <i>array</i> de fotodíodos
<b>PLP2</b>	Cultura de células primárias
<b>PR</b>	Poder Redutor
<b>PUFA</b>	Ácidos Gordos Polinsaturados
<b>SD</b>	Desvio padrão
<b>SFA</b>	Ácidos Gordos Saturados
<b>SI</b>	<i>Suillus luteus</i>
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SRB</b>	Sulforrodamina B
<b>RNS</b>	Espécie Reativa de Azoto
<b>ROS</b>	Espécie Reativa de Oxigénio
<b>RSS</b>	Espécie Reativa de Enxofre
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético
<b>Trolox</b>	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>v/v</b>	Relação volume por volume

## Motivação e Objetivos

A procura de alimentos que apresentem carácter funcional, isto é, que não sejam apenas equilibrados nutricionalmente mas também com propriedades bioativas, nomeadamente capacidade antioxidante, tem aumentado nos últimos anos.

Os extratos fenólicos obtidos a partir de algumas espécies de cogumelos comestíveis silvestres da região de Trás-os-Montes demonstraram diferentes bioatividades, nomeadamente atividade antioxidante e antitumoral; deste modo, os extratos naturais podem ser incorporados em alimentos de forma a torná-los funcionais. No entanto, é necessário superar algumas das fragilidades dos extratos nomeadamente a sua possível oxidação e o forte odor característico. Neste contexto foi realizada a sua microencapsulação para ultrapassar as restrições descritas anteriormente.

Assim, os principais objetivos deste trabalho foram:

- (i) Avaliar a atividade antioxidante e antitumoral de extratos fenólicos obtidos a partir de duas espécies de cogumelos silvestres, quer individualmente, quer combinados em diferentes proporções de forma a verificar a existência de efeitos sinérgicos.
- (ii) Estabilizar/microencapsular os extratos mais promissores através da técnica de *spray drying*; este passo visa a proteção dos principais compostos à oxidação como também “mascarar” o forte odor característico dos extratos fenólicos de cogumelos aumentando as possibilidades de estes poderem ser utilizados na indústria alimentar. Assim, neste trabalho foi explorada a técnica de microencapsulação, utilizando matrizes biodegradáveis e não tóxicas para a produção de microesferas, aplicando-a aos extratos estudados que demonstraram bioatividade.
- (iii) Averiguar a atividade antioxidante dos extratos microencapsulados de forma a verificar se existe perda, manutenção ou aumento das propriedades, ou até mesmo efeitos sinérgicos com a combinação de extratos encapsulados. Adicionalmente foi realizada a caracterização das microesferas por vários métodos, nomeadamente: avaliação por MEV, eficiência de encapsulação e estudos de estabilidade quando expostas a diferentes condições de armazenamento.

- (iv) Incorporar as microesferas numa matriz alimentar, mais concretamente num requeijão, tendo-se realizado estudos de atividade antioxidante para dois tempos de armazenamento diferentes (0 e 7 dias), avaliação da cor e do valor nutricional das amostras de requeijão obtidas.

## **Estrutura da tese**

Este trabalho encontra-se dividido em 4 capítulos principais. O primeiro denominado por “*Revisão Bibliográfica*” inclui uma revisão da literatura sobre os principais temas em estudo: (i) cogumelos silvestres como alimentos funcionais e fonte de nutracêuticos e (ii) microencapsulação.

O segundo capítulo “*Materiais e métodos*” descreve os principais materiais utilizados no decorrer dos ensaios bem todas as metodologias experimentais seguidas.

No capítulo “*Resultados e discussão*” apresentam-se os principais resultados obtidos experimentalmente seguidos de uma breve discussão dos mesmos.

Por fim, no último capítulo intitulado por “*Conclusão e Trabalho futuro*”, realizam-se as considerações finais ao trabalho, abordando os principais resultados obtidos na realização do mesmo. São também propostas algumas sugestões como trabalho futuro.

No final encontram-se um conjunto de *Anexos* que apoiam o trabalho realizado. Nesta secção poderão também ser encontrados resultados secundários ao trabalho desenvolvido que suportam as conclusões retiradas. Foi ainda incluído um trabalho publicado em conferência e selecionado para apresentação oral.

# ***1 Revisão Bibliográfica***

## **1.1 Cogumelos silvestres como alimentos funcionais e fonte de nutracêuticos**

Os cogumelos silvestres têm sido apreciados em todo o mundo por possuírem uma grande diversidade de biomoléculas com valor nutricional e propriedades medicinais. (Barros *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Reis *et al.*, 2011, Barreira *et al.*, 2012). Têm sido reconhecidos como alimentos funcionais e como fonte de compostos para o desenvolvimento de fármacos e nutracêuticos, incluindo compostos com propriedades antioxidantes, antimicrobianas e antitumorais (Ferreira *et al.*, 2012).

Vários autores nomeadamente Barros *et al.* (2007), Kalač (2009), Heleno *et al.* (2009), Reis *et al.* (2011), Reis *et al.* (2012), Pereira *et al.* (2012) e Vieira *et al.* (2012) descrevem os cogumelos como sendo alimentos ricos em água, minerais, proteínas e hidratos de carbono e com baixo teor em calorias e gordura, tornando-se num bom alimento a ser incluindo em dietas equilibradas.

De 1800 espécies de cogumelos, apenas se conhecem as propriedades medicinais de 700. Estes reúnem uma variedade de metabolitos bioativos, como por exemplo, compostos fenólicos, policétidos, terpenos, esteroides e polissacáridos, com propriedades cardiovasculares, antidiabéticas, antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias, anticancerígena, entre outras (Lule & Xia, 2006; Barros *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2008b; Palacios *et al.*, 2011). Os nutracêuticos estão presentes em

matrizes alimentares e são usados com o objetivo de melhorar a saúde. Assim, um nutracêutico pode ser obtido a partir de extrato, micélio ou corpo de frutificação de um cogumelo, podendo ser consumido na forma de comprimidos como suplemento alimentar (Barros *et al.*, 2007). Foram realizados vários trabalhos de investigação cujos resultados revelam que os cogumelos medicinais têm muito a oferecer ao sistema de cuidados de saúde para o ser humano no século XXI. Nos casos em que os medicamentos modernos não fornecem uma solução completa, a complementação com estes nutracêuticos pode aumentar o sucesso do tratamento (Chang & Miles, 2004).

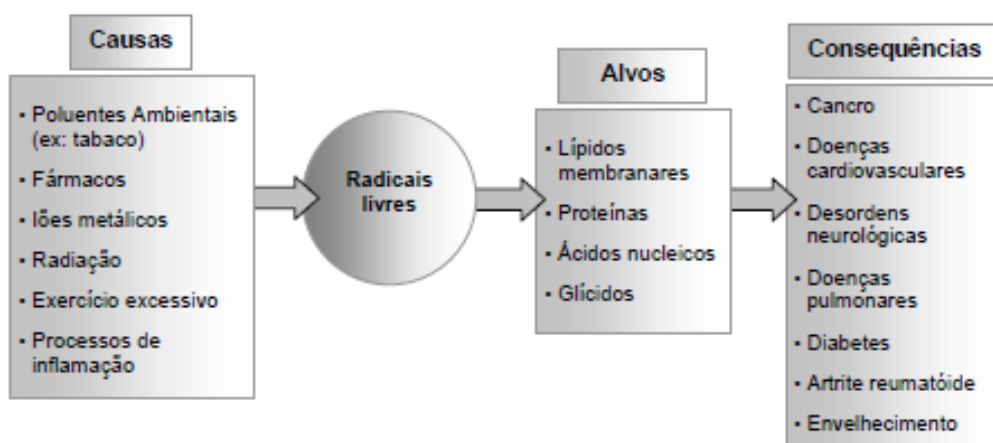
Entre várias propriedades que são conferidas aos cogumelos destacam-se a atividade antioxidante e antitumoral. Seguidamente serão descritas de forma pormenorizada estas duas propriedades uma vez que foram também as testadas a nível laboratorial. No entanto serão apresentadas adicionalmente outras potencialidades destes compostos na saúde humana.

### **1.1.1 Atividade antioxidante**

Um radical livre pode ser qualquer átomo ou molécula que contém um ou mais eletrões desemparelhados na orbital mais exterior (Gutteridge & Halliwell, 2000; Carochó & Ferreira, 2013). Sendo que nestas condições, os radicais livres apresentam uma forte reatividade com outras espécies químicas. Em organismos aeróbios, os radicais livres entre outras espécies reativas de oxigénio (ROS), de azoto (RNS) e de enxofre (RSS) são constantemente produzidos durante o funcionamento normal da célula (Barros *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009; Carochó & Ferreira, 2013; Dziki *et al.*, 2013). Estas espécies podem ser, na maioria, removidas pelas defesas antioxidantes da célula. Em concentrações baixas, as espécies reativas podem ser benéficas ao organismo uma vez que se encontram envolvidas em processos fisiológicos de sinalização e de regulação (Fang *et al.*, 2002). No entanto, quando a produção de espécies reativas nomeadamente radicais livres é excessiva, o equilíbrio entre estes e as defesas antioxidantes é afetado, e nestes casos, existe stresse oxidativo e/ou nitrosativo (Valle, 2011).

O stresse oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercício físico extremo, ou em processos de inflamação, mas pode também ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismo ou em situações relacionadas com várias doenças (Figura 1.1) (Barros *et al.*, 2008; Ferreira *et al.*, 2009;

Helena *et al.*, 2010). As ROS têm uma maior produção e como consequência deste excesso existe a oxidação de lípidos celulares, proteínas e ADN, levando à sua modificação e frequentemente à sua inutilização, deixando de desempenhar a sua função normal (Fu *et al.*, 1998; Ridnour *et al.*, 2005; Valko *et al.*, 2007; Barros *et al.*, 2008).



**Figura 1.1** - Causas e consequências dos radicais livres no organismo. (Adaptado de: Ferreira *et al.* (2009)).

São várias as doenças que podem surgir devido ao stresse oxidativo, evidenciando-se alguns tipos de cancro, diabetes, doenças cardiovasculares, desordens do foro psicológico, entre outras (Barros *et al.*, 2008; Helena *et al.*, 2010). O controlo da produção excessiva de espécies reativas pode ser obtido assegurando níveis adequados de antioxidantes e quelantes de radicais livres melhorando, por exemplo, hábitos alimentares (Lachance *et al.*, 2001).

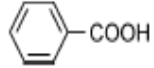
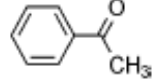
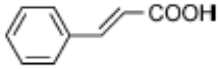
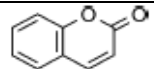
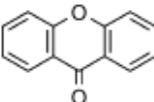
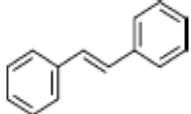
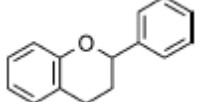
No entanto, em resposta à constante presença de radicais livres, o organismo desenvolveu uma série de mecanismos para a sua própria defesa (Ferreira *et al.*, 2009). Estas defesas podem ser de ordem enzimática ou não enzimática. São várias as defesas enzimáticas endógenas podendo ser encontradas em todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular (Ferreira *et al.*, 2009). São exemplos destas defesas a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPH-Px) e a glutathione redutase (GPH-R). O  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione (GSH), os carotenoides, os flavonoides, entre outros, fazem parte das defesas antioxidantes não enzimáticas (Valko *et al.*, 2007; Carcho & Ferreira, 2013).

Tendo em conta que as defesas endógenas por vezes não são suficientes para controlar o stresse oxidativo, torna-se importante aumentar o consumo de antioxidantes através de alimentos incluídos na dieta; deste modo pode-se constituir um sistema de defesa exógena (Ferreira & Abreu, 2007; Heleno *et al.*, 2010). Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação às concentrações do substrato oxidável, atrasam ou inibem significativamente, a oxidação desse substrato (Niki, 2010).

Estudos realizados nesta área têm mostrado que a ingestão de frutas e vegetais está associado a uma diminuição do desenvolvimento de doenças crónicas como o cancro e doenças cardiovasculares (Liu, 2004), uma vez que estes alimentos têm um alto teor de fitoquímicos. Os fitoquímicos são classificados como compostos bioativos englobando os carotenoides, compostos fenólicos, alcaloides e compostos organossulfurados (Ferreira & Abreu, 2007). Os cogumelos contêm vários compostos fenólicos reconhecidos como sendo excelentes antioxidantes devido à sua capacidade para captar radicais livres por transferência de um eletrão e às excelentes propriedades *redox* dos seus grupos hidroxilos fenólicos. Autores como Froufe *et al.* (2009) descreveram a existência de correlações significativas entre a concentração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos são compostos secundários do metabolismo de plantas e fungos (Bravo, 1998; Lule & Xia, 2006) e tornaram-se num grupo de moléculas importantes para a prevenção e tratamento de diversas doenças (Cao *et al.*, 2002). Os compostos fenólicos podem surgir de uma das duas vias de síntese: do ácido chiquímico ou do acetato (Bravo, 1998). São caracterizados por possuírem no mínimo um anel aromático substituído com um ou mais grupos hidroxilo (Lule & Xia, 2006; Crozier *et al.*, 2009). Normalmente são classificados (Tabela 1.1) pelo número e arranjo dos seus átomos de carbono e são comumente encontrados em formas conjugadas com açúcares e ácidos orgânicos (Bravo, 1998; Crozier *et al.*, 2009).

**Tabela 1.1** - Estruturas básicas de compostos fenólicos. (Adaptado de: Bravo (1998), Crozier *et al.* (2009) e Carochó & Ferreira (2013b)).

Classificação	Esqueleto	Estrutura
Ácido hidroxibenzoico	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	
Acetofenonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	
Ácido hidroxicinâmico	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Cumarinas	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	
Estilbenos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	
Flavonoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	

### 1.1.2 Atividade antitumoral

O cancro é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e os principais fatores responsáveis pela sua origem são nomeadamente os carcinogéneos ambientais, genes herdados, características fisiológicas hereditárias e acumulação de mutações somáticas (Pinto, 2009). Como humanidade tem tentado encontrar tratamentos mais eficazes e com menos efeitos colaterais para tentar reduzir a taxa de mortalidade desta doença (Newman *et al.*, 2003; Carochó & Ferreira, 2013b), os compostos fenólicos têm um grande impacto no tratamento uma vez que exercem um efeito inibidor do crescimento de linhas celulares tumorais e de vários tumores em modelos animais (Cao *et al.*, 2002). De facto, os compostos naturais não perderam a sua influência e entre 1981 e 2006 47,1% dos medicamentos anticancerígenos aprovados clinicamente eram produtos naturais não modificados ou os seus derivados em modelos semissintéticos (Carochó & Ferreira, 2013b).

O facto de os compostos fenólicos estarem envolvidos na prevenção do stresse oxidativo, ou seja, na capacidade que têm de captar radicais livres, evitam desta forma as fases iniciais de propagação de cancro (Pereira *et al.*, 2009; Unekwu *et al.*, 2014). Além deste mecanismo, estes compostos possuem outras formas de atuação no desenvolvimento de células tumorais, assim sendo, sabe-se que interferem na regulação do metabolismo energético, na indução da apoptose celular, interferem também na proliferação das células cancerígenas, na prevenção da oxidação, na regulação do sistema imune do hospedeiro, na atividade anti-inflamatória e inibem e regulam enzimas e hormonas (Havsteen, 2002; García-Lafuente *et al.*, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2013).

Os extratos fenólicos de cogumelos têm também revelado grande potencial para inibição do crescimento celular de linhas celulares tumorais humanas. Liu *et al.* (2013) e Dziki *et al.* (2013) estudaram a interferência dos extratos de *Ramaria flava* (Pers. Ex Fr.) Gray e *Chenopodium quinoa* Willd, respetivamente, em linhas celulares tumorais. Cada espécie apresentou afinidades diferentes para cada uma das linhas testadas, sendo que o primeiro obteve ótimos resultados para a inibição de linhas cancerígenas da mama e o segundo foi mais eficaz na inibição de linhas tumorais da próstata. Outros autores como Santos *et al.* (2014), Vaz *et al.* (2010) e Vaz *et al.* (2012) estudam a capacidade de extratos de vários cogumelos como p. ex. *Suillus luteus* (L.: Fries) Gray e *Suillus collinitus* (Fr.) Kuntze na inibição de diferentes linhas celulares tumorais humanas, bem como os seus efeitos no ciclo celular e indução de apoptose.



### 1.1.3 Outras potencialidades

Os compostos presentes nos cogumelos apresentam outras funções para além das nomeadas anteriormente, destas destacam-se a função cardioprotetora (Guillamón *et al.*, 2010), antimicrobiana (Alves *et al.*, 2012; Anthony *et al.*, 2014; Ren *et al.*, 2014), antiviral (Piraino & Brandt, 1999; Gu *et al.*, 2007; Gong *et al.*, 2009) e anti-inflamatória (Moro *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2013; Gunawardena *et al.*, 2014). Desta forma os compostos bioativos dos cogumelos, mais especificamente os compostos fenólicos tornam-se interessantes para incorporação na dieta uma vez que apresentam vários benefícios para a saúde humana (Jayakumar *et al.*, 2011).

### 1.1.4 Espécies em estudo: *Suillus luteus* e *Coprinopsis atramentaria*

O Nordeste de Portugal, mais especificamente a região de Trás-os-Montes, é conhecido pela biodiversidade em cogumelos (macrofungos), assumindo um papel importante na sua produção e comercialização. Para a realização deste trabalho foram utilizadas duas espécies de cogumelos, nomeadamente *Suillus luteus* e *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo; algumas das informações sobre os mesmos encontram-se descritas na Tabela 1.2. Ambas as espécies são comestíveis.

**Tabela 1.2** - Informações relativas às espécies de cogumelos silvestres comestíveis em estudo.

Espécie	<i>Suillus luteus</i> (Sl)	<i>Coprinopsis atramentaria</i> (Ca)
Reino	Fungi	Fungi
Divisão	Basidiomycota	Basidiomycota
Classe	Agaricomycetes	Agaricomycetes
Ordem	Agaricales	Agaricales
Família	Suillaceae	Psathyrellaceae
Género	Suillus	Coprinopsis
Ano de colheita	2009	2010
Imagem		

A caracterização química do *Suillus luteus* e do *Coprinopsis atramentaria* foi já efetuada pelo grupo de investigação BioChemCore-CIMO. Segundo o documentado por Reis *et al.* (2011)., *Suillus luteus* revelou ter: ácido cinâmico (0,41 mg/100 g), ácidos fenólicos, dos quais: ácido protocatéquico (0,47 mg/100 g); vitaminas como o  $\alpha$ -tocoferol (19,14  $\mu$ g/100 g),  $\beta$ -tocoferol (15,34  $\mu$ g/100 g),  $\gamma$ -tocoferol (336,77  $\mu$ g/100 g),  $\delta$ -tocoferol (78,51  $\mu$ g/100 g) e ácido ascórbico (87,21 mg/100 g); açúcares como o manitol (1,29 g/100 g) e a trealose (1,35 g/100 g); ácidos gordos polinsaturados (52,75% destes 52,31% são referentes ao ácido linoleico), ácidos gordos monoinsaturados (32,93% dos quais 31,24% ácido oleico) e ácidos gordos saturados (14,32% dos quais 10,57% é representado pelo ácido palmítico). Os componentes químicos da espécie *Coprinopsis atramentaria* foram estudados por Heleno *et al.* (2012) e foram identificados o ácido cinâmico (1,70 mg/100 g), ácidos fenólicos

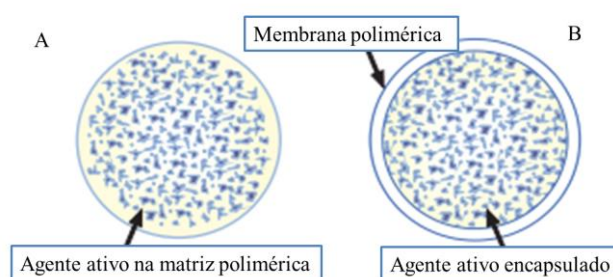
nomeadamente, o ácido *p*-hidroxibenzoico (4,71 mg/100 g), o ácido *p*-cumárico (0,82 mg/100 g); açúcares (concentração total 6,19 mg/100 g) entre os quais a trealose, açúcar mais abundante (5,35 mg/100 g); tocoferóis nomeadamente,  $\alpha$ -tocoferol (4  $\mu$ g/100 g),  $\beta$ -tocoferol (20,18  $\mu$ g/100 g),  $\gamma$ -tocoferol (52,66  $\mu$ g/100 g) e  $\delta$ -tocoferol (1,50  $\mu$ g/100 g); ácidos gordos polinsaturados (54,73% dos quais 46,69% são referentes ao ácido linoleico), monoinsaturados (31,71% sendo 30,65% de ácido oleico) e saturados (13,56% tendo o contributo de 11,11% de ácido palmítico). Todos os resultados são referentes a massa seca de cogumelo.

Estudos de bioatividade, nomeadamente antioxidante e antitumoral, foram também realizados pelo grupo de investigação. Os resultados são promissores, no entanto, até ao momento não foi ainda estudada a combinação de ambos os cogumelos em diferentes proporções e avaliadas as suas propriedades como antioxidante e antitumoral.

## 1.2 Microencapsulação

A técnica de microencapsulação surgiu há algumas décadas e continua a ser bastante utilizada tendo uma panóplia de aplicações (Suave *et al.*, 2006). Pode ser definida como um processo em que pequenas partículas de um sólido ou líquido são revestidas por um material de revestimento, proporcionando deste modo uma barreira física entre o composto do núcleo e outros componentes (Gharsallaoui *et al.*, 2007). A microencapsulação engloba um conjunto de técnicas que permitem o desenvolvimento de formulações, em que o seu conteúdo é protegido e a sua libertação pode ser modificada com o objetivo de atuar num determinado local, por um determinado período de tempo a uma velocidade específica (Champagne & Fustier, 2007; Brasileiro, 2011; Souza *et al.*, 2013).

A tipologia das micropartículas pode ser dividida em microcápsulas e microesferas. São denominadas de microcápsulas as partículas em que o núcleo está concentrado no centro e rodeado por uma camada de polímero de espessura variável (Figura 1.2 - B). Já as microesferas são partículas onde o princípio ativo é disperso na matriz polimérica (Figura 1.2 - A) (Ré, 1998; Fang & Bhandari, 2010).



**Figura 1.2** – A – Microesfera. B – Microcápsula. (Adaptado de: Suave *et al.* (2006)).

A tecnologia de microencapsulação tem sido utilizada em diversas indústrias, como por exemplo na agrícola, alimentar, de produtos domésticos, médica, gráfica e cosmética (Silva *et al.*, 2003). As principais razões para a sua utilização incluem (Ré, 1998; Fang & Bhandari, 2010; Murugesan & Orsat, 2012):

- Proteção do princípio ativo do meio envolvente (temperatura, radiação ultravioleta, interação com outros materiais, entre outros);
- Proteção de princípios ativos tóxicos de modo a ficarem mais seguros durante a sua utilização;

- Mascaram compostos de sabor e/ou odor desagradável;
- Reduzir a evaporação para o meio ambiente;
- Proporcionar a libertação controlada do princípio ativo.

O método ideal de microencapsulação deve ser simples, reproduzível, rápido e fácil de ser implementado a nível industrial. Deve ser pouco dependente das características de solubilidade do princípio ativo e polímero (Brasileiro, 2011).

Atualmente, a quantidade de métodos de microencapsulação patenteados ascende a várias centenas, e é previsível que o número aumente à medida que forem surgindo novos materiais encapsulantes e novos princípios ativos que requeiram processamentos específicos para a sua microencapsulação (Suave *et al.*, 2006). A escolha do método de encapsulação para uma aplicação específica depende de vários fatores, tais como: tamanho das partículas, propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede, aplicação do produto final, mecanismos desejados de libertação, escala de produção e custo (Azeredo, 2005).

A diferença básica entre os métodos existentes está na forma como o material encapsulante é depositado e/ou formado em torno do material ativo, visto que o processo pode ser de natureza física, química ou físico-química (Ré, 1998; Martins *et al.*, 2014). Alguns dos processos de microencapsulação encontram-se descritos na Tabela 1.3 divididos consoante a natureza do processo.

**Tabela 1.3** - Técnicas de síntese de micropartículas (Adaptado de: Ré (1998); Azeredo (2005); Suave *et al.* (2006)).

	<b>Método de encapsulação</b>
Método físico	<i>Spray drying</i> ; <i>spray cooling</i> ; liofilização; pulverização em banho térmico; co-cristalização; extrusão.
Método químico	Inclusão molecular; polimerização interfacial.
Método físico-químico	Coacervação; emulsificação seguida de evaporação do solvente; inclusão em lipossomas; pulverização em agente formador de reticulação.

Seguidamente será descrito o método de *spray drying* de forma mais pormenorizada uma vez que será o processo utilizado para a produção de micropartículas neste trabalho.

### **1.2.1 Método de encapsulação – *spray drying***

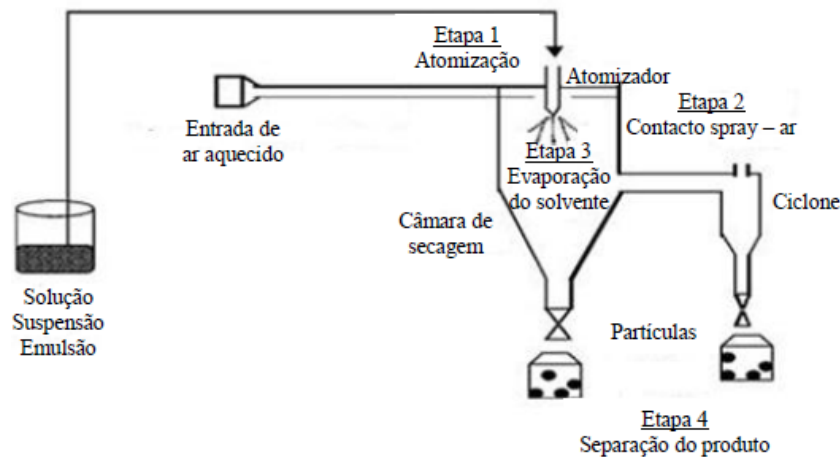
A encapsulação por *spray drying* é utilizada na indústria alimentar desde o final dos anos 1950 (Fang & Bhandari, 2010) tendo também um grande impacto de utilização na indústria farmacêutica (Ré, 1998). A técnica de *spray drying* é um método simples, rápido, contínuo, apresenta um baixo custo de processo e permite obter o produto final sem necessidade de efetuar lavagens para separar as micropartículas ou eliminar resíduos de solventes (Brasileiro, 2011). Produz partículas de boa qualidade (Estevinho *et al.*, 2013; Martins *et al.*, 2014) com baixa atividade em água e peso reduzido resultando numa maior facilidade de armazenamento e transporte (Murugesan & Orsat, 2012). O método de *spray drying* apresenta como principais limitações: o tipo de material encapsulante (deve possuir solubilidade em água num nível aceitável) (Ré, 1998; Gharsallaoui *et al.*, 2007; Fang & Bhandari, 2010; Estevinho *et al.*, 2013) e o facto de o equipamento ser volumoso e de dispendioso (Martins *et al.*, 2014).

A microencapsulação por *spray drying* é uma prática comum na engenharia sendo utilizada na indústria alimentar para assegurar uma estabilidade microbiológica, evitar riscos de degradação de químicos e/ou agentes biológicos e obter um produto com propriedades específicas, como p. ex.: a possibilidade de solubilidade instantânea (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

O método de microencapsulação por *spray drying* é uma operação unitária através da qual um produto líquido (solução de agente encapsulante e princípio ativo) é atomizado numa corrente de gás quente, o gás utilizado é geralmente ar ou mais raramente gás inerte como o azoto (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2013). Posteriormente ocorre evaporação do solvente, obtendo-se a rápida solidificação das gotículas.

Esta técnica baseia-se na bombagem da solução até ao atomizador onde é aspergida na forma de uma névoa de gotículas (*spray*) até à câmara de secagem. Neste compartimento ocorre a evaporação do solvente (secagem pelo ar quente). As gotas líquidas passam a partículas sólidas secas, que depois são recolhidas num ciclone ou noutro sistema de recolha de pó. A Figura 1.3 esquematiza o processo de

microencapsulação por *spray drying*. Assim, as principais etapas do processo são: (i) atomização, (ii) contacto das gotículas formadas com o ar quente, (iii) evaporação da água e/ou outro solvente (menos comum) e (iv) separação do produto seco do ar húmido (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Murugesan & Orsat, 2012).



**Figura 1.3** – Esquemática do processo de encapsulação por *spray drying*. (Adaptado de: Brasileiro, (2011)).

Neste processo, as temperaturas típicas do ar de entrada variam entre os 150 e os 220 °C, proporcionando uma evaporação rápida, sendo que na saída da câmara de secagem, a temperatura diminui para valores entre 50 a 90 °C. As micropartículas obtidas variam de acordo com as condições do processo e do polímero utilizado. Normalmente as mais pequenas variam entre os 10 e 50 µm e as partículas de maior dimensão rondam os 2 a 3 mm. No final do processo estas são separadas por um ciclone (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2013). A taxa do fluxo de alimentação, a pressão, o tipo de atomizador e a viscosidade do polímero são outros parâmetros que afetam as propriedades físico químicas do produto final (Tonon *et al.*, 2008; Murugesan & Orsat, 2012). O tempo de exposição das micropartículas às altas temperaturas ocorre por um curto período de tempo e a temperatura do núcleo geralmente não ultrapassa os 100 °C (Estevinho *et al.*, 2013), reduzindo deste modo a probabilidade de ocorrer alterações indesejáveis em compostos termossensíveis (Brasileiro, 2011).

## 1.2.2 Materiais de encapsulação

A escolha do agente de encapsulação é um fator importante neste processo uma vez que pode influenciar a eficiência de encapsulação e a estabilidade da micropartícula

(Gharsallaoui *et al.*, 2007). Os critérios para a seleção do material de encapsulação baseiam-se principalmente nas propriedades físico-químicas do princípio ativo (solubilidade) e do agente de encapsulação (viscosidade, propriedades mecânicas). A compatibilidade entre os dois, i.e., o princípio ativo não deve reagir com o material de encapsulação (Gharsallaoui *et al.*, 2007; Estevinho *et al.*, 2013). Por vezes são combinados dois tipos diferentes de materiais de encapsulação para superar algum inconveniente decorrente da utilização de apenas um deles.

Dos materiais mais usados em microencapsulação por *spray drying* destacam-se os hidratos de carbono (amido, maltodextrina, dextrose, xarope de milho), as gomas (goma arábica e alginato), e as proteínas (proteínas de leite e gelatinas) (Gharsallaoui *et al.*, 2007). Na Tabela 1.4 são apresentados alguns dos princípios ativos já encapsulados pelo processo de *spray drying* inclusive com diferentes materiais de revestimento.

**Tabela 1.4** – Exemplos de princípios ativos microencapsulados pela técnica de *spray drying*.

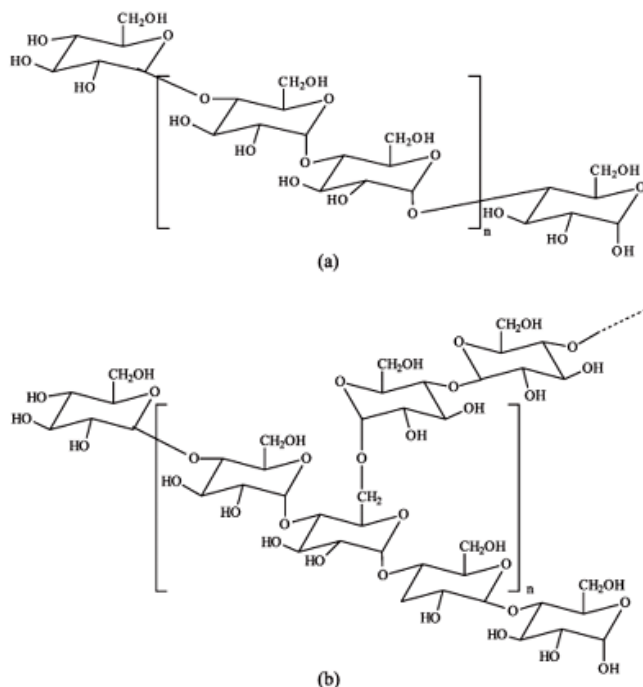
<b>Princípio ativo</b>	<b>Material de encapsulação</b>	<b>Referência</b>
Polpa cactus pear ( <i>Opuntia ficus-indica</i> )	Maltodextrina ou Inulina	(Saéñz <i>et al.</i> , 2009)
Batata doce	Maltodextrina e ácido ascórbico	(Ahmed <i>et al.</i> , 2010)
Eugenol	Quitossano	(Pereira, 2007)
Ácido $\alpha$ -lipóico	Quitossano	(Weerakody <i>et al.</i> , 2008)
Óleo de peixe	Amido e xarope de glicose	(Drusch <i>et al.</i> , 2006)
<i>L</i> -mentol	Goma arábica e amido modificado	(Soottitantawat <i>et al.</i> , 2005)

Não menos importante, o material escolhido para a encapsulação deve ser atóxico e, idealmente biocompatível. Estando estas características asseguradas, as partículas produzidas com estes polímeros são toleradas no organismo humano.

### 1.2.3 Material encapsulante - Maltodextrina

O amido é uma fonte importante de hidratos de carbono na alimentação humana e pode ser encontrado em tecidos e órgãos vegetais como folhas, raízes, frutas, entre outras (Garti, 2008; Recife, 2013), encontram-se na forma de grânulos dentro das células destas plantas (Recife, 2013). O amido é formado por dois polissacarídeos: amilose e amilopectina, estas estruturas podem ser visualizadas na Figura 1.4 (Carvalho *et al.*, 2005; Garti, 2008). A amilose apresenta uma estrutura linear enquanto a amilopectina

uma estrutura ramificada, ambos são formados por unidades de glicose e unidos por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4), no entanto a amilopectina apresenta também ligações  $\alpha$  (1-6) dando origem às ramificações (Garti, 2008).



**Figura 1.4** - Estruturas químicas individuais do amido. A) – Amilose e B) – Amilopectina. (Carvalho *et al.*, 2005)).

O amido é sujeito a modificações com o intuito de melhorar as suas características e aumentar a sua utilidade para aplicações industriais (BeMiller & Lafayette, 1997; Murugesan & Orsat, 2012). Assim, conseguem-se obter produtos menos viscosos, mais estáveis, resistentes e solúveis (Recife, 2013).

A maltodextrina é um dos principais produtos obtidos pela modificação do amido e é o principal agente encapsulante utilizado na área alimentar (Saénz *et al.*, 2009). É obtida a partir da hidrólise ácida ou enzimática (enzima responsável:  $\alpha$ -amilase) de vários amidos. Estruturalmente, a maltodextrina é composta por moléculas de glicose associadas entre si por ligações glicosídicas  $\alpha$  (1-4), como apresentado na Figura 1.5 e são classificadas pelo seu grau de hidrólise, expresso em equivalentes de dextrose (DE). Os DE representam a percentagem de açúcares redutores calculados como glicose em relação ao peso seco de amido (Madene *et al.*, 2006).

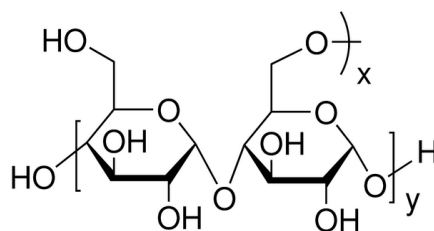


Figura 1.5 - Representação da maltodextrina.

O aumento do grau de dextrose significa um aumento da barreira ao oxigênio e portanto, um aumento à estabilidade oxidativa (Ozoemena *et al.*, 2004; Muller, 2011). No entanto, as maltodextrinas mais utilizadas são aquelas com DE menor que 20, uma vez que são menos higroscópicas evitando a aglomeração das partículas (Muller, 2011).

De uma forma geral a maltodextrina possui alta solubilidade em água, baixa viscosidade, é incolor, tem sabor suave e baixo custo, tornando-se um polímero com uma vasta utilização na indústria alimentar (Ersus & Yurdagel, 2007; Saéñz *et al.*, 2009). Pode aumentar de forma considerável a solubilidade dos princípios ativos encapsulados e facilita a incorporação destes como aditivos alimentares (Sousdaleff *et al.*, 2013; Ferrari *et al.*, 2013).

As maltodextrinas têm tido uma ampla aplicação em encapsulados na área alimentar sobretudo devido à boa proteção que conferem ao oxigênio (Ersus & Yurdagel, 2007; Gharsallaoui *et al.*, 2007). Na literatura encontra-se um vasto conjunto de trabalhos que desenvolveram microencapsulados de maltodextrina. Maioritariamente a maltodextrina foi utilizada para encapsular princípios ativos de origem natural com grande instabilidade principalmente a fontes de oxigênio. Saéñz *et al.* (2009) encapsulou o extrato de *Opuntia ficus-indica* (cactus pear), Quek *et al.* (2007) encapsulou sumo de melancia e Ersus & Yurdagel (2007) e Tonon *et al.* (2008) encapsularam, respetivamente, antocianinas de cenoura preta e de açáí.

Contudo, o uso de maltodextrina não se resume somente à área da microencapsulação, podendo ser utilizada também nas áreas farmacêuticas e nutricional. Sendo a maltodextrina um hidrato de carbono pode ser utilizada como um suplemento para melhor desempenho atlético proporcionando melhor condição física, melhores reflexos e acuidade mental (Costa, 2012). O seu valor nutricional encontra-se representado na Tabela 1.5.

**Tabela 1.5** – Dados nutricionais referentes a uma maltodextrina comercial (Costa, 2012).

<b>Dados Nutricionais</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gordura</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Hidratos de carbono</b>	<b>Calorias/100g</b>
	0,1%	0,1%	0,4%	86,8%	378%

A maltodextrina é usada com frequência para nutrição via sonda uma vez que é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal (Webwer & Ehrlein, 1998). Estas preparações destinadas a suplementos dietéticos tem baixo teor de eletrólitos e são livres de açúcares como frutose, galactose, lactose e sacarose. Estas propriedades fazem com que as preparações sejam indicadas como suplemento alimentar em algumas doenças gastrointestinais, disfunções hepáticas e renais (Costa, 2012).

Na área farmacêutica a maltodextrina é também utilizada como excipiente farmacêutico por apresentar propriedades como aglomerante, retentor de humidade e agente aglutinante.

#### **1.2.4 Microencapsulação de compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos estão presentes em vários alimentos de origem natural (Ré, 1998; Silva *et al.*, 2003), conferindo por vezes características como sabor amargo, cor e odor. Porém, estes compostos acarretam benefícios para a saúde, destacando-se em particular as suas propriedades antioxidantes e antitumorais.

A maioria dos compostos fenólicos apresentam características que limitam a sua bioatividade quando incluídos nos alimentos de forma livre (Crozier *et al.*, 2009). Assim, apenas uma pequena proporção das moléculas permanecem disponíveis após administração oral, devido à baixa permeabilidade ou solubilidade no intestino bem como a sua instabilidade sob condições adversas (enzimas, presença de outros nutrientes) que podem limitar o seu potencial (Fang & Bhandari, 2010).

O processo de microencapsulação surge como possível alternativa às limitações apresentadas por estas substâncias, permitindo ultrapassar a sua instabilidade e aumentar o tempo de meia-vida no organismo (Ersus & Yurdagel, 2007; Fang & Bhandari, 2010). Este processo permite a proteção do princípio ativo mantendo a bioatividade destes compostos que de outro modo não seria possível (Ersus & Yurdagel, 2007; Fang & Bhandari, 2010; Murugesan & Orsat, 2012). Na Tabela 1.6 encontram-se

descritos alguns trabalhos realizados na área de microencapsulação pela técnica de *spray drying* de compostos ricos em fontes de polifenóis.

**Tabela 1.6** – Microencapsulação por *spray drying* aplicada em extratos naturais.

<b>Princípio ativo</b>	<b>Tipo de extração</b>	<b>Material de encapsulação</b>	<b>Referência</b>
Cenoura preta ( <i>Daucus carota L.</i> )	Etanólico	Maltodextrina	(Ersus & Yurdagel, 2007)
Folha de oliveira	n.d.	Quitosano	(Kosaraju <i>et al.</i> , 2006)
<i>Opuntia ficus-indica</i>	Etanólico	Maltodextrina/ Inulina	(Saéñz <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lippia sidoides</i>	Etanólico	Maltodextrina/ goma arábica	(Fernandes <i>et al.</i> , 2012)
<i>Momordica cachinchinensis</i>	Aquoso	Maltodextrina	(Kha <i>et al.</i> , 2010)
<i>Morindacitrifolia e Beta vulgaris</i>	Acetato de etilo	Maltodextrina	(Krishnaiah <i>et al.</i> , 2012)

n.d. – não definido no artigo consultado.

O produto obtido após encapsulação permite ultrapassar problemas de oxidação que estes compostos revelam ter, tornando-os mais estáveis (Zeller *et al.*, 1999; Krishnaiah *et al.*, 2012) e ainda mascarar o gosto e odor desagradável, facilitando deste modo a introdução em produtos alimentares (Krishnaiah *et al.*, 2012).

De uma forma geral, mediante um processo de microencapsulação, é possível revestir um ou mais ingredientes ou aditivos (núcleo) com um agente encapsulante de natureza comestível, tendo como finalidade modificar, melhorar a aparência e as propriedades de uma substância (Zeller *et al.*, 1999; Brasileiro, 2011).

### 1.2.5 Incorporação em alimentos

Nos últimos anos, têm-se colocado desafios significativos nos conceitos tradicionais de nutrição. De facto, a noção clássica de “alimentação adequada”, isto é, uma dieta que fornece nutrientes em quantidades suficientes para satisfazer as necessidades orgânicas específicas, está a ser gradualmente substituída pelo conceito de “nutrição ideal”. Este

conceito engloba componentes alimentares com potencial de promover a saúde, melhorar o bem-estar e reduzir o risco de desenvolvimento de doenças crônicas (Hathwar *et al.*, 2012; Ramalingum & Mahomoodally, 2014).

A saúde está na vanguarda da investigação científica impulsionando o desenvolvimento de novos alimentos enriquecidos com compostos naturais que tragam benefícios para os consumidores (Ramalingum & Mahomoodally, 2014). Neste contexto, juntam-se as vantagens dos extratos naturais com as vantagens das técnicas de encapsulação, criando produtos capazes de serem incorporados mais facilmente em matrizes alimentares. Estudos recentes realizados por Çam *et al.* (2014), Ezhilarasai *et al.* (2013) e Martins *et al.* (2014) relevam bons resultados a este nível. Nestes trabalhos, a microencapsulação foi realizada com matrizes naturais e não tóxicas, sendo utilizados, respetivamente, extratos de *Punica granatum* Lineu (fruto), *Garcinia cowa* Roxb (fruto) e *Rubus ulmifolius* Schott (flor). No final, cada produto microencapsulado foi incorporado em diferentes alimentos, respetivamente em gelado, pão e iogurte.

A incorporação dos extratos em alimentos possibilita o desenvolvimento dos denominados “alimentos funcionais”, que não se limitam apenas a satisfazer as necessidades do organismo mas também fornecem compostos bioativos que ajudam a diminuir certas doenças, principalmente as que podem advir de uma má alimentação (Siró *et al.*, 2008; Ramalingum & Mahomoodally, 2014).

## ***2 Materiais e Métodos***

### **2.1 Avaliação da atividade antioxidante**

O padrão utilizado nos ensaios da atividade antioxidante foi o trolox que foi adquirido na Sigma. O DPPH foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) foi adquirida na Sigma. Todos os outros produtos químicos e solventes eram de grau analítico e foram adquiridos a partir de fornecedores comuns.

#### **2.1.1 Preparação dos extratos metanólicos**

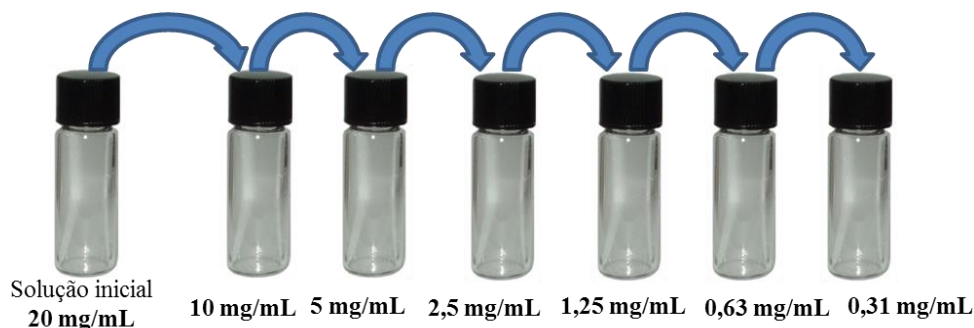
Os extratos metanólicos foram preparados a partir de amostras de cogumelos liofilizadas. A informação dos cogumelos utilizados encontra-se descrita no Tabela 1.2 do Capítulo 1. Teve-se como objetivo efetuar o estudo dos cogumelos individualmente assim como da sua mistura em diferentes proporções. Para a realização do trabalho foram utilizadas misturas de três proporções diferentes sendo elas denominadas ao longo do trabalho de: Sl:Ca(1:1), Sl:Ca(1:2) e Sl:Ca(2:1), assim Sl designa a espécie *Suillus luteus*, Ca a espécie *Coprinopsis atramentaria* e o valor numérico define a proporção em massa em que eles foram combinados. Cada amostra utilizada na extração fez sempre um total de 1,5 g. Na Tabela 2.1 encontram-se as massas de amostra necessárias para a preparação dos extratos metanólicos.

**Tabela 2.1** – Massa de cogumelos utilizada para a preparação dos extratos metanólicos.

Amostra	Individual		Mistura					
	Sl	Ca	Sl:Ca(1:1)		Sl:Ca(1:2)		Sl:Ca(2:1)	
			Sl	Ca	Sl	Ca	Sl	Ca
Massa [g]	1,5	1,5	0,75	0,75	0,5	1	1	0,5

Posteriormente foram adicionados 30 mL de metanol de forma a efetuar uma extração sólido-líquido sob agitação durante 1h. Seguiu-se uma filtração com papel Whatman nº4. O resíduo sólido obtido foi re-extraído sob as mesmas condições. Após a combinação dos filtrados procedeu-se à evaporação do metanol no evaporador rotativo (Büchi R-210) a 40 °C até *secura total*. Cada extrato obtido foi redissolvido em metanol de forma a obter uma solução inicial com concentração conhecida de 20 mg/mL.

A partir da solução inicial foram preparadas várias soluções com concentrações diferentes através do método das diluições sucessivas. Na Figura 2.1 podem observar-se as diluições efetuadas. As soluções diluídas foram utilizadas na realização do estudo da atividade antioxidante.



**Figura 2.1** – Demonstração das diluições efetuadas.

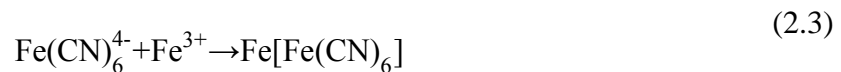
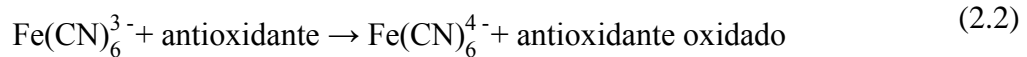
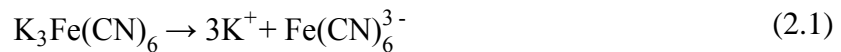
Para avaliação da atividade antioxidante recorreu-se a três ensaios *in vitro* diferentes, sendo eles denominados de poder redutor, efeito captador de radicais livres, inibição da descoloração do β-caroteno. Adicionalmente foi feita a determinação dos fenóis totais. Seguidamente será realizada, mais detalhadamente, uma descrição de cada método.

## 2.1.2 Métodos para a avaliação da atividade antioxidante e fenóis totais

### 2.1.2.1 Poder redutor

#### 2.1.2.1.1 Fundamento teórico

Este tipo de ensaio tem como intuito medir a capacidade dos antioxidantes, presentes nos cogumelos, reduzirem o complexo Fe(III)/ferricianeto [ $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ] a Fe(II), forma ferrosa. Deste modo, dependendo do poder redutor dos compostos, a cor amarela da solução do ensaio altera-se para os tons de azul, e pode ser medida espectrofotometricamente a 690 nm (Reis *et al.*, 2011). A reação da redução pode ser expressa pelas seguintes equações:



#### 2.1.2.1.2 Procedimento

O procedimento adotado em laboratório encontra-se descrito na Figura 2.2.

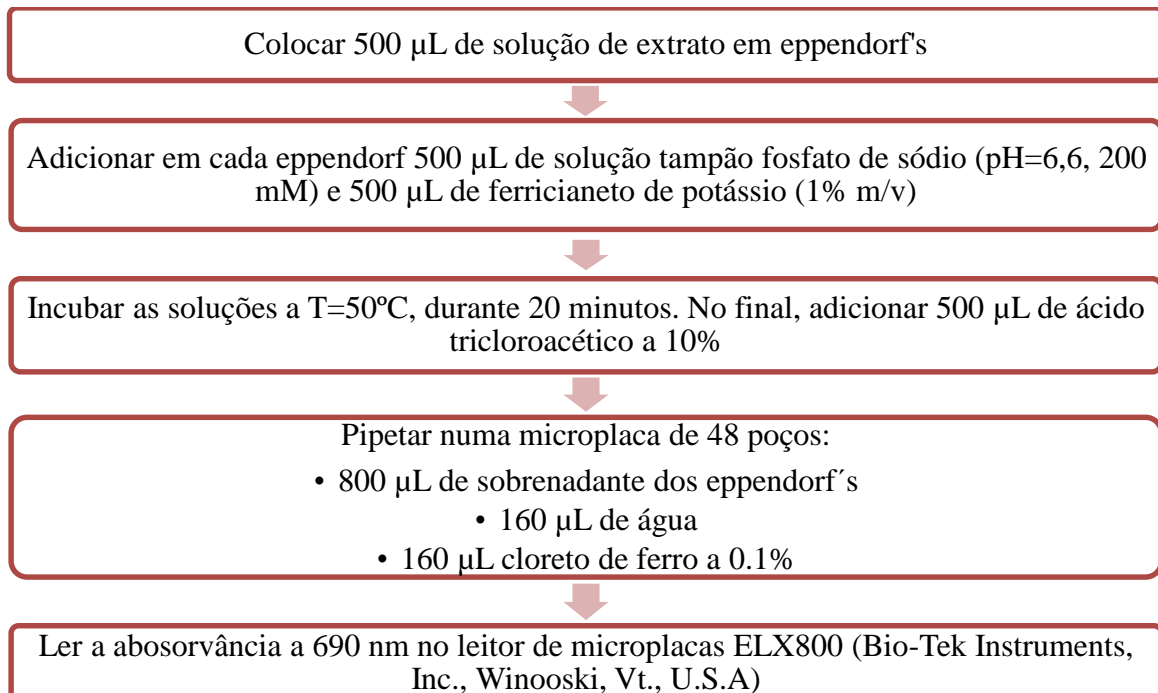


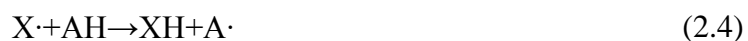
Figura 2.2 – Metodologia para poder redutor.

A concentração de extrato correspondente a uma absorvância de 0,5 (EC<sub>50</sub>) foi calculada por interpolação gráfica dos valores de absorvância em função da concentração de extrato. O padrão utilizado foi o trolox.

### 2.1.2.2 Efeito captador de radicais livres - DPPH

#### 2.1.2.2.1 Fundamento teórico

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) é um radical de azoto estável que apresenta uma cor púrpura intensa e reage a compostos que podem doar um átomo de hidrogénio, tornando-o amarelo pálido, como representado na Figura 2.3 (Zahra *et al.*, 2007; Pereira, 2011). A reação pode ser representada pela seguinte equação:



Onde, X $\cdot$  representa o radical DPPH e AH representa os antioxidantes presentes nos cogumelos. O radical DPPH reage facilmente com compostos que têm a capacidade de doar um átomo de hidrogénio, ficando reduzido e descolorado; deste modo a sua absorvância a 515 nm decresce (Reis *et al.*, 2011; Zahra *et al.*, 2007).

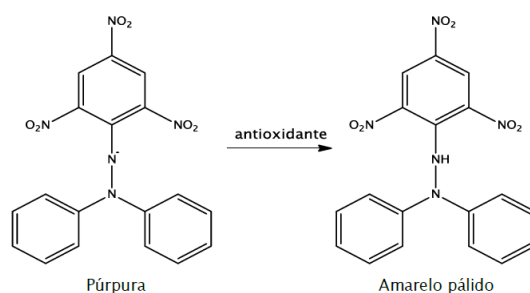


Figura 2.3 – Redução do DPPH (Pereira, 2011).

#### 2.1.2.2.2 Procedimento

Todo procedimento adotado na realização do ensaio está descrito na Figura 2.4.

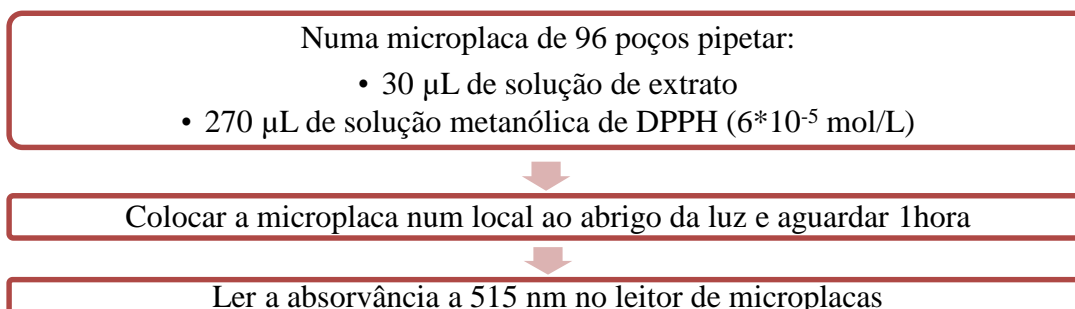


Figura 2.4 – Procedimento no efeito captador de radicais livres.

A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada com a percentagem de descoloração de DPPH utilizando a equação:

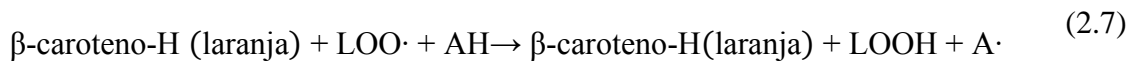
$$\% \text{ ACR} = [(A_{\text{DPPH}} - A_S) / A_{\text{DPPH}}] \times 100 \quad (2.5)$$

Onde  $A_S$  corresponde à absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e  $A_{\text{DPPH}}$  à absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato correspondente a 50% de atividade captadora de radicais ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir da representação gráfica da %ACR em função da concentração de extrato. O padrão utilizado foi o trolox (Reis *et al.*, 2011; Heleno *et al.*, 2012).

### 2.1.2.3 Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno

#### 2.1.2.3.1 Fundamento teórico

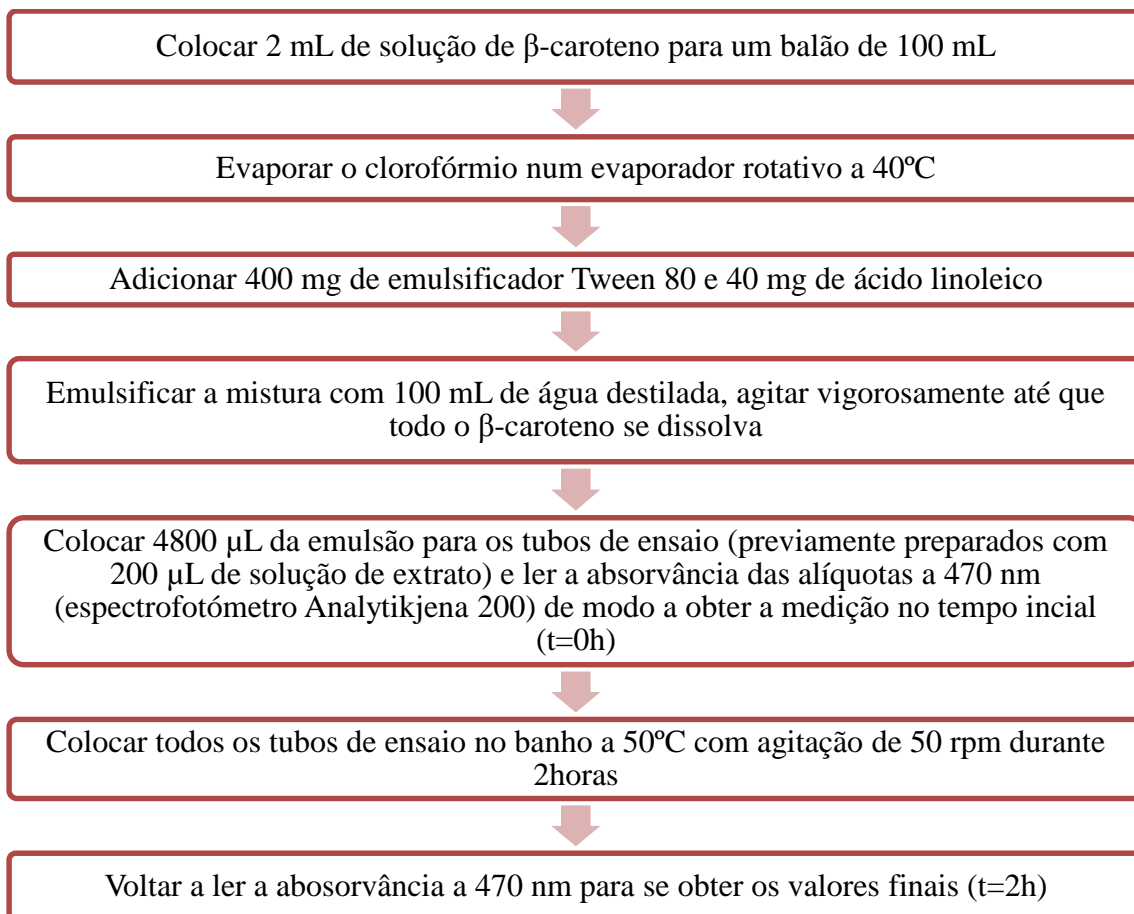
O ensaio da inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno baseia-se em medições espectrofotométricas da descoloração do  $\beta$ -caroteno, avaliando desta forma a capacidade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. As reações que envolvem o ensaio podem ser descritas pelas seguintes equações:



Onde  $\text{LOO}\cdot$  representa o radical livre linoleato. Neste ensaio, está envolvido o mecanismo da descoloração dos carotenoides através de oxidação térmica, que pode ser diminuída pela ação dos antioxidantes presentes nas amostras (Amarowicz *et al.*, 2004). Assim sendo, quanto maior a quantidade de antioxidantes presentes nos extratos menor será a descoloração do  $\beta$ -caroteno.

#### 2.1.2.3.2 Procedimento

Todo o procedimento prático realizado em laboratório encontra-se descrito na Figura 2.5.



**Figura 2.5** – Procedimento a realizar para os ensaios da inibição da descoloração do β-caroteno.

A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$[(A_{t=2h}/A_{t=0h}) \times 100] \quad (2.8)$$

A concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante ( $EC_{50}$ ) foi calculada por interpolação gráfica da percentagem de inibição da descoloração do β-caroteno em função da concentração de extrato (Heleno *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2011). O padrão utilizado foi novamente o trolox.

#### **2.1.2.4 Determinação dos fenóis totais**

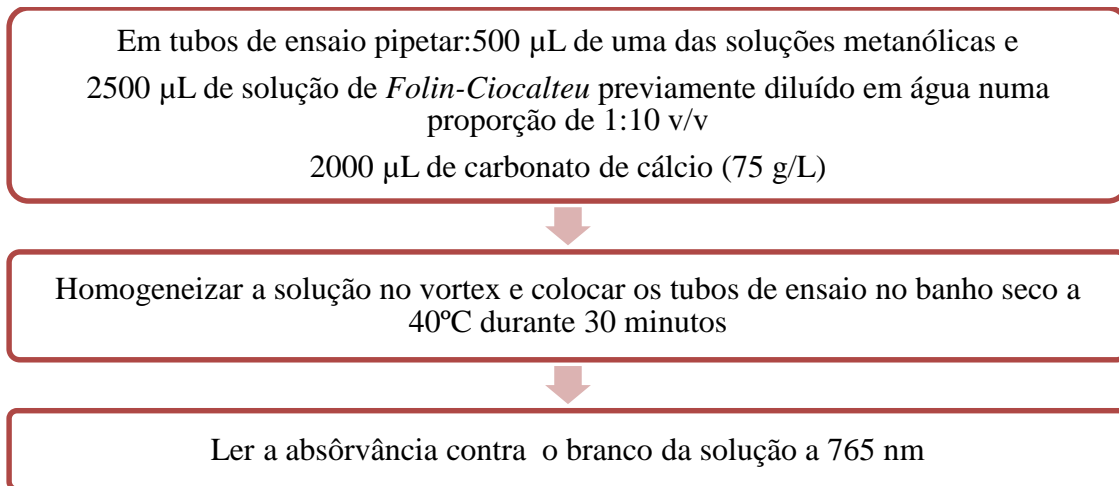
##### **2.1.2.4.1 Fundamento teórico**

A quantidade de fenóis totais presentes numa amostra pode ser determinada através do método colorimétrico *Folin-Ciocalteu*. Este método é bastante utilizado na prática laboratorial, no entanto sofre algumas interferências devido ao reagente ser uma mistura de ácido fosfotúngstico e ácido fosfomolibdico que reage tanto com compostos fenólicos como os compostos redutores não fenólicos como o ácido ascórbico, açúcares

e aminoácidos; deste modo, obtêm-se resultados falsos positivos, ou seja, é realizada uma avaliação excessiva de compostos fenólicos (Heleno *et al.*, 2010).

#### 2.1.2.4.2 Procedimento

Todo o procedimento realizado encontra-se descrito através da Figura 2.6.



**Figura 2.6** – Procedimento para o ensaio de determinação de fenóis totais.

Utilizou-se o ácido gálico na determinação da curva-padrão, e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

Seguidamente será descrito o processo da atividade antitumoral testado *in vitro* para os extratos individuais e respetivas combinações.

### 2.1.3 Avaliação da atividade antitumoral – SRB

A avaliação da atividade antitumoral foi realizada de acordo com o método da sulforrodamina B (SRB). Trata-se de um ensaio colorimétrico usado para a determinação da densidade celular baseado na medição do conteúdo proteico das células.

#### 2.1.3.1 Ensaio da sulforrodamina B

##### 2.1.3.1.1 Fundamento teórico

O ensaio da sulforrodamina B foi desenvolvido em 1990 e tem sido largamente utilizado para a avaliação da citotoxicidade celular (Vichai & Kirtikara, 2006). A SRB é uma aminoxantina de cor rosa forte e possui na sua constituição dois grupos sulfônicos. O ensaio baseia-se na capacidade da SRB estabelecer uma ligação aos componentes

proteicos da célula (em condições moderadamente ácidas) através dos grupos sulfônicos (Skehan *et al.*, 1990). No entanto, antes das células serem coradas têm de ser fixadas na placa de cultura e, para tal, é utilizado o ácido tricloroacético (TCA); tendo por finalidade a fixação das células em monocamada na base da placa.

A ligação da SRB é estequiométrica e a quantidade de corante extraído das células pigmentadas é diretamente proporcional à massa total de proteína e, portanto, correlacionada com o número de células (Vichai & Kirtikara, 2006; Skehan *et al.*, 1990).

#### 2.1.3.1.2 Procedimento

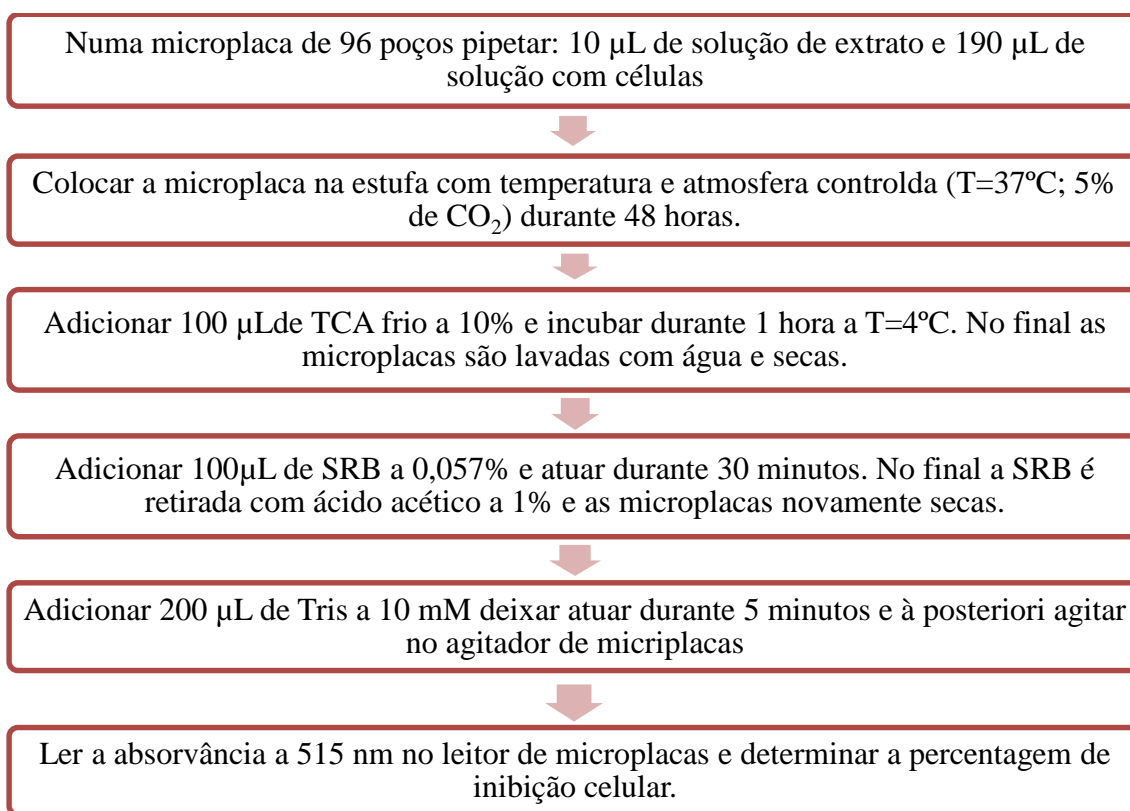
As células utilizadas para a realização do estudo são quatro linhas celulares tumorais humanas denominadas por: MCF7 (cancro de mama), HCT15 (cancro do colón), HeLa (cancro de cervical) e HepG2 (cancro de fígado). As células são mantidas em culturas aderentes em meio RPMI contendo 10% de soro fetal de bovino (FBS) inativado pelo calor para o caso das células MCF7 e HCT15, ou em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e de estreptomicina (100 mg/mL) para as HeLa e HepG2. Todas as linhagens são mantidas a 37°C numa incubadora de ar humidificado contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Para o estudo da avaliação da atividade antitumoral são inicialmente preparadas, numa microplaca de 96 poços, as concentrações do extrato a utilizar. São realizadas 5 diluições sucessivas de 1:4 a partir de uma solução do extrato em água numa concentração de 8 mg/mL.

Para a preparação das células, começou-se por remover o meio de suspensão do interior da caixa onde crescem previamente e, de seguida, realizou-se a lavagem das células com uma solução salina, HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*). Adicionou-se a enzima triplex depois de ser retirado todo o HBSS. A caixa com a enzima foi posta a incubar durante três minutos numa estufa com temperatura de 37°C; deste modo a enzima atua nas proteínas celulares fazendo com que as células fiquem em suspensão. Quando a maioria das células estava suspensa, acrescentou-se meio de cultura para que a enzima deixasse de atuar. A suspensão foi transferida para um tubo de *falcon* e centrifugada a 1200 rpm durante 5 minutos. Após a centrifugação, retirou-se todo o meio de modo a ficar apenas o depósito celular no fundo. Finalmente, acrescentou-se meio novo e agitou-se levemente para se obter uma suspensão homogénea. Desta

suspensão foi retirada uma alíquota (75  $\mu\text{L}$ ) para um *ependorf* onde, para perfazer uma mistura de 1:1, se juntou 75  $\mu\text{L}$  de azul tripano a 0,4%. Após a homogeneização foram colocadas duas gotas na câmara de Neubauer para ser realizada a contagem de células ao microscópio. O corante azul tripano cora as células não viáveis fazendo com que, no processo de contagem, estas não sejam incluídas como sendo viáveis. Depois de serem realizados os cálculos sabe-se qual o número de células viáveis existentes por mL, com isto, fica conhecido qual o volume de meio e de suspensão que é necessário para se ter uma solução que contenha aproximadamente 50000 células/mL.

Na Figura 2.7 encontra-se descrito o restante procedimento para a realização do ensaio.



**Figura 2.7** – Procedimento adotado na realização da atividade antitumoral.

Os resultados foram expressos em valores de  $\text{GI}_{50}$  (concentração que inibe 50% do crescimento celular). Como controlo positivo foi utilizada a elipticina.

## 2.2 Microencapsulação dos extratos

O polímero utilizado para efeitos de microencapsulação foi a maltodextrina (MD) com  $\text{DE}=18$  fornecida pela Cargill®.

### 2.2.1 Processo de encapsulação

O processo de encapsulação adotado para a realização deste trabalho teve por base as condições utilizadas por Wu *et al.* (2014) com algumas modificações. Assim, as microesferas foram produzidas com maltodextrina (MD) a 20% (m/v, g/ml) numa solução de etanol:água (10:90), perfazendo-se uma relação entre massa de extrato e massa de MD de 1:20 (m/m, g/g).

Em primeiro lugar dissolveu-se o extrato de cogumelo no etanol, uma vez que facilitava o processo de dissolução do mesmo, seguidamente, foi colocado sob agitação magnética e adicionou-se a água destilada até que o volume final fosse estabelecido. No final, foi acrescentada a MD ficando a solução sob agitação até ficar perfeitamente homogénea. Nestas condições, a solução continha um teor de sólidos de 21%. Foram preparadas quatro soluções para produção de microesferas (Mic):

- Microesferas sem princípio ativo (placebo)
- Microesferas de *Suillus luteus* (Mic SI)
- Microesferas de *Coprinopsis atramentaria* (Mic Ca)
- Microesferas da combinação de ambos os cogumelos (Mic SI:Ca (1:1))

A atomização da solução foi realizada num Büchi mini *spray dryer* B290 com as seguintes condições:

- Temperatura de entrada: 170°C
- Temperatura de saída: 95°C
- Aspiração: 90%
- Caudal de alimentação (*pump*): 20% (6 mL/min)

O equipamento Büchi mini *spray dryer* B290 encontra-se instalado no LSRE-FEUP, e pode ser visualizado na Figura 2.8, estava ainda acoplado a um condensador de solventes orgânicos uma vez que a solução a ser atomizada continha etanol. O *nozzle* com diâmetro de 0,7 mm foi alimentado com uma corrente de gás inerte (azoto).

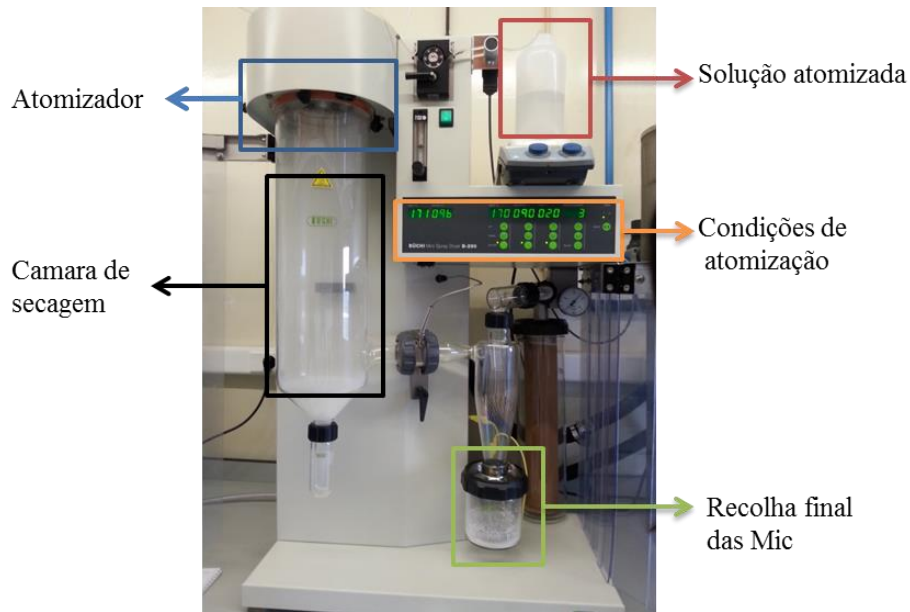


Figura 2.8 – Büchi mini spray dryer B290.

De forma simplificada, na Figura 2.9 encontra-se esquematizado o processo geral da produção das Mic. No final, os pós das microesferas foram recolhidos e armazenados no frigorífico para análise posterior.

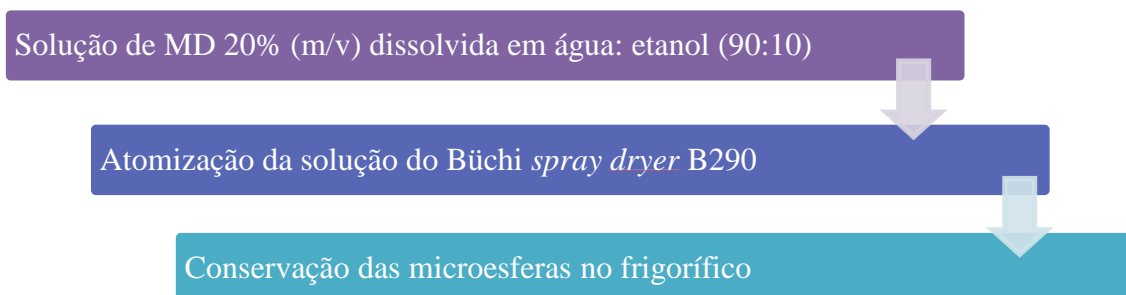


Figura 2.9 – Esquemática do processo de encapsulação.

Seguidamente serão descritas as metodologias utilizadas para a caracterização das Mic.

## 2.2.2 Caracterização das microesferas

### 2.2.2.1 Rendimento de encapsulação

O rendimento de encapsulação foi determinado, em percentagem, como o rácio entre a massa das microesferas obtidas no final do processo e a massa de sólidos teóricos existentes na solução a ser atomizada, ou seja, maltodextrina e princípio ativo.

### 2.2.2.2 Eficiência de encapsulação

Para a determinação da eficiência de encapsulação recorreu-se à quantificação do ácido cinâmico por HPLC, conforme descrito no ponto 2.2.2.5. Optou-se por calcular a eficiência de encapsulação em termos do ácido cinâmico pelo facto deste ser o composto maioritário e não ter interferência da maltodextrina utilizada como matriz. A eficiência de encapsulação (EE) foi determinada como o rácio entre a quantidade de ácido cinâmico presente nas Mic (valor experimental) e o respetivo valor teórico de acordo com a seguinte equação:

$$EE(\%) = \frac{\text{Ácido cinâmico Mic - Exp}}{\text{Ácido cinâmico Mic - Teórico}} \times 100 \quad (2.9)$$

### 2.2.2.3 Microscopia eletrónica de varrimento - MEV

A morfologia da superfície e o tamanho das microesferas foram determinados por microscopia eletrónica de varrimento (MEV) (Phenom G2 Pro microscope e Phenom-World, Eindhoven, The Netherlands) existente no LSRE-FEUP.

### 2.2.2.4 Análise por FTIR

A presença de princípio ativo nas Mic produzidas foi verificada por intermédio de análise de espectroscopia de infravermelhos (FTIR). O espectrofotómetro utilizado foi FTIR Bomen (MB 104). As amostras analisadas foram as Mic produzidas, os extratos de cogumelo bem como o polímero na sua forma pura. Utilizou-se a técnica da pastilha de KBr, sendo estas preparadas com uma concentração de 8% (8 mg de amostra e 100 mg de KBr). A leitura foi realizada para a uma gama de frequências compreendida entre 650 e 4000  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando 32 varrimentos.

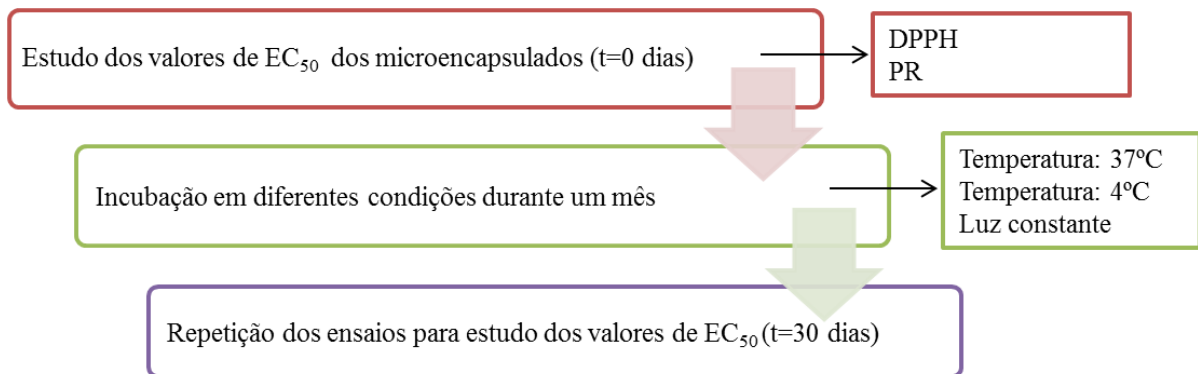
### 2.2.2.5 Análise por HPLC

A análise por HPLC foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Shimadzu 20<sup>a</sup> (UFLC, Shimadzu Cooperation, Kyoto, Japan). A separação foi alcançada numa coluna C18 (5  $\mu\text{m}$ , 150 mm  $\times$  4.6 mm i.d) de fase reversa AQUA<sup>®</sup> (Phenomenex) termostatizada a 35°C. Os solventes usados foram: (A) 0,1% ácido fórmico em água, (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição foi estabelecido com 10% B a 15% B ao longo de 5 min, 15-25% B durante 5 min, 25-35% B durante 10 min, isocrático a 10% de B durante 10 min; a coluna foi reequilibrada com um caudal de 0,5 mL/min. A deteção foi realizada num detetor *array* de fotodíodos (PDA), utilizando

como preferencial o comprimento de onda de 280 nm. O composto fenólico selecionado para o cálculo da eficiência foi caracterizado de acordo com o espectro de UV e tempo de retenção quando comparado com o padrão comercial. Para a análise quantitativa, a curva de calibração foi obtida por injeção de concentrações conhecidas (0,3 a 12,5 µg/mL) de ácido cinâmico ( $y=972179x+174853$ ;  $R^2=0,9993$ ). Os resultados são expressos em µg por mg de extrato.

### 2.2.2.6 Estudo da estabilidade das microesferas

O estudo da estabilidade teve por base os trabalhos efetuados por Wu *et al.* (2014) e Saézn *et al.* (2009), nos quais as microesferas foram acondicionadas em condições pré-selecionadas. Neste trabalho, o estudo da estabilidade encontra-se descrito na Figura 2.10.



**Figura 2.10** – Principais parâmetros do estudo da estabilidade das Mic.

A finalidade deste estudo foi avaliar qual o efeito na atividade antioxidante depois das amostras terem permanecido expostas durante um mês nas seguintes condições: (i) Temperatura de 4° C (acondicionamento em frigorífico); (ii) Temperatura de 37 °C (acondicionamento em estufa) e (iii) Luz constante (acondicionamento em sala climatizada). A atividade antioxidante foi avaliada pelos ensaios efeito captador de radicais livres -DPPH e poder redutor (PR).

## 2.3 Incorporação na matriz alimentar

As microesferas e o extrato livre foram incorporados em requeijões produzidos pela empresa Queijos Casa Matias, Lda. – Seia, Serra da Estrela, no âmbito do projeto PRODER intitulado por “PlantLact: New functional lactic products without synthetic

conservativos”. Para este estudo foram utilizadas as microesferas que continham no seu interior a mistura do extrato de *S. luteus* e *C. atramentaria* nas mesmas proporções (Mic SI:Ca (1:1)).

Para este estudo foram produzidos 6 requeijões sendo eles: (i) dois requeijões simples (controlo), (ii) dois requeijões com incorporação de extrato livre (80 mg de extrato/requeijão; 40 mg de cada extrato) e (iii) dois requeijões com microesferas (3 g de microesferas/requeijão). A quantidade microesferas adicionadas em (iii) foi selecionada tendo em conta que a quantidade de princípio ativo presente em 3 g de microesferas deveria ser equivalente à quantidade de princípio ativo livre utilizada em (ii).

Os requeijões produzidos possuíam em média 100 g cada, assim, após a incorporação do extrato livre ou encapsulado, a concentração foi de 0,8 mg de extrato por g de requeijão.

Para as amostras preparadas anteriormente foram realizadas análises em dois tempos distintos, nomeadamente: tempo inicial ( $t=0$ ), ou seja, imediatamente após a incorporação dos extratos e das microesferas e após 7 dias ( $t=7$ ). Durante o período de uma semana os requeijões foram acondicionados à temperatura de 4 °C (no frigorífico). A análise da cor dos requeijões foi efetuada ainda na forma fresca. Posteriormente, as amostras foram liofilizadas para determinação do valor nutricional e da atividade antioxidante; esta foi avaliada por dois métodos: efeito captador de radicais livres - DPPH e poder redutor (PR). As extrações foram realizadas com 3 g de requeijão liofilizado e todo o restante processo foi igual ao utilizado para a extração dos cogumelos liofilizados, descrito no capítulo 2.1.1.

### **2.3.1 Avaliação da cor dos requeijões**

Para a avaliação da cor das amostras foi utilizado um colorímetro (modelo CR-400, Konica Minolta Sensing, Inc., Japão) acoplado a um adaptador para materiais granulares (modelo CR-A50). O colorímetro utiliza abertura iluminante C e diafragma de 8 mm. O valor das cores espaciais de são representadas por  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  e foram registados através do *software* “Spectra Magic Nx” (versão CM-S100W 2.03.0006) da empresa Konica Minolta (Japão). O eixo  $L^*$  representa a luminosidade da amostra e é quantificado numa escala que varia de 0 (preto puro) a 100 (branco puro). As coordenadas  $a^*$  e  $b^*$

representam as características cromáticas da amostra ao longo dos eixos verde-vermelho e amarelo-azul, respetivamente (Figura 2.11). Antes de iniciar as medições, o instrumento foi calibrado contra um padrão: azulejo branco. A cor das amostras foi medida em três pontos diferentes, para cada dose e para cada ponto de tempo foi considerado o valor médio. A diferença de cor ou a mudança de cor total para cada amostra foi determinada com base nas três coordenadas espaciais de cor:

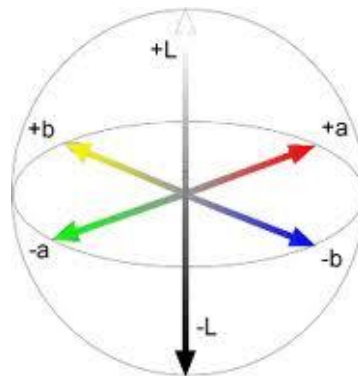
$$\Delta E = (\Delta L^2 + \Delta a^2 + \Delta b^2)^{0.5}$$


Figura 2.11 – Representação no espaço da cor.

### 2.3.2 Avaliação do valor nutricional

A avaliação do valor nutricional incluiu determinação do teor de humidade, cinzas, lípidos, proteínas e glúcidos, utilizando para tal, os procedimentos AOAC (AOAC, 1995).

Os lípidos foram determinados pela extração de uma massa conhecida da amostra liofilizada com éter de petróleo, usando o Soxhlet. Para determinar o teor de proteínas (Nx6,38) (Rouch *et al.*, 2008) das amostras foi usado o método macro-Kjeldahl (Kjeldahl, 1883) onde se utilizou a massa de requeijão deslipidificada (retirada do Soxhlet). O teor de cinzas foi determinado por incineração a 550 °C. Os glúcidos foram calculados por diferença, a partir da seguinte equação:

$$\text{Hidratos de carbono} = 100 - (\text{humidade} + \text{proteínas} + \text{lípidos} + \text{cinzas}) \quad (2.10)$$

A energia total foi determinada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Energia (kcal)} = 4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos}) \quad (2.11)$$

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC/FID). A massa obtida pela extração do Soxhlet foi misturada no vortex com 5 mL de reagente A (metanol: ácido sulfúrico: tolueno 2:1:1 (v/v/v)) onde ficou pelo menos 12 h num banho a 50 °C e sob agitação; de seguida adicionam-se 3 mL de água e 3 mL de éter sendo intercaladas por idas ao vortex, obtendo-se desta forma uma separação de fases. Retira-se o sobrenadante e passa-se por sulfato de sódio anidro para retirar alguma água ou impurezas que possam existir; de seguida a amostra é recuperada para um vial devidamente filtrada com um microfiltro. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m×0,32 mm×0,25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C, 20 °C/min até 220 °C que permaneceu durante 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo de forma a obter as percentagens totais de ácidos gordos saturados (SFA), ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) e ácidos gordos polinsaturados (PUFA).

## 2.4 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos como valores médios e desvios padrão correspondentes (DP). Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com  $\alpha = 0,05$ . Este tratamento estatístico foi realizado utilizando o programa SPSS v. 20.0.

## 3 Resultados e Discussão

### 3.1 Atividade antioxidante dos extratos livres

A atividade antioxidante dos cogumelos em estudo foi avaliada através dos métodos: efeito captador de radicais livres – DPPH, poder redutor e inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno.

Os resultados expressos em termos de EC<sub>50</sub> (concentração de amostra necessária para provocar 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor) obtidos nos diferentes ensaios para os extratos individuais (assinalados com \*) encontram-se organizados na Tabela 3.1. Através da análise pode verificar-se que o *Suillus luteus* (Sl) possui uma atividade antioxidante superior, uma vez que os seus valores de EC<sub>50</sub> são inferiores aos do *Coprinopsis atramentaria* (Ca). Nesta mesma Tabela é também realizada a comparação dos valores da atividade antioxidante (EC<sub>50</sub>) obtidos durante os ensaios realizados neste trabalho com os valores previamente publicados pela equipa de investigação do BioChemCore-CIMO (Centro de Investigação da Montanha). É possível observar que os valores de EC<sub>50</sub> são distintos entre si mesmo sendo para as mesmas espécies de cogumelos. Tais diferenças podem ser justificadas pelo facto do procedimento de extração ser diferente, ou seja, a preparação dos extratos foi realizada em condições distintas. Em trabalhos anteriores o Sl (1,5 g) foi extraído com 40 mL de metanol durante 2 horas a 25°C, a re-extração foi também realizada durante 2 horas com 20 mL de metanol (Reis *et al.*, 2011), e o Ca (1 g) foi extraído com metanol/água (80:20 v/v; 30 mL) durante 2 horas a -20°C, onde

posteriormente foi levado aos ultrassons durante 15 minutos; o resíduo sólido voltou a ser re-extraído nas mesmas condições (Heleno *et al.*, 2012). Estas condições diferem das utilizadas neste trabalho (1.5 g de cada cogumelo foi extraído com 30 mL de metanol durante 1 hora a temperatura ambiente, a re-extração foi realizada nas mesmas condições) levando a que os valores da atividade antioxidante contenham diferenças significativas.

**Tabela 3.1** – Comparação dos valores de EC<sub>50</sub> (mg/mL) com os da bibliografia (média±DP).

	SI*	SI** (Reis <i>et al.</i> , 2011)	Ca*	Ca** (Heleno <i>et al.</i> , 2012)
Efeito Captador de radicais livres (DPPH)	2,86±0,02	1,92±0,08	4,62±0,14	3,87±0,41
Poder Redutor	0,97±0,02	0,75±0,03	1,11±0,02	1,29±0,11
Inibição da descoloração do β-caroteno	1,64±0,20	0,61±0,02	5,28±0,36	1,03±0,07

\* - Valores obtidos durante a realização dos ensaios laboratoriais.\*\* - Valores existentes em artigos publicados pela equipa de investigação.

Na Tabela 3.2, são apresentados os valores de EC<sub>50</sub> para as misturas utilizando os vários ensaios utilizados. Adicionalmente apresenta-se a avaliação do efeito combinatório das misturas (sinergista, aditivo ou antagonista). Relativamente às misturas nas diferentes proporções é possível observar que a combinação SI:Ca (1:2) demonstrou resultados menos favoráveis. As misturas SI:Ca (1:1) e SI:Ca (2:1) conduziram a resultados superiores e semelhantes entre si, sendo que a última combinação revela valores de EC<sub>50</sub> ligeiramente melhores no ensaio do efeito captador de radicais livres – DPPH e poder redutor. Contudo, os resultados experimentais da capacidade antioxidante das misturas foram, na sua maioria, melhores que os valores teóricos (calculados através da média ponderada dos resultados obtidos para os extratos individuais), evidenciando deste modo, uma predominância dos efeitos sinergistas. Efetivamente, estes efeitos foram observados em 67% dos ensaios, ou seja, nestes casos houve um aumento da capacidade antioxidante superior à que seria esperada considerando um mero efeito aditivo das espécies individualmente. Os resultados obtidos mostraram diferentes comportamentos nos ensaios de atividade antioxidante de acordo com as proporções utilizadas, indicando que as misturas de cogumelos permitem a ocorrência de diferentes interações químicas entre os compostos obtidos em cada espécie.

**Tabela 3.2** – Valores relativos à atividade antioxidante das espécies de cogumelos avaliadas individualmente e em misturas com diferentes proporções (média±DP).

Atividade antioxidante (valores de EC <sub>50</sub> , mg/mL)												
	SI	Ca	SI:Ca(1:1)			SI:Ca(1:2)			SI:Ca(2:1)			Controlo Positivo (Trolox)
			Teórico*	Experimental	Efeito	Teórico**	Experimental	Efeito	Teórico***	Experimental	Efeito	
Efeito Captador de radicais livres - DPPH	2,86±0,02	4,62±0,14	3,74	3,49±0,13	ES	4,04	4,07±0,06	EA	3,44	2,72±0,02	ES	0,04±0,00
Poder Redutor	0,97±0,02	1,11±0,02	1,04	1,05±0,02	EA	1,06	1,20±0,04	SN	1,02	0,94±0,01	ES	0,03±0,00
Inibição da descoloração do β-caroteno	1,64±0,20	5,28±0,36	3,46	1,46±0,04	ES	4,08	1,51±0,24	ES	2,84	1,47±0,04	ES	0,003±0,00

Os valores teóricos foram calculados como médias ponderadas dos valores EC<sub>50</sub> experimentais dos cogumelos individuais. \*Teórico: EC<sub>50</sub>=EC<sub>50</sub>SI×0,5+EC<sub>50</sub>Ca×0,5;

\*\*Teórico: EC<sub>50</sub>=EC<sub>50</sub>SI×0,33+EC<sub>50</sub>Ca×0,67; \*\*\*Teórico: EC<sub>50</sub>=EC<sub>50</sub>SI×0,67+EC<sub>50</sub>Ca×0,33;

O efeito foi calculado através da expressão: 
$$\text{Efeito} = \frac{\text{EC}_{50}\text{Teórico} - \text{EC}_{50}\text{experimental}}{\text{EC}_{50}\text{Teórico}} \times 100.$$

**ES** – Efeito Sinergista: os valores experimentais são maiores que 5%, no entanto, são inferiores quando comparados aos valores de EC<sub>50</sub> teóricos; **EA** – Efeito Aditivo: as diferenças entre os valores teóricos e experimentais são menores a 5%; **SN** – Sinergismo Negativo (antagonista): os valores experimentais são maiores que 5%, no entanto, são superiores quando comparados aos valores de EC<sub>50</sub> teóricos.

Os fenóis totais foram obtidos através do ensaio colorimétrico *Folin-Ciocalteu* e encontram-se na Tabela 3.3. Os extratos combinados nas diferentes proporções revelam maior conteúdo de fenóis e verifica-se a concordância relativamente aos valores de EC<sub>50</sub>, ou seja, as misturas de SI:Ca (2:1) e SI:Ca (1:1) que mostraram anteriormente valores idênticos de atividade antioxidante revelam, estatisticamente, ter o mesmo teor de fenóis. Este resultado vai de encontro ao referido anteriormente por (Heleno *et al.*, 2012; Froufe *et al.*, 2009), quando descreveram uma correlação entre a atividade antioxidante de cogumelos e a quantidade de fenóis totais, ou seja, quanto maior o teor de fenóis maior é a atividade antioxidante.

**Tabela 3.3** - Conteúdo de fenóis totais das espécies de cogumelos avaliadas individualmente e em misturas com diferentes proporções (média±DP).

Fenóis totais (mg EAG/g extrato)				
SI	Ca	SI:Ca(1:1)	SI:Ca(1:2)	SI:Ca(2:1)
40,79±1,16 <sup>a</sup>	27,03±0,85 <sup>d</sup>	34,42±1,89 <sup>b</sup>	31,64±0,23 <sup>c</sup>	35,34±0,83 <sup>b</sup>

EAG- equivalentes de ácido gálico. Letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes (p <0,05).

---

### 3.2 Atividade antitumoral dos extratos livres

Os valores resultantes da atividade antitumoral foram expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração de amostra para atingir 50% de inibição da proliferação celular) podem ser observados na Tabela 3.4. O estudo recaiu sobre quatro linhas celulares tumorais humanas diferentes: MCF7 (cancro de mama), HCT15 (cancro do colón), HeLa (cancro da cervical) e HepG2 (cancro de fígado) e uma cultura de células primárias não tumorais, PLP2, que dizem respeito a células de fígado de porco. O estudo com células não-tumorais teve como objetivo verificar se os extratos de cogumelos eram tóxicos para este tipo de células, ou seja, avaliar a sua hepatotoxicidade.

Através da avaliação da Tabela 3.4 (marcados com \*) é possível verificar que o *Suillus luteus* (Sl) apresentou atividade antitumoral para todas as linhas tumorais estudadas, porém tal não foi verificado para o cogumelo *Coprinopsis atramentaria* (Ca), desta forma, as combinações realizadas não obtiveram resultados sinérgicos uma vez que o cogumelo Ca não trazia nenhuma vantagem na sua utilização.

Relativamente às quatro linhas tumorais, verifica-se que é necessário uma concentração inferior de extrato de Sl para atingir uma inibição de 50% de HepG2 (células tumorais de fígado), neste caso é necessário apenas uma concentração de 84 µg/mL. No entanto, quando se observa o caso das células cancerígenas de mama (MCF7) é notório que a concentração de Sl tem de ser maior para conseguir inibir a mesma percentagem de células. Na questão da hepatotoxicidade, não foi revelada qualquer tipo de toxicidade dos extratos dos cogumelos nas células não tumorais.

Mais uma vez o processo de extração teve influência nos resultados obtidos. Desta forma, na Tabela 3.4 (marcados com \*\*) são apresentados os valores de GI<sub>50</sub> publicados em artigos para os mesmos cogumelos. Nos trabalhos já publicados o Sl (2 g) foi extraído com 50 mL de metanol durante 6 horas a -20°C, no final é levado aos ultrassons durante 15 minutos a re-extração é efetuada nas mesmas condições (Santos *et al.*, 2013). O Ca (10 g) foi extraído com 250 mL de metanol durante 6 horas a -20°C, depois o extrato foi aos ultrassons 15 minutos e por fim centrifugado (Heleno *et al.*, 2014). Visto estas condições serem distintas das praticadas na realização deste trabalho (1.5 g de cada cogumelo foi extraído com 30 mL de metanol durante 1 hora a

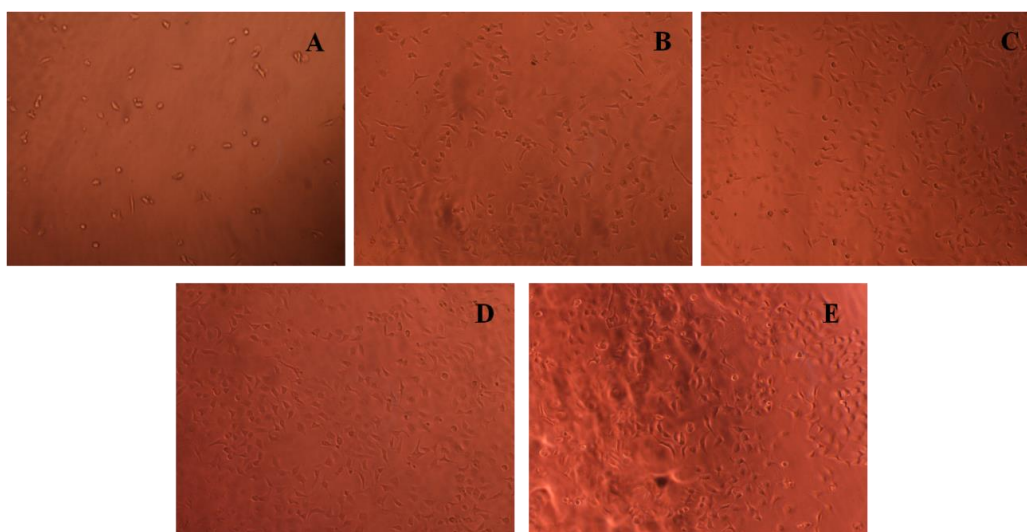
temperatura ambiente, a re-extração foi realizada nas mesmas condições) leva a que os valores de atividade antitumoral sejam diferentes.

**Tabela 3.4** – Valores da atividade antitumoral e hepatotoxicidade das espécies de cogumelos testadas individualmente (média±DP).

	SI*	SI** (Santos <i>et al.</i> , 2013)	Ca*	Ca** (Heleno <i>et al.</i> , 2014)	Controlo positivo
Atividade antitumoral (Valores GI <sub>50</sub> , µg/mL)					
MCF7	160,87±15,20	32,25±5,7	a.n.	53,10±4,72	0,91±0,04
HCT15	154,87±16,05	17,75±1,6	a.n.	36,44±3,3	1,91±0,06
HeLa	88,02±6,42	b	a.n.	a.n.	1,14±0,21
HepG2	84±1,05	b	a.n.	a.n.	3,22±0,67
Hepatotoxicidade (Valores GI <sub>50</sub> , µg/mL)					
PLP2	a.n.	a.n.	a.n.	a.n.	2,06±0,03

\* - Valores obtidos durante a realização dos ensaios laboratoriais.\*\* - Valores existentes em artigos publicados pela equipa de investigação. **a.n.** – atividade negativa até 400 µg/mL. **b** – não documentado no artigo.

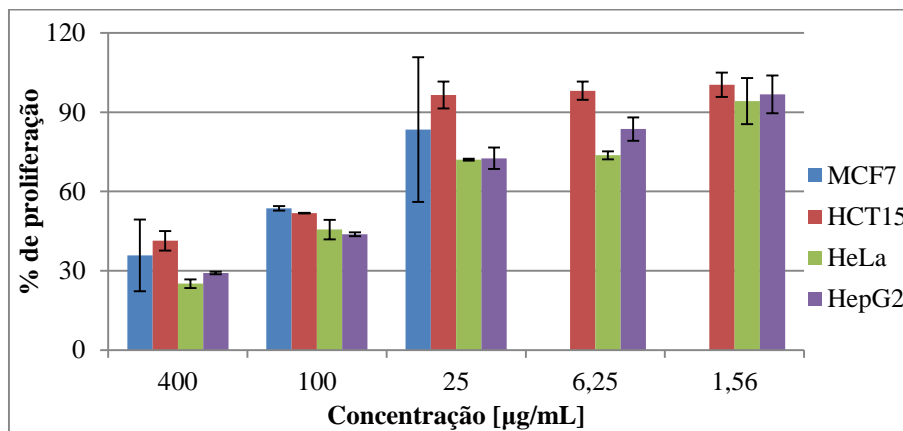
Durante o ensaio da atividade antitumoral (ensaio da SRB) as células foram expostas a cinco concentrações diferentes do extrato de cogumelo. Na Figura 3.1 encontra-se uma compilação de fotografias tiradas através do sistema de aquisição de imagem (Nikon Digital Sight DS-LI) acoplado ao microscópio ótico invertido (Nikon Eclipse TS100). Estas imagens foram obtidas minutos antes de ser colocado o TCA na microplaca.



**Figura 3.1** – Crescimento das células tumorais HeLa para diferentes concentrações de extrato. A: 400 µg/mL; B: 100 µg/mL; C: 25 µg/mL; D: 6,25 µg/mL; E: 1,56 µg/mL.

Através da observação da Figura 3.1 é possível verificar a inibição existente na proliferação celular. Quando se faz a comparação entre a Figura 3.1-A e 3.1-E é evidente a diferença existente na quantidade de células tumorais, pois no primeiro caso o extrato tem uma concentração de 400  $\mu\text{g/mL}$  e no último a concentração é de apenas 1,56  $\mu\text{g/mL}$ . Assim sendo, as concentrações mais altas tornam o meio menos propício para a proliferação celular, provocando mesmo a morte da maioria das células existentes, sendo que as poucas células que se podem observar, não possuem a forma que lhes é característica.

Pela visualização da Figura 3.2 pode ser analisada a percentagem de proliferação das diferentes células tumorais humanas quando expostas ao extrato do *Suillus luteus*. Através desta Figura pode-se averiguar, em forma de percentagem, os resultados implícitos na Figura 3.1. Mais uma vez é perceptível que quando as células são expostas a uma concentração de extrato superior existe um menor crescimento celular. Pode-se ainda verificar que a taxa de proliferação das células HCT15 é praticamente constante entre as concentrações 25 e 1,56  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 3.2** – Avaliação da taxa de proliferação de células tumorais em função da concentração de extrato de *Suillus luteus*.

### 3.3 Microencapsulação

A encapsulação dos extratos de cogumelo foi realizada recorrendo ao processo de *spray drying* como referido anteriormente. O material de encapsulação utilizado foi a maltodextrina (MD) uma vez ser um material que possui boa capacidade de proteção de princípios ativos de origem natural e também por ser comestível e não tóxico.

O processo de microencapsulação foi desenvolvido tendo por base o trabalho publicado por Wu *et al.* (2014). A concentração do material de encapsulação foi fixada em 20% (m/v). Foram realizadas quatro atomizações, sendo com elas produzidos pós apenas de maltodextrina, de Sl, de Ca e da combinação de ambos na proporção de Sl:Ca (1:1). O teor de sólidos no final foi de 21. A combinação de Sl:Ca (1:1) (0,5g de Sl e 0,5 g de Ca) foi escolhida devido aos valores obtidos através da atividade antioxidante e compostos bioativos, uma vez ser uma das melhores combinações e ter revelado efeitos sinérgicos relativamente ao potencial antioxidante. Por outro lado, a combinação de proporções iguais facilita processo de preparação dos extratos e a sua incorporação na matriz alimentar.

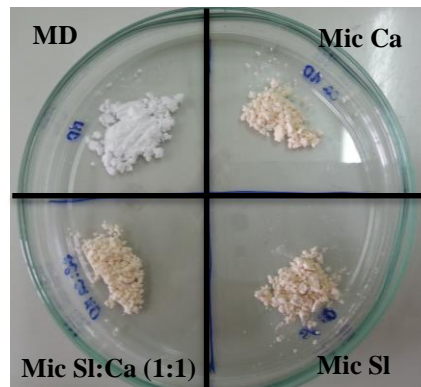
Durante a atomização da solução homogeneizada verificou-se que houve uma grande perda durante o processo de secagem, uma vez que uma parte considerável do pó ficava agarrado na câmara de secagem do equipamento, assim sendo, o rendimento rondou em média os 50%. Na Tabela 3.5 pode ser observado o rendimento individual para cada extrato utilizado.

**Tabela 3.5** – Massa de microesferas obtidas no *spray drying* e o rendimento do processo.

Mic	Massa de Mic obtida [g]	Rendimento % [m/m]
Sl	11,60	55,2
Ca	10,87	51,8
Sl:Ca(1:1)	9,89	47,1

Após a atomização os pós foram recolhidos e armazenados no frio. Foi possível verificar de imediato a diferença de cor das microesferas produzidas, ou seja, as Mic placebo apresentavam uma cor branca (cor característica de MD) e as Mic com extrato incorporado uma cor castanha claro, como se pode observar na Figura 3.3. Um outro

aspecto verificado nas Mic é que não possuíam o odor forte e característico do extrato de cogumelo na forma livre (avaliação qualitativa).



*Figura 3.3* – Cor das microesferas obtidas, com e sem extrato de cogumelo.

### 3.3.1 Caracterização das Mic

Após serem obtidos os pós das microesferas foram realizados alguns ensaios com o intuito de as caracterizar. Começou-se por realizar um ensaio para avaliar o teor de humidade das Mic. Para tal foram apenas utilizadas as Mic placebo (sem princípio ativo), após terem estado durante 60 minutos expostas a uma temperatura de 100°C, são retiradas e deixadas a arrefecer num exsiccador. São retirados o valor da massa periodicamente até que esta seja constante. Constatou-se que o pó das Mic estava isento de humidade uma vez que não houve redução da sua massa.

Para avaliar a morfologia, as microesferas foram observadas por microscopia eletrónica de varrimento (MEV). Na Figura 3.4 podem ser observadas três ampliações diferentes das Mic de SI:Ca (1:1), contudo no Anexo A encontram-se todos os registos fotográficos das Mic placebo e das Mic com extrato individual incorporado.



*Figura 3.4* – MEV das Mic de SI:Ca (1:1). A) Ampliação 530x. B) Ampliação 1300x. C) Ampliação 2300x. As setas a laranja indicam Mic com superfície lisa e a área a vermelho Mic com superfície rugosa.

Através da observação da Figura 3.4 pode-se verificar que as Mic apresentam dois tipos diferentes de superfície, umas são lisas (Figura 3.4 indicado com setas a laranja), no entanto outras apresentam algumas irregularidades (Figura 3.4-C rodeado a vermelho), estas últimas contêm uma espécie de “pregueado” para o interior da micropartícula, normalmente denominadas de invaginações, aspeto que pode estar relacionado com o facto das gotas líquidas terem uma evaporação muito rápida ao longo do processo de secagem (Rosenberg *et al.*, 1985), criando desta forma microesferas menos lisas na superfície. Das três atomizações realizadas, as partículas do pó das Mic contendo extrato de SI incorporado apresentam maior quantidade de invaginações.

Durante a observação das Mic por microscopia eletrónica foi também efetuada a medição do diâmetro das partículas (Figura 3.5), este variou entre os 2 e os 55  $\mu\text{m}$ , sendo que o tamanho máximo foi registado para as microesferas de SI:Ca (1:1).

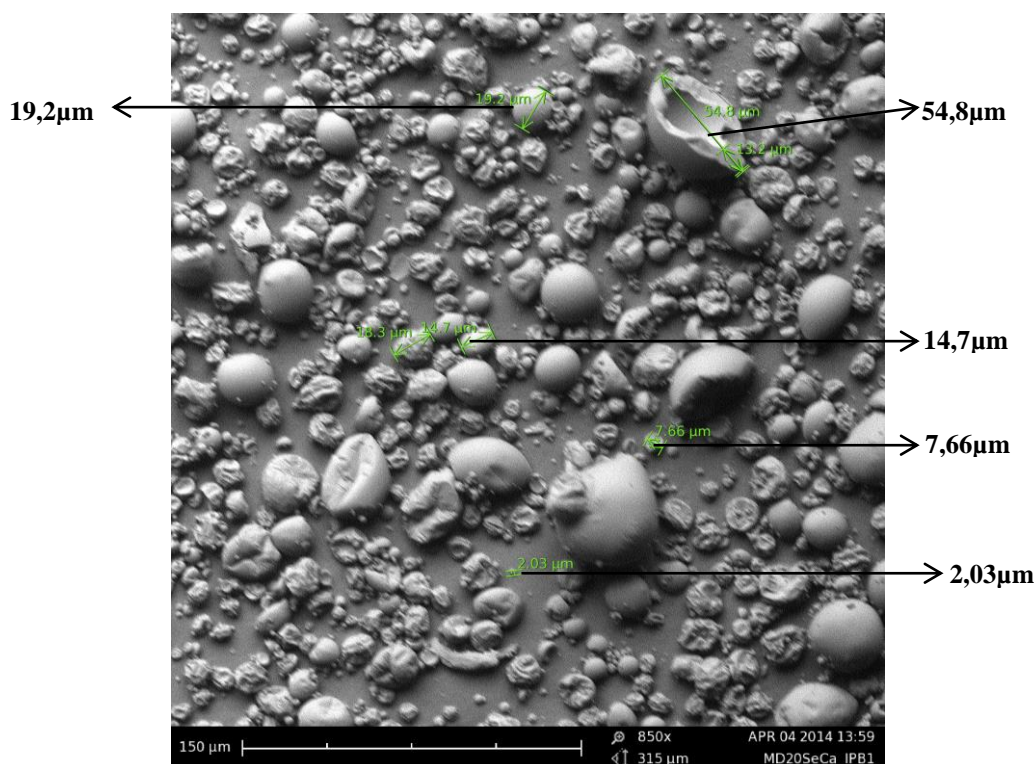


Figura 3.5 - Diâmetro médio das Mic SI:Ca (1:1).

Posteriormente foram realizados estudos por FTIR com o intuito de verificar a presença do extrato nas Mic, porém este estudo não foi muito conclusivo uma vez que os espectros são muito semelhantes entre si (ver espectros no Anexo B). Nomeadamente as Mic contendo o extrato não evidenciaram nenhum pico característico deste, possivelmente devido a um efeito de concentração (razão extrato:maltodextrina de 1:20).

Assim recorreu-se à avaliação das amostras por HPLC, visando a verificação da presença dos extratos nos microencapsulados e calcular a eficiência de encapsulação. Na Figura 3.6 A, B e C encontram-se os cromatogramas representativos da maltodextrina, extrato de SI livre e das Mic com extrato de SI, respetivamente. Nesta Figura é possível observar a presença do extrato nas Mic através, p. ex., do pico 1 (ácido cinâmico). Os restantes cromatogramas encontram-se em Anexo C.

A avaliação da eficiência de encapsulação foi realizada com base no ácido cinâmico dado este ser o composto maioritariamente presente nos extratos livres (Figura 3.6 – B, pico 1) e também por não ter qualquer tipo de interferência com a MD. Tal pode ser verificado no cromatograma da MD onde não são verificados picos na zona do ácido cinâmico (Figura 3.6 - A).

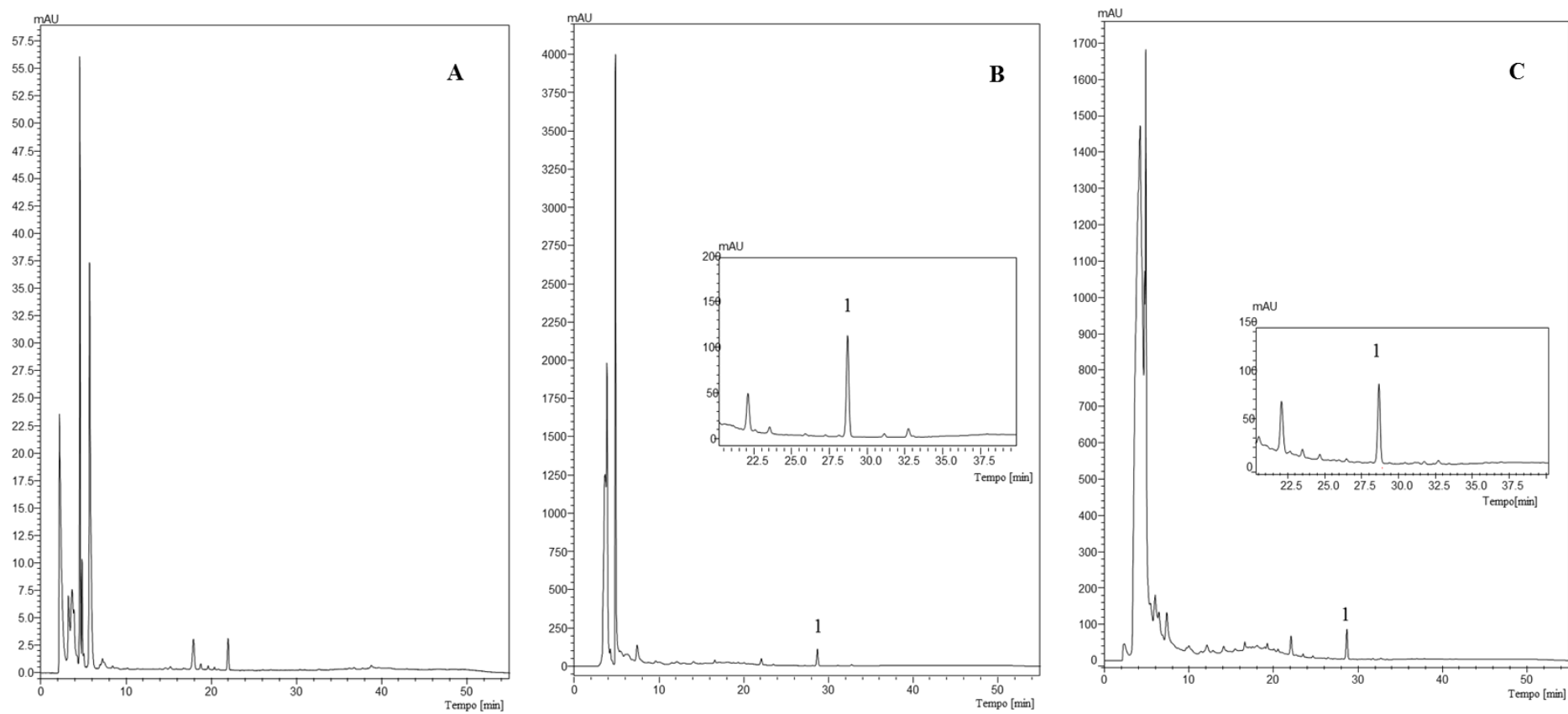
Na Tabela 3.6 encontram-se os valores de eficiência de encapsulação (EE) obtidos para cada atomização realizada.

**Tabela 3.6** – Eficiência de encapsulação obtida para os extratos individuais e para a combinação (média  $\pm$  DP).

Mic	Quantidade de ácido cinâmico nas Mic - teórico [mg/g extrato]	Quantidade de ácido cinâmico nas Mic - experimental [mg/g Mic]	EE % [m/m]
SI	0,33 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	62,58 $\pm$ 0,06
Ca	0,46 $\pm$ 0,02	0,20 $\pm$ 0,01	43,46 $\pm$ 0,36
SI:Ca(1:1)	0,36 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,02	59,82 $\pm$ 0,13

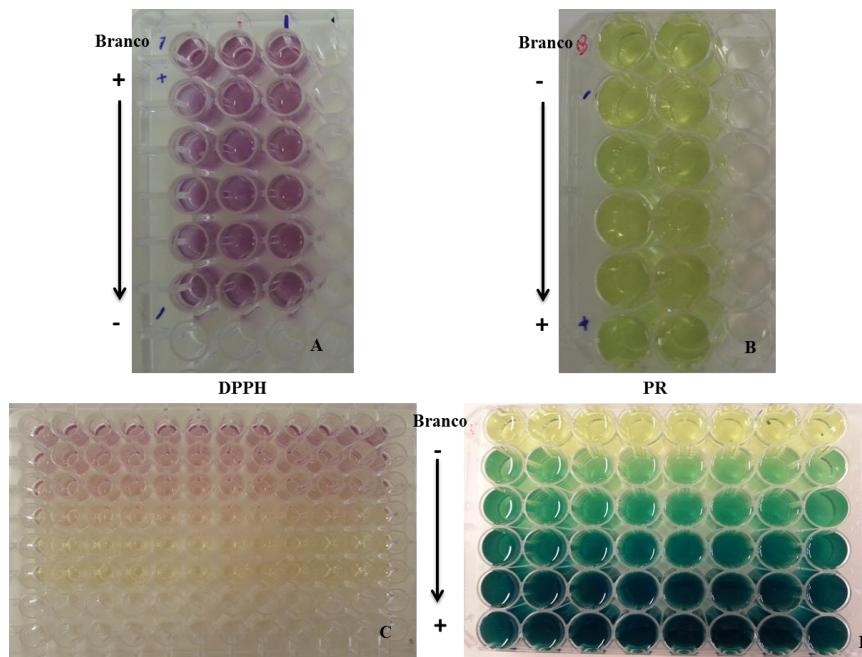
Precedendo os ensaios de avaliação da atividade antioxidante dos microencapsulados foram realizados ensaios com as Mic sem princípio ativo, com intuito de verificar se a maltodextrina apresentava ou não poder antioxidante.

Com base nos ensaios realizados foi possível verificar que a maltodextrina não apresenta atividade antioxidante nas concentrações a ser testadas futuramente. Na Figura 3.7-A e B é possível verificar que não houve a alteração de cor das concentrações menores para as maiores.



**Figura 3.6** – A) Cromatograma MD. B) Cromatograma extrato livre SI. C) Cromatograma Mic com SI incorporado. **1** – Ácido cinâmico.

Assim, procedeu-se à avaliação da atividade antioxidante das Mic contendo SI, Ca e SI:Ca (1:1) e ainda da mistura resultante da combinação das microesferas Mic SI + Mic Ca (também na proporção 1:1). Na Figura 3.7-C e D observa-se pela colorimetria que existe atividade, sendo mais um indicativo que o extrato não só ficou encapsulado como também não perdeu a sua bioatividade. Na Tabela 3.7 são apresentados os valores de EC<sub>50</sub> obtidos com os dois ensaios efetuados para todas as amostras testadas.



**Figura 3.7** – Ensaio da atividade antioxidante para os ensaios DPPH e PR. A e B para as Mic placebo e C e D para as Mic SI, Ca, SI:Ca (1:1) e Mic SI + Mic Ca.

**Tabela 3.7** – Valores relativos à atividade antioxidante (EC<sub>50</sub> (mg/mL)) das microesferas (média±DP).

Ensaio	Mic SI	Mic Ca	Teórico	Mic SI:Ca (1:1)		Mic SI (1) + Mic Ca (1)	
				Experimental	Efeito	Experimental	Efeito
DPPH	2,13±0,06	2,36±0,16	2,25	1,96±0,06	ES	2,04±0,04	ES
PR	0,85±0,00	0,78±0,00	0,82	0,87±0,01	SN	0,83±0,02	EA

Valor teórico obtido através da expressão:  $EC_{50} = EC_{50}SI \times 0,5 + EC_{50}Ca \times 0,5$ . **ES** – Efeito Sinergista: os valores experimentais são maiores que 5%, no entanto, são inferiores quando comparados aos valores de EC<sub>50</sub> teóricos; **EA** – Efeito Aditivo: as diferenças entre os valores teóricos e experimentais são menores a 5%; **SN** – Sinergismo Negativo (antagonista): os valores experimentais são maiores que 5%, no entanto, são superiores quando comparados aos valores de EC<sub>50</sub> teóricos.

É possível verificar pela Tabela 3.7 que os extratos encapsulados nas microesferas possuem também efeitos sinergistas, sendo ligeiramente melhor a combinação Mic SI:Ca (1:1) do que a combinação de microesferas individuais.

As Mic SI:Ca (1:1) revelaram resultados mais satisfatórios quanto à atividade antioxidante e por isso foram escolhidas para serem incorporadas numa matriz alimentar. As restantes microesferas foram utilizadas para os estudos de estabilidade.

Os estudos de estabilidade durante o armazenamento foram realizados com as amostras de microesferas Mic SI e Mic Ca para comparação com o extrato livre (SI e Ca) (Figura 3.8). A massa utilizada de extrato microencapsulado e livre foi calculada tendo por base a obtenção de uma concentração de 20 mg/mL nos ensaios de determinação da atividade antioxidante. Para este estudo, as amostras foram armazenadas por um período de 30 dias a três condições diferentes, sendo seguidamente enumeradas:

- Temperatura 1: 37°C - Incubadora;
- Temperatura 2: 4°C – Frigorífico;
- Luz constante – Sala climatizada;



**Figura 3.8** – Preparação das amostras.

Decorridos 30 dias, as amostras foram recolhidas e realizados os estudos da bioatividade. Na Tabela 3.8 e 3.9 encontram-se os resultados obtidos para o cogumelo SI e Ca, respetivamente.

Pela análise da Tabela 3.8, pode-se verificar que ao fim de 30 dias a atividade antioxidante do extrato livre SI é genericamente melhor com a exceção da amostra que permaneceu a 4 °C que manteve o mesmo PR. No caso das microesferas de SI o DPPH foi melhor ao fim de 30 dias, à exceção da amostra armazenada a 4 °C que mostra um valor similar ao tempo inicial; no entanto, o PR foi relativamente pior.

A exposição à luz melhora a atividade antioxidante quer do extrato livre quer do microencapsulado, talvez porque cria condições de stresse propícias à interação com as moléculas antioxidantes. O armazenamento a 37 °C potencia o PR do extrato livre em relação ao armazenamento a 4 °C, enquanto no extrato encapsulado observa-se o

contrário. Para o DPPH, foi melhor o armazenamento do extrato microencapsulado a 37 °C.

Para os dados apresentados na Tabela 3.9 é possível verificar que no final dos 30 dias o DPPH do extrato livre e microencapsulado de Ca é melhor, pelo contrário o PR é genericamente pior.

A exposição à luz melhora o DPPH quer do extrato livre quer do microencapsulado, mas piora o PR, o que evidencia os distintos mecanismos de ação envolvidos nos ensaios (DPPH envolve moléculas com atividade captadora de radicais livres – dadoras de radicais de hidrogénio, enquanto que o PR envolve moléculas redutoras – dadoras de eletrões). Quando comparados os valores nas diferentes temperaturas é possível verificar que o armazenamento a 37 °C potencia a atividade antioxidante do extrato livre e do microencapsulado, pois está sujeito a uma condição de stresse em relação ao armazenamento a 4 °C.

**Tabela 3.8** – Valores de EC<sub>50</sub> (mg/mL) para o extrato livre de SI e respectivo encapsulado, para tempo 0 e 30 dias (média±DP).

Ensaio	Extrato livre SI				Microesferas SI			
	0 dias	30 dias			0 dias	30 dias		
		4 °C	37 °C	Luz		4 °C	37 °C	Luz
DPPH	2,86±0,02 <sup>a</sup>	2,39±0,14 <sup>c</sup>	2,34±0,02 <sup>c</sup>	2,70±0,17 <sup>b</sup>	2,13±0,06 <sup>a</sup>	2,18±0,03 <sup>a</sup>	1,99±0,07 <sup>b</sup>	1,99±0,03 <sup>b</sup>
PR	0,96±0,02 <sup>a</sup>	0,97±0,01 <sup>a</sup>	0,90±0,01 <sup>b</sup>	0,89±0,01 <sup>b</sup>	0,85±0,01 <sup>c</sup>	0,95±0,01 <sup>b</sup>	0,98±0,01 <sup>a</sup>	0,98±0,01 <sup>a</sup>

Em cada linha e para cada preparação, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes (p <0,05).

**Tabela 3.9** - Valores de EC<sub>50</sub> (mg/mL) para o extrato livre de Ca e respectivo encapsulado, para tempo 0 e 30 dias (média±DP).

Ensaio	Extrato livre Ca				Microesferas Ca			
	0 dias	30 dias			0 dias	30 dias		
		4 °C	37 °C	Luz		4 °C	37 °C	Luz
DPPH	4,62±0,14 <sup>a</sup>	2,29±0,07 <sup>d</sup>	2,98±0,11 <sup>b</sup>	2,56±0,08 <sup>c</sup>	2,36±0,16 <sup>a</sup>	2,11±0,14 <sup>b</sup>	1,86±0,13 <sup>c</sup>	2,21±0,17 <sup>ab</sup>
PR	1,11±0,02 <sup>b</sup>	1,34±0,01 <sup>a</sup>	1,13±0,03 <sup>b</sup>	1,36±0,01 <sup>a</sup>	0,78±0,01 <sup>b</sup>	0,86±0,01 <sup>a</sup>	0,69±0,01 <sup>c</sup>	0,80±0,01 <sup>b</sup>

Em cada linha e para cada preparação, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes (p <0,05).

### 3.4 Incorporação numa matriz alimentar

#### 3.4.1 Avaliação das propriedades antioxidantes

Nesta fase do trabalho, as microesferas Sl:Ca (1:1) foram incorporadas numa matriz alimentar natural: requeijão. Foram introduzidas as microesferas de Sl:Ca (1:1) uma vez que nos estudos anteriores revelaram uma boa atividade antioxidante como também efeitos sinérgicos.

Na Tabela 3.10 encontram-se organizados os valores de EC<sub>50</sub> dos requeijões para os ensaios de DPPH e PR. Este estudo teve como objetivo averiguar a diferença da incorporação do extrato na forma livre ou microencapsulada relativamente ao requeijão controlo. O estudo da atividade antioxidante teve por base dois tempos distintos: (i) logo após a incorporação, tempo inicial (t=0dias); (ii) após sete dias (t=7 dias) de armazenamento no frigorífico a 4 °C.

**Tabela 3.10** – Atividade antioxidante, resultados em valores de EC<sub>50</sub> (mg/mL), dos requeijões controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 7 dias de armazenamento (média±DP).

Ensaio	Tempo = 0 dias			Tempo = 7 dias		
	Controlo	Extrato	Microesferas	Controlo	Extrato	Microesferas
DPPH	>200	83,61±2,57 <sup>b</sup>	133,44±24,09 <sup>a</sup>	>200	161,86±7,28 <sup>a</sup>	96,96±9,33 <sup>b</sup>
PR	>200	14,49±0,19 <sup>b</sup>	20,46±0,49 <sup>a</sup>	56,58±0,18 <sup>a</sup>	19,96±0,70 <sup>b</sup>	13,67±0,18 <sup>c</sup>

Em cada linha e para cada tempo, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes (p < 0,05).

Quando analisados, os valores da Tabela 3.10, revelam que as amostras do requeijão controlo não apresentaram atividade antioxidante (avaliada pelos ensaios do DPPH e PR), ao contrário dos requeijões com extrato livre e encapsulados incorporados. Assim, pode-se verificar que nestes casos o extrato de cogumelo quer na forma livre quer encapsulada confere atividade antioxidante ao requeijão.

O facto do requeijão controlo apresentar melhoria do PR ao longo do tempo pode estar relacionado com compostos presentes no próprio requeijão capazes de doar eletrões, isto é, compostos redutores que se formam como resultado da peroxidação lipídica que ocorre no requeijão (matriz rica em lípidos). Pelo contrário, a variação dos valores de

DPPH está mais relacionada com a presença de extrato, uma vez que no controlo não houve variação.

O extrato livre confere ao requeijão valores superiores de atividade antioxidante no tempo inicial (t=0 dias) comparativamente com o extrato encapsulado para o mesmo tempo. Assim, é possível afirmar que existe uma maior disponibilidade do extrato livre no tempo inicial e uma maior proteção deste quando encapsulado dado que os valores obtidos para este último caso foram piores.

Quando são comparados os valores de  $EC_{50}$  do ensaio DPPH e PR ao fim de 7 dias do requeijão com extrato na forma livre e microencapsulada, verifica-se que o requeijão que contém o extrato microencapsulado apresenta melhores resultados do que o que possui extrato livre. Neste caso, as microesferas possibilitaram uma libertação gradual de extrato e por conseguinte uma maior preservação de bioativos levando assim à melhoria da atividade antioxidante ao fim de 7 dias, enquanto no extrato livre parece ter havido uma degradação dos compostos bioativos ao longo do tempo.

Em ambos os ensaios (DPPH e PR), os resultados mostraram que o extrato microencapsulado levou a uma melhor preservação da atividade antioxidante ao longo do tempo aumentando por isso a sua biodisponibilidade no momento de ingestão.

### **3.4.2 Avaliação da cor dos requeijões**

A cor é a primeira impressão que se tem dos alimentos, assim, a questão da perceção visual é uma consideração importante no desenvolvimento de novos produtos alimentares. As componentes de cor dos requeijões controlo, com extrato livre e microencapsulado foram lidas para o tempo 0 e depois de 7 dias de armazenamento e encontram-se organizados na Tabela 3.11 como valores de luminosidade ( $L^*$ ), valores entre as cores vermelho – verde correspondentes a  $a^*$ , valores entre as cores amarelo – azul representadas por  $b^*$  e cor total ( $\Delta E$ ).

Pela avaliação dos resultados apresentados na Tabela 3.11, pode-se verificar que a introdução dos extratos livres ou microencapsulados não afetou a cor total dos requeijões, uma vez que pelo tratamento estatístico os valores não revelaram diferenças significativas. De forma individual, o  $L^*$  é o  $b^*$  são os que apresentam valores mais significativos. Os valores de  $L^*$  não apresentaram diferenças estatisticamente

significativas para o tempo 0 e 7 dias, revelando que os requeijões se aproximam da cor branca, já os valores de  $b^*$  divulgam uma cor amarelada dos requeijões e, no tempo 0, o requeijão controlo e com extrato na forma livre não apresentaram diferenças significativas, contudo, o requeijão com microesferas revela uma pequena diferença. Por outro lado, no tempo 7 dias não se registou nenhuma diferença estatisticamente significativa. A componente  $a^*$  é muito próxima de zero sendo que pouco contribui para a cor total do requeijão.

**Tabela 3.11** – Cor CIE  $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$  dos requeijões controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 7 dias de armazenamento (média±DP).

	Tempo = 0 dias			Tempo = 7 dias		
	Controlo	Extrato	Microesferas	Controlo	Extrato	Microesferas
$L^*$	91,50±0,85 <sup>a</sup>	91,48±0,63 <sup>a</sup>	91,10±0,93 <sup>a</sup>	91,05±2,00 <sup>a</sup>	90,74±0,87 <sup>a</sup>	90,98±0,83 <sup>a</sup>
$a^*$	-2,12±0,14 <sup>b</sup>	-1,90±0,08 <sup>a</sup>	-1,93±0,11 <sup>a</sup>	-2,07±0,38 <sup>a</sup>	-1,74±0,39 <sup>a</sup>	-1,74±0,30 <sup>a</sup>
$b^*$	9,86±0,31 <sup>b</sup>	10,23±0,80 <sup>b</sup>	11,11±0,46 <sup>a</sup>	11,43±1,60 <sup>a</sup>	12,39±1,79 <sup>a</sup>	11,21±1,58 <sup>a</sup>
$\Delta E$	92,06±0,83 <sup>a</sup>	92,07±0,55 <sup>a</sup>	91,79±0,91 <sup>a</sup>	91,80±1,85 <sup>a</sup>	91,62±0,69 <sup>a</sup>	91,69±0,80 <sup>a</sup>

Os valores de  $\Delta E$ , cor total, são determinados utilizando a expressão:  $\Delta E = \sqrt{L^{*2} + a^{*2} + b^{*2}}$ . Em cada linha e para cada tempo, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 3.4.3 Valor nutricional

Após o estudo da atividade antioxidante nos requeijões, foram realizados ensaios para verificar o valor nutricional dos mesmos. O valor nutricional recaiu sobre o estudo da percentagem de água, cinzas e o teor de macronutrientes (lípidos, proteínas e glúcidos); no final, foi também calculada a contribuição energética dos requeijões. Na Tabela 3.12 são apresentados os valores relativos à composição de macronutrientes e valor energético das amostras; estes valores dizem respeito a 100 g de requeijão.

Através da Tabela 3.12 verifica-se que o teor de humidade (% de água) nos requeijões para o tempo inicial ( $t=0$ ) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Os requeijões controlo e com microesferas após 7 dias de armazenamento também não apresentaram diferenças, no entanto, o requeijão com extrato livre apresentou um valor estatisticamente diferente.

**Tabela 3.12** - Valor nutricional dos requeijões controle, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e após 7 dias de armazenamento (média ± DP).

	Tempo = 0 dias			Tempo = 7 dias		
	Controlo	Extrato	Microesferas	Controlo	Extrato	Microesferas
Humidade (g/100 g)	68,33±0,18 <sup>a</sup>	69,25±0,22 <sup>a</sup>	69,48±0,35 <sup>a</sup>	67,77±0,15 <sup>a</sup>	65,72±0,15 <sup>b</sup>	68,11±0,28 <sup>a</sup>
Cinzas (g/100 g)	1,48±0,02 <sup>ab</sup>	1,35±0,14 <sup>b</sup>	1,62±0,10 <sup>a</sup>	1,69±0,03 <sup>b</sup>	1,80±0,09 <sup>a</sup>	1,56±0,05 <sup>c</sup>
Lípidos (g/100 g)	16,56±0,04 <sup>a</sup>	15,77±0,08 <sup>b</sup>	15,51±0,18 <sup>b</sup>	16,21±0,00 <sup>b</sup>	17,67±0,39 <sup>a</sup>	16,04±0,04 <sup>b</sup>
Proteínas (g/100 g)	12,48±0,26 <sup>a</sup>	12,60±0,03 <sup>a</sup>	12,10±0,00 <sup>a</sup>	12,31±0,19 <sup>a</sup>	12,43±0,03 <sup>a</sup>	12,45±0,13 <sup>a</sup>
Glúcidos (g/ 100 g)	1,15±0,29 <sup>a</sup>	1,03±0,03 <sup>a</sup>	1,29±0,06 <sup>a</sup>	2,02±0,20 <sup>a</sup>	2,38±0,33 <sup>a</sup>	1,84±0,13 <sup>a</sup>
Energia (kcal/100 g)	203,56±0,09 <sup>a</sup>	196,44±0,70 <sup>b</sup>	193,17±0,93 <sup>b</sup>	203,23±0,07 <sup>b</sup>	218,27±1,11 <sup>a</sup>	201,53±0,27 <sup>b</sup>

Em cada linha e para cada tempo, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes (p <0,05).

Os requeijões controlo e incorporados com extrato livre e microencapsulado apresentaram valores de cinzas significativamente diferentes. Relativamente aos lípidos no tempo 0, o requeijão controlo apresentou maior teor, no entanto, os que possuem extrato livre e microencapsulado não apresentaram diferenças significativas, sendo inferiores ao controlo. Para o tempo de 7 dias, os requeijões controlo e com extrato microencapsulado também não apresentaram diferenças estatisticamente significativas, mas o que possui extrato na forma livre apresentou um teor de lípidos superior.

Todos os requeijões apresentam valores estatisticamente similares de proteínas, em ambos os tempos de armazenamento. Quanto aos glúcidos, os requeijões de ambos os tempos de armazenamento também não apresentaram diferenças. A nível energético e no caso dos requeijões avaliados para  $t=0$ , o controlo apresentou um valor superior ao dos requeijões com extrato livre e microencapsulado que, por sua vez, não apresentam diferenças estatisticamente significativas entre eles. Também o requeijão com extrato livre, após 7 dias de armazenamento, demonstrou um valor diferente comparativamente ao controlo e requeijão com extrato microencapsulado.

Foram ainda avaliados e quantificados os ácidos gordos (AG) presentes em cada amostra, uma vez que os lípidos mostraram ser os macronutrientes maioritários nas matrizes alimentares estudadas. No Anexo D encontram-se discriminados os AG individuais identificados em cada uma das amostras, contudo na Tabela 3.13 são apresentados os valores totais de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA).

**Tabela 3.13** – Ácidos gordos saturados, monoinsaturados e polinsaturados (percentagem relativa) dos requeijões controlo, com extrato livre e extrato microencapsulado do tempo inicial e passados 7 dias de armazenamento (média  $\pm$  DP).

	Tempo = 0 dias			Tempo = 7 dias		
	Controlo	Extrato	Microesferas	Controlo	Extrato	Microesferas
SFA	68,60 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	72,52 $\pm$ 0,61 <sup>a</sup>	69,62 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	71,81 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	71,64 $\pm$ 1,02 <sup>a</sup>	71,04 $\pm$ 0,90 <sup>a</sup>
MUFA	26,13 $\pm$ 0,28 <sup>a</sup>	22,95 $\pm$ 0,55 <sup>b</sup>	25,40 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	23,55 $\pm$ 1,01 <sup>a</sup>	23,70 $\pm$ 0,87 <sup>a</sup>	24,12 $\pm$ 1,00 <sup>a</sup>
PUFA	5,27 $\pm$ 0,07 <sup>a</sup>	4,53 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	4,98 $\pm$ 0,06 <sup>b</sup>	4,65 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	4,65 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	4,85 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>

Em cada linha e para cada tempo, letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

A partir da Tabela 3.13 é evidente que em todos os requeijões a gordura que tem maior prevalência é a saturada, sendo seguida pela monoinsaturada e por último a polinsaturada. Os níveis de SFA foram idênticos para todas as amostras para ambos os tempos de armazenamento. Os requeijões controlo e com extrato encapsulado t=0 apresentaram valores de MUFA sem diferenças estatísticas, sendo que requeijão com extrato na forma livre apresentou um valor significativamente inferior. Quanto aos PUFA no t=0 revelaram variações em todos os requeijões apresentando o controlo maior conteúdo de gordura polinsaturada e o requeijão com extrato livre menor. Para o tempo t=7, não se registaram diferenças nos valores de MUFA e PUFA.

Em síntese, pode concluir-se que a incorporação do extrato (na forma livre ou encapsulada) não alterou o valor nutricional dos requeijões. As amostras continuaram a apresentar os lípidos como macronutrientes maioritários com especial contribuição da gordura saturada. Apresentaram também o mesmo perfil de ácidos gordos, com o ácido palmítico (C16:0) como maioritário; os ácidos oleico (C18:1n9) e linoleico (C18:2n6) foram sempre o MUFA e PUFA maioritários, respetivamente (Figura 3.9). Os valores de humidade, cinzas, glúcidos e energia também estiverem sempre dentro dos valores de referência para este tipo de requeijões produzidos industrialmente. Posto isto, a incorporação do extrato torna-se uma vantagem uma vez que aumenta a atividade antioxidante do requeijão não modificando o seu valor nutricional.

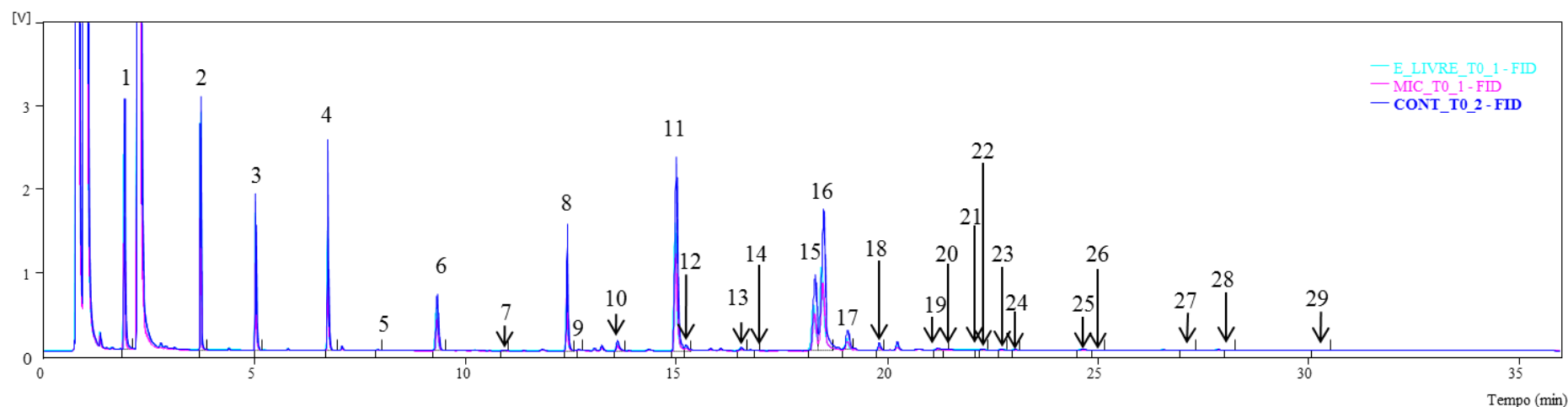


Figura 3.9 - Cromatograma individual dos ácidos gordos das amostras de requeijão controle, requeijão com extrato livre e requeijão com extrato microencapsulado.

1 – C4:0 – ácido butírico, 2 – C6:0 – ácido capróico, 3 – C8:0 – ácido caprílico, 4 – C10:0 – ácido cáprico, 5 – C11:0 – ácido hendecanóico, 6 – C12:0 – ácido láurico, 7 – C13:0 – ácido tridecanóico, 8 – C14:0 – ácido mirístico, 9 – C14:1 – ácido miristoleico, 10 – C15:0 – ácido pentadecanóico, 11 – C16:0 – ácido palmítico, 12 – C16:1 – ácido palmitoleico, 13 – C17:0 – ácido heptadecanóico, 14 – C17:1 – ácido *cis*-10-heptadecanóico, 15 – C18:0 – ácido esteárico, 16 – C18:1n9 – ácido oleico, 17 – C18:2n6 – ácido linoleico, 18 – C18:3n3 – ácido  $\alpha$ -linolénico, 19 – C20:0 – ácido araquídico, 20 – C20:1 – ácido eicosenóico, 21 – C20:3n6 – ácido eicosatrienóico, 22 – C20:4n6 – ácido araquidónico, 23 – C20:3n3 + C21:0 – ácido heneicosanóico, 24 – C20:5n3 – ácido eicosapentaenóico, 25 – C22:0 – ácido beénico, 26 – C22:1n9 – ácido erucíco, 27 – C23:0 – ácido tricosanóico, 28 – C22:6n3 – ácido docosa-hexaenóico, 29 – C24:0 – ácido ligocérico.



## ***4 Conclusões e Trabalho futuro***

Estudos disponíveis na literatura demonstraram que os compostos fenólicos obtidos a partir de algumas espécies de cogumelos comestíveis da região de Trás-os-Montes apresentam diferentes bioatividades, nomeadamente atividade antioxidante e antitumoral. Assim, o desenvolvimento de alimentos funcionais/nutracêuticos a partir destes compostos torna-se atrativo, sendo presentemente pouco explorados. Neste contexto, a microencapsulação dos extratos pode ajudar a ultrapassar problemas de instabilidade e restrições organolépticas, viabilizando a sua utilização mais generalizada no desenvolvimento de alimentos funcionais. Este trabalho, que teve por base a utilização de duas espécies de cogumelos silvestres: *S. luteus* e *C. atramentária* visou contribuir para este objetivo.

Numa primeira fase, foram estudadas as propriedades antioxidantes dos extratos alcoólicos individuais e combinados em diferentes proporções. As combinações tiveram como objetivo verificar a existência de possíveis efeitos sinérgicos. No que respeita à atividade antioxidante esses efeitos foram observados para algumas das combinações. Em particular, as misturas SI:Ca (1:1) e SI:Ca (2:1) revelaram efeitos sinérgicos com valores EC<sub>50</sub> próximos e uma concentração de fenóis totais sem diferença estatística. Não havendo diferenças significativas entre estas duas combinações optou-se por trabalhar com a mistura SI:Ca (1:1). No que respeita à capacidade antitumoral dos extratos, realizada através do ensaio SRB, verificou-se que o extrato de Ca não revelou qualquer tipo de atividade. O extrato SI foi o único que conduziu à diminuição da

proliferação celular em linhas celulares tumorais humanas. Nenhum dos extratos mostrou hepatotoxicidade (culturas primárias de células de fígado de porco).

Numa segunda etapa os extratos SI e Ca individualizados e a combinação SI:Ca (1:1) foram microencapsulados pela técnica de *spray drying* com maltodextrina como agente encapsulante. O extrato de cogumelo foi primeiramente dissolvido em etanol e adicionado com água até obter uma proporção etanol:água de 10:90. A proporção extrato/maltodextrina utilizada foi de 1/20. O processo de encapsulação, realizado num equipamento Büchi mini *spray dryer* B290, teve como temperatura de entrada e saída 170 °C e 95 °C, respetivamente e um caudal de alimentação de 6 mL/min. Estas condições resultaram em bons rendimentos (cerca de 50%) e numa boa eficiência de encapsulação (40 – 60%), sendo esta última determinada por HPLC relativamente ao ácido cinâmico (composto maioritário nos extratos). A morfologia e o tamanho das microesferas foram avaliados por MEV observando-se que a maioria das microesferas apresentou irregularidades na sua superfície. O tamanho registado variou entre os 2 – 50 µm, sendo o tamanho máximo observado nas microesferas SI:Ca (1:1). As microesferas foram ainda sujeitas aos ensaios de atividade antioxidante onde se verificou que o polímero utilizado não interferia na bioatividade do extrato, tendo os valores de EC<sub>50</sub> permanecido semelhantes.

Numa terceira fase, as microesferas foram incorporadas numa matriz alimentar (requeijão). Durante a incorporação das diferentes formas de extratos foi possível verificar que houve uma maior facilidade de homogeneização do requeijão quando se utilizou a forma microencapsulada. O principal objetivo consistiu na avaliação das propriedades antioxidantes do requeijão quando aditivado com o extrato na forma microencapsulada, relativamente à utilização da forma livre. Adicionalmente foi feita a comparação com um requeijão não aditivado (controlo). Nesta avaliação, recorreu-se a dois ensaios para a determinação da atividade antioxidante (atividade captadora de radicais livres - DPPH e PR) em dois tempos distintos: instante inicial (t=0) e após sete dias de armazenamento (t=7) a 4 °C (acondicionamento no frigorífico). Foi observado que para t=0, a atividade antioxidante do requeijão incorporado com extrato livre é superior à do controlo e à do requeijão com extrato microencapsulado, decorrendo este efeito de uma maior disponibilidade do extrato no instante inicial quando este está na sua forma livre. Na análise para t=7 dias constatou-se que houve um aumento dos valores de EC<sub>50</sub>, ou seja, uma redução da atividade antioxidante que pode estar

relacionada com a degradação dos compostos bioativos em contacto direto com a matriz alimentar. Relativamente aos requeijões incorporados com extrato microencapsulado verificou-se uma melhoria da atividade antioxidante ao longo do tempo, podendo esta ser justificada pela proteção efetiva do extrato (protegido pelas microesferas), assim como pela sua libertação gradual. Desta forma, as microesferas aumentaram a biodisponibilidade do extrato conferindo ao alimento uma maior atividade antioxidante no momento da ingestão.

A avaliação do valor nutricional revelou que o requeijão contendo extrato livre e microencapsulado continuou a apresentar os lípidos como os macronutrientes maioritários, com especial contribuição para gordura saturada. Os ácidos gordos, avaliados por GC, revelaram que o ácido palmítico, oleico e linoleico são, respetivamente, os SFA, MUFA e PUFA maioritários. Os valores de humidade, cinzas, glúcidos, energia e cor mantiveram-se dentro dos valores de referência. Em síntese o valor nutricional e a cor não foram afetados pela introdução dos extratos (livres e microencapsulados).

Complementarmente ao trabalho desenvolvido foi estudada a estabilidade dos microencapsulados, comparativamente aos extratos livres, ao armazenamento sob diferentes condições de temperatura (4 °C e 37 °C) e luz. Os estudos foram realizados para um período de tempo de 1 mês e as propriedades antioxidantes avaliados de acordo com dois ensaios diferentes (atividade captadora de radicais livres - DPPH e PR). No final verificou-se que a exposição à temperatura de 37 °C e à luz melhora a atividade antioxidante quer do extrato na forma livre quer microencapsulada. Este fenómeno pode ser justificado pelas condições de stresse a que estão sujeitos durante o armazenamento, potenciando a interação das moléculas antioxidantes. No entanto, quando o extrato livre foi combinado com uma matriz alimentar ocorreu a degradação dos compostos bioativos. No caso do extrato microencapsulado verificou-se uma manutenção das suas propriedades bioativas. Em concreto, ao fim de 7 dias os requeijões enriquecidos com extrato microencapsulado apresentaram uma atividade antioxidante superior validando o efeito protetor da matriz de maltodextrina. Desta forma é possível maximizar a biodisponibilidade dos extratos no momento da ingestão destes alimentos.

Dando seguimento a este trabalho, propõe-se como atividades futuras realizar extrações com solventes diferentes ou utilizar tecnologias mais verdes (extração supercrítica ou

recorrendo à tecnologia de microndas) proporcionando a obtenção de frações de extrato com outras propriedades abrindo um leque de novas aplicações. Adicionalmente, estudar a combinação de outros extratos de cogumelos procurando tirar partido de efeitos sinérgicos ao nível das propriedades antioxidantes e antitumorais ampliando o conceito introduzido neste trabalho.

No que respeita ao processo de microencapsulação, podem testar-se outras matrizes poliméricas, outros métodos que não o *spray drying* e testar diferentes formulações (razão extrato/polímero, concentração da solução atomizada etc.). Outro ponto de interesse seria efetuar a otimização das condições de *spray drying* utilizadas (estas foram baseadas em trabalhos de referência) de forma a obter pós com uma morfologia mais regular. Tal passa, nomeadamente, por estudar as condições de atomização e secagem.

## 5 Referências Bibliográficas

- Ahmed, M., Akter, M. S., Lee, J., & Eun, J. (2010). Encapsulation by spray drying of bioactive components, physicochemical and morphological properties from purple sweet potato. *LWT - Food Science and Technology*, *43*, 1307-1312.
- Alves, M. J., Ferreira, I. C., Dias, J., Teixeira, V., Martins, A., & Pintado, M. (2012). A review on antimicrobial activity of mushroom (Basidiomycetes) extracts and isolated compounds. *Planta Med.*, *78*, 1707-10718.
- Amarowicz, R., Pegg, R., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J. (2004). Free-Radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the *Canadian prairies*. *Food Chemistry*, *84*, 551-562.
- Anthony, K. J., Murugan, M., Jeyaraj, M., Rathinam, N. K., & Sangiliyandi, G. (2014). Synthesis of silver nanoparticles using pine mushroom extract: a potential antimicrobial agent against *E. coli* and *B. subtilis*. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *20*, 2325-2331.
- AOAC. (1995). *Official methods of analysis* (16<sup>th</sup> ed.). Arlington VA, USA: Analytical chemists.
- Azeredo, H. M. (2005). Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, *16*, 89-97.

- Barreira, J. C., Ferreira, I. C., & Oliveira, M. B. (2012). Triacylglycerol profile as a chemical fingerprint of mushroom species: evaluation by principal component and linear discriminant analyses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 10592-10599.
- Barros, L., Baptista, P., Correia, D. M., Casal, S., Oliveira, B., & Ferreira, I. C. (2007). Fatty acid sugar compositions, and nutritional value of five wild edible mushrooms from Northeast Portugal. *Food Chemistry*, *105*, 140-145.
- Barros, L., Cruz, T., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. (2008). Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*, *46*, 2742-2747.
- Barros, L., Venturini, B. A., Baptista, P., Estevinho, L. M., & Ferreira, I. C. (2008b). Chemical composition and biological properties of portuguese wild mushrooms: a comprehensive study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*, 3856-3862.
- BeMiller, J., & Lafayette, W. (1997). Review: Starch modification: challenges and prospects. *Starch: Cereal Research*, *49*, 127-131.
- Brasileiro, J. (2011). *Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas*. UFP - FCS, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Porto.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Reviews*, *56*, 317-333.
- Çam, M., İċyer, N., & Erdogan, F. (2014). Pomegranate peel phenolics: microencapsulation, storage stability and potencial ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, *55*, 117-123.
- Cao, Y., Cao, R., & Brakenhielm, E. (2002). Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *13*, 380-390.
- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15-25.

- Carocho, M., & Ferreira, I. C. (2013 b). The role of phenolic compounds in the fight against cancer. A review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236-1258.
- Carvalho, A., Curvelo, A., & Mattoso, L. (2005). Estudo comparativo de amidos termoplásticos derivados do milho com diferentes teores de amilose. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 15, 566-273.
- Champagne, C. P., & Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18, 184-190.
- Chang, S. T., & Miles, P. G. (2004). *Mushrooms: cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact* (2<sup>nd</sup> ed). USA: CRC Press.
- Costa, L. (27 de 2 de 2012). *Literatura - Maltodextrina*. Obtido de Viafarma: <http://www.viafarmanet.com.br/site/downloads/literatura/MALTODEXTRINA.pdf>
- Crozier, A., Jaganath, I. B., & Clifford, M. N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Natural Product Reports*, 26, 1001-1043.
- Drusch, S., Serfert, Y., Heuvel, A., & Schwarz, K. (2006). Physicochemical characterization and oxidative stability of fish oil encapsulated in an amorphous matrix containing trehalose. *Food Research International*, 39, 807-815.
- Dziki, U. G., Swieca, M., Sulkowski, M., Dziki, D., Baraniak, B., & Czyz, J. (2013). Antioxidant and anticancer activities of *Chenopodium quinoa* leaves extracts - in vitro study. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 154-160.
- Ersus, S., & Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucus carota* L.) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812.
- Estevinho, B. N., Rocha, F., Santos, L., & Alves, A. (2013). Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. *Food Science & Technology*, 31, 138-155.

- Ezhilarasai, P., Indrani, D., Jena, B., & Anandharamakrishnan, C. (2013). Freeze drying technique for microencapsulation of Garcinia fruit extract and its effect on bread quality. *Journal of Food Engineering*, *117*, 513-520.
- Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. Y. (2002). Free radicals, antioxidants and nutrition. *Nutrition*, *18*, 872-879.
- Fang, Z., & Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Food Science & Technology*, *21*, 510-523.
- Fernandes, L., Candido, R., & Oliveira, W. (2012). spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. *Food and Bioproducts Processing*, *90*, 424-432.
- Ferrari, C., Germer, S., Alvim, I., & Aguirre, J. (2013). Storage stability of spray-dried blackberry powder produced with maltodextrin or gum arabic. *Drying technology: An international Journal*, *31*, 470-478.
- Ferreira, I. C., & Abreu, R. M. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, *2*, 32-38.
- Ferreira, I. C., Barros, L., & Abreu, R. M. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, *16*, 1543-1560.
- Ferreira, I. C., Vaz, J., Barros, L., Almeida, G., Martins, A., & Vasconcelos, M. H. (2012). Cogumelos silvestres Portugueses: valorização como alimentos funcionais e fonte de nutracêuticos. In C. d. Montanha (Ed.), *Ciência e Desenvolvimento 2012* (pp. 64-69). Bragança: Instituto Politécnico de Bragança.
- Froufe, H. J., Abreu, R. M., & Ferreira, I. C. (2009). A QCAR model for predicting antioxidant activity of wild mushrooms. *SAR and QSAR in Environmental Research*, *20:5*, 579-590.
- Fu, S., Davies, M. J., Stocker, R., & Dean, R. T. (1998). Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Journal Biochem*, *333*, 519-525.

- García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villares, A., Rostagno, M. A., & Martínez, J. A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, *58*, 537-552.
- Garti, N. (2008). *Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals*. New York: CRC Press.
- Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. *Food Research International*, *40*, 1107-1121.
- Gong, M., Piraino, F., Yan, N., Zhang, J., Xia, M., Ma, J., Liu, X. (2009). Purification, partial characterization and molecular cloning of the novel antiviral protein RC28. *Peptides*, *30*, 654-659.
- Gu, C.-Q., Li, J.-W., Chao, F., Jin, M., Wang, X.-W., & Shen, Z.-Q. (2007). Isolation, identification and function of a novel anti-HSV-protein from *Grifola frondosa*. *Antiviral Research*, *75*, 250-257.
- Guillamón, E., García-Lafuente, A., Lozano, M., D'Arrigo, M., Rostagno, M. A., Villares, A., & Martínez, J. A. (2010). Review: Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*, *81*, 715-723.
- Gunawardena, D., Bennett, L., Shanmugam, K., King, K., Williams, R., Zabarás, D., Munch, G. (2014). Anti-inflammatory effects of five commercially available mushroom species determined in lipopolysaccharide and interferon- $\gamma$  activated murine macrophages. *Food Chemistry*, *148*, 92-96.
- Gutteridge, J. M., & Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *899*, 136-147.
- Hathwar, S., Rai, A., Modi, V., & Narayan, B. (2012). Characteristics and consumer acceptance of healthier meat and meat product formulations - a review. *Food Science Technology*, *49*, 653-664.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, *96*, 67-202.

- Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., Queiroz, M. R., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2012). Phenolic, polysaccharidic, and lipidic fraction of mushrooms from Northeastern Portugal: chemical compounds with antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*, 4634-4640.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2009). Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Microchemical Journal*, *93*, 195-199.
- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, *119*, 1443-1450.
- Heleno, S., Ferreira, I. C., Calheira, R., Esteves, A. P., Martins, A., & Queiroz, M. R. (2014). Cytotoxicity of coprinopsis atramentaria extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. *Food Research International*, *155*, 170-175.
- Jayakumar, T., Thomas, P. A., Sheu, J. R., & Geraldine, P. (2011). Review: In-vitro and in-vivo antioxidant effects of the oyster mushroom *Pleurotus ostreatus*. *Food Research International*, *44*, 851-861.
- Kalac, P. (2009). Chemical composition and nutritional value of European species of wild growing mushrooms: a review. *Food Chemistry*, *113*, 9-16.
- Kha, T., Nguyen, M., & Roach, P. (2010). Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, *98*, 385-392.
- Kjeldahl, J. (1883). Neue methode zurbestimmung des stickstoffs in organischen Korpern. *Zeitschrift fur Analytische Chemi*, *23*, 366-382.
- Kosaraju, S., D'ath, L., & Lawrence, A. (2006). Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, *64*, 163-167.

- Krishnaiah, D., Hiaw, K., Sarbatly, R., Anisuzzaman, S., & Nithyanandam, R. (2012). Spray drying of *Morinha citrifolia* L. and *Beta vulgaris* L. fruit extract and its synergistic effect. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, 3, 380-384.
- Lachance, P. A., Nakat, Z., & Jeong, W. S. (2001). Antioxidants: an integrative approach. *Nutrition*, 17, 835-838.
- Liu, K., Junli, W., Zhao, L., & Wang, Q. (2013). Anticancer, antioxidant and antibiotic activities of mushroom *Ramaria flava*. *Food and Chemical Toxicology*, 58, 375-380.
- Liu, R. H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal of Nutrition*, 134, 3479S-3485S.
- Lule, S. U., & Xia, W. (2006). Food phenolics, pros and cons: a review. *Food Reviews International*, 21:4, 367-388.
- Ma, L., Chen, H., Dong, P., & Lu, X. (2013). Anti-inflammatory and anticancer activities of extracts and compounds from the mushroom *Inonotus obliquus*. *Food Chemistry*, 139, 503-508.
- Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., & Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release - a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 1-21.
- Martins, A., Barros, L., Carvalho, A., Santos-Buelga, C., Fernandes, I., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. (2014). Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food Functional*, 5, 1091-1100.
- Martins, I. M., Barreiro, M. F., Coelho, M., & Rodrigues, A. E. (2014). Review - Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. *Chemical Engineering Journal*, 245, 191-200.

- Moro, C., Palacios, I., Lozano, M., D'Arrigo, M., Guillamón, E., Villares, A., García-Lafuente, A. (2012). Anti-inflammatory activity of methanolic extracts from edible mushrooms in LPS activated RAW 264.7 macrophages. *Food Chemistry*, 130, 350-355.
- Muller, P. S. (2011). *Microencapsulação do óleo essencial de laranja*. Universidade Federal do Paraná, Tecnologia, Curitiba, Brasil.
- Murugesan, R., & Orsat, V. (2012). Spray drying for the production of nutraceutical ingredients - a review. *Food Bioprocess Technology*, 5, 3-14.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, 66, 1022-1037.
- Niki, E. (2010). Review article: Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology & Medicine*, 49, 508-515.
- Ozoemena, K., Stefan, R., Staden, J., & Aboul-Enein, H. (2004). Utilization of maltodextrin based enantioselective, potentiometric membrane electrodes for the enantioselective assay of S-perindopril. *Talanta*, 62, 681-685.
- Palacios, I., Lozano, M., Moro, C., D'Arrigo, m., Rostagno, M. A., Martínez, J. A., Villares, A. (2011). Antioxidant properties of phenolic compounds occurring in edible mushrooms. *Food Chemistry*, 128, 674-678.
- Pereira, D. M., Valentão, P., Pereira, J. A., & Andrade, P. B. (2009). Phenolics: from chemistry to biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.
- Pereira, E. A. (2011). *Contribuição para a investigação química e nutricional de cogumelos do Nordeste de Portugal*. Instituto Politécnico de Bragança, Alimentar, Bragança.
- Pereira, E., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2012). Towards chemical and nutritional inventory of Portuguese wild edible mushrooms in different habitats. *Food Chemistry*, 130, 394-403.
- Pereira, T. (2007). *Microencapsulação do óleo eugenol pelo método de spray drying*. UFSC, QUITTECH, Florianópolis.

- Pinto, A. M. (2009). *Fisiopatologia: Fundamentação e Aplicação*. Lisboa: Lidel.
- Piraino, F., & Brandt, C. R. (1999). Isolation and partial characterization of an antiviral, RC-183, from the edible mushroom *Rozites caperata*. *Antiviral Research*, 43, 67-78.
- Quek, S., Chok, N., & Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing*, 46, 386-392.
- Ramalingum, N., & Mahomoodally, M. (2014). Review - The therapeutic potential of medicinal foods. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2014, 1-18.
- Ré, M. I. (1998). Microencapsulation by spray drying. *Drying Technology: An International Journal*, 16:6, 1195-1236.
- Recife, A. (2013). *Amido retrogradado como excipiente de comprimidos para libertação controlada de fármacos: obtenção e caracterização*. UNESP, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Brasil.
- Reis, F. S., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. (2012). Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 191-197.
- Reis, F. S., Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. (2011). Toward the antioxidant and chemical characterization of mycorrhizal mushrooms from Northeast Portugal. *Journal of Food Science*, 76, C824-C830.
- Ren, L., Hemar, Y., Perera, C., Lewis, G., Krissansen, G. W., & Buchanan, P. K. (2014). Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 3, 41-51.
- Ridnour, L. A., Isenberg, J. S., Espey, M. G., Thomas, D. D., Roberts, D. D., & Wink, D. A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 102, 147-152.
- Rosenberg, M., Kopelman, I., & Talmon, Y. (1985). A scanning electron microscopy study of microencapsulation. *Journal of Food Science*, 50, 139-144.

- Rouch, D. A., Roginski, H., Britz, M. L., & Roupas, P. (2008). Determination of a nitrogen conversion factor for protein content in Cheddar cheese. *International Dairy Journal*, 18, 216-220.
- Saéñz, C., Tapia, S., Chávez, J., & Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*, 144, 616-622.
- Santos, T., Oliveira, M., Sousa, D., Lima, R. T., Martins, A., Ferreira, I. C., & Vasconcelos, M. H. (2014). *Suillus luteus* methanolic extract inhibits proliferation and increases expression of p-H2A.X in a non-small cell lung cancer line. *Journal of Functional Foods*, 6, 100-106.
- Santos, T., Tavares, C., Sousa, D., Vaz, J., Calhella, R., Martins, A., Vasconcelos, M. H. (2013). *Suillus luteus* methanolic extract inhibits cell growth and proliferation of a colon cancer cell line. *Food Research International*, 53, 476-481.
- Silva, C., Ribeiro, A., Ferreira, D., & Veiga, F. (2003). Administração oral de peptídeos e proteínas II. Aplicações de métodos de microencapsulação. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 39, 1-20.
- Siró, I., Kápolna, E., & Kápolna, B. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - a review. *Appetite*, 51, 456-467.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Boyd, M. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 1107-1112.
- Soottitantawat, A., Takayama, K., Okamura, K., Muranaka, D., Yoshii, H., Furuta, T., Linko, P. (2005). Microencapsulation of l-menthol by spray drying and its release characteristics. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 6, 163-170.
- Sousdaleff, M., Baesso, M., Neto, A., Nogueira, A., Marcolino, V., & Matioli, G. (2013). Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: stability, solubility, and food application. *Journal - agricultural and Food Chemistry*, 61, 955-965.

- Souza, J. R., Feitosa, J. P., Ricardo, N. M., Trevisan, M. T., Paula, H. C., Ulrich, C. M., & Owen, R. W. (2013). Spray-drying encapsulation of mangiferin using natural polymers. *Food Hydrocolloids*, 33, 10-18.
- Suave, J., Dallagnol, E., Pezzin, A., Silva, D., Meier, M., & Soldi, V. (2006). *Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas*. UFSC, Departamento de Química, Brasil.
- Tonon, R. V., Brabet, C., & Hubinger, M. D. (2008). Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) power produced by spray drying. 88, 411-418.
- Unekwu, H. R., Audu, J. A., Makun, M. H., & Chidi, E. E. (2014). Phytochemical screening and antioxidant activity of methanolic extract of selected wild edible Nigerian mushrooms. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 1, S153-S157.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int. Journal Biochem*, 39, 44-84.
- Valle, L. G. (2011). Review: Oxidative stress in aging: theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology*, 1, 1-7.
- Vaz, J. A., Ferreira, I. C., Tavares, C., Almeida, G. M., Martins, A., & Vasconcelos, M. H. (2012). *Suillus collinitus* methanolic extract increases p53 expression and causes cell cycle arrest and apoptosis in a breast cancer cell line. *Food Chemistry*, 135, 596-602.
- Vaz, J. A., Heleno, S. A., Martins, A., Almeida, G. M., Vasconcelos, M. H., & Ferreira, I. C. (2010). Wild mushrooms *Clitocybe alexandri* and *Lepista inversa*: in vitro antioxidant activity and growth inhibition of human tumour cell lines. *food and Chemical Toxicology*, 48, 2881-2884.
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1, 1112-1116.

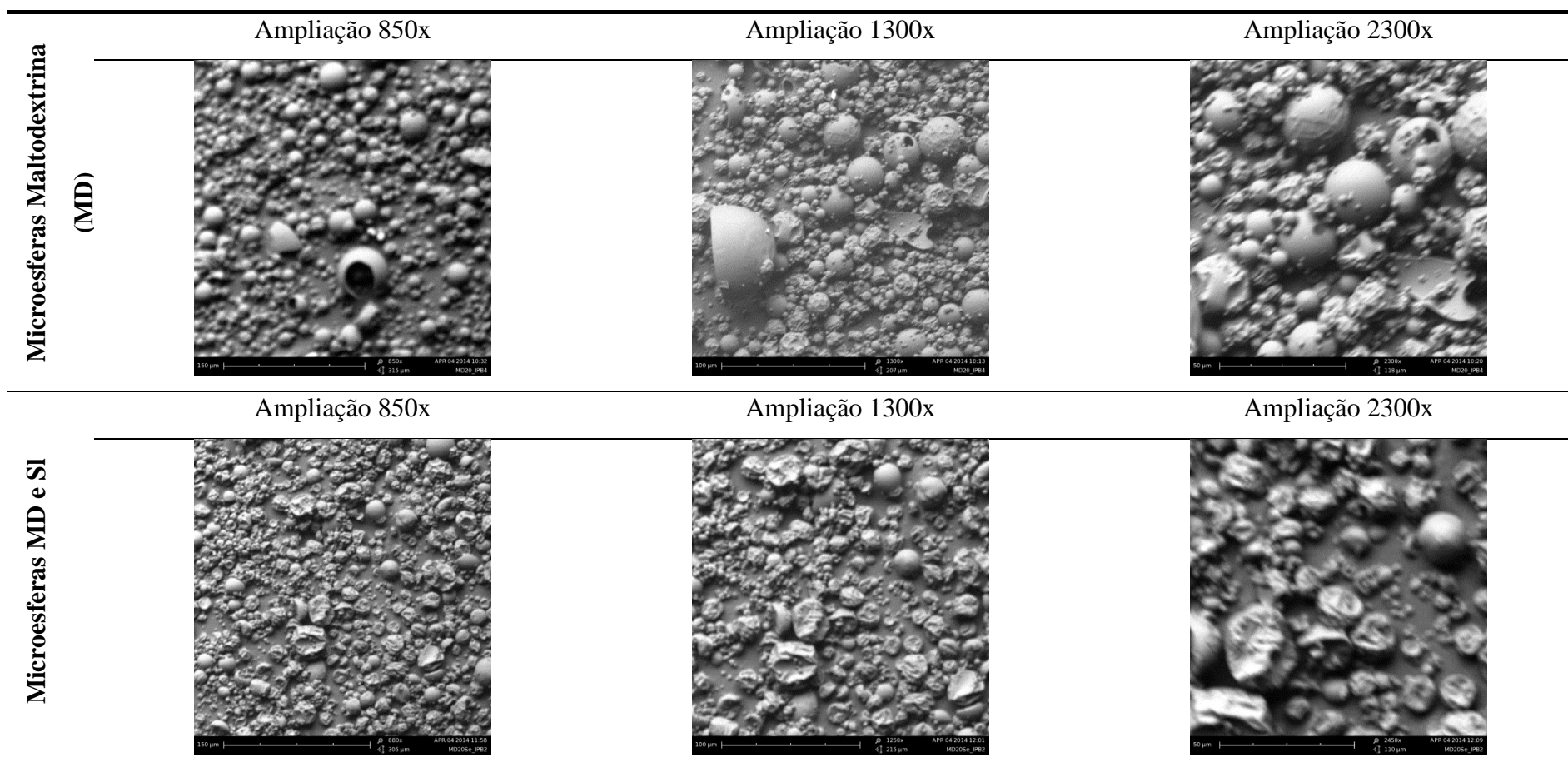
- Vieira, V., Marques, A., Barros, L., Barreira, J. C., & Ferreira, I. C. (2012). Insights in the antioxidant synergistic effects of combined edible mushrooms: phenolic and polysaccharidic extracts of *Boletus edulis* and *Marasmius oreades*. *Journal of Food and Nutrition Research*, *51*, 109-116.
- Webwer, E., & Ehrlein, H. (1998). Glucose and maltodextrin in enteral diets have different effects on jejunal absorption of nutrients, sodium and water and on flow rate in mini pigs. *DTW Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, *105*, 446-449.
- Weerakody, R., Fagan, P., & Kosaraju, S. (2008). Chitosan microspheres for encapsulation of  $\alpha$ -lipoic acid. *International Journal of Pharmaceutics*, *357*, 213-218.
- Wu, Y., Zou, L., Mao, J., Huang, J., & Liu, S. (2014). Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. *Carbohydrate Polymers*, *102*, 497-503.
- Zahra, R., Mehrnaz, M., Farzaneh, V., & Kohzad, S. (2007). Antioxidant activity of extract from a brown alga, *Sargassum boveanum*. *African Journal of Biotechnology*, *6*, 2740-2745.
- Zeller, B., Saleed, F., & Ludescher, R. (1999). Review - Trends in development of porous carbohydrate food ingredients for use in flavor encapsulation. *Food Science Technology*, *9*, 389-394.

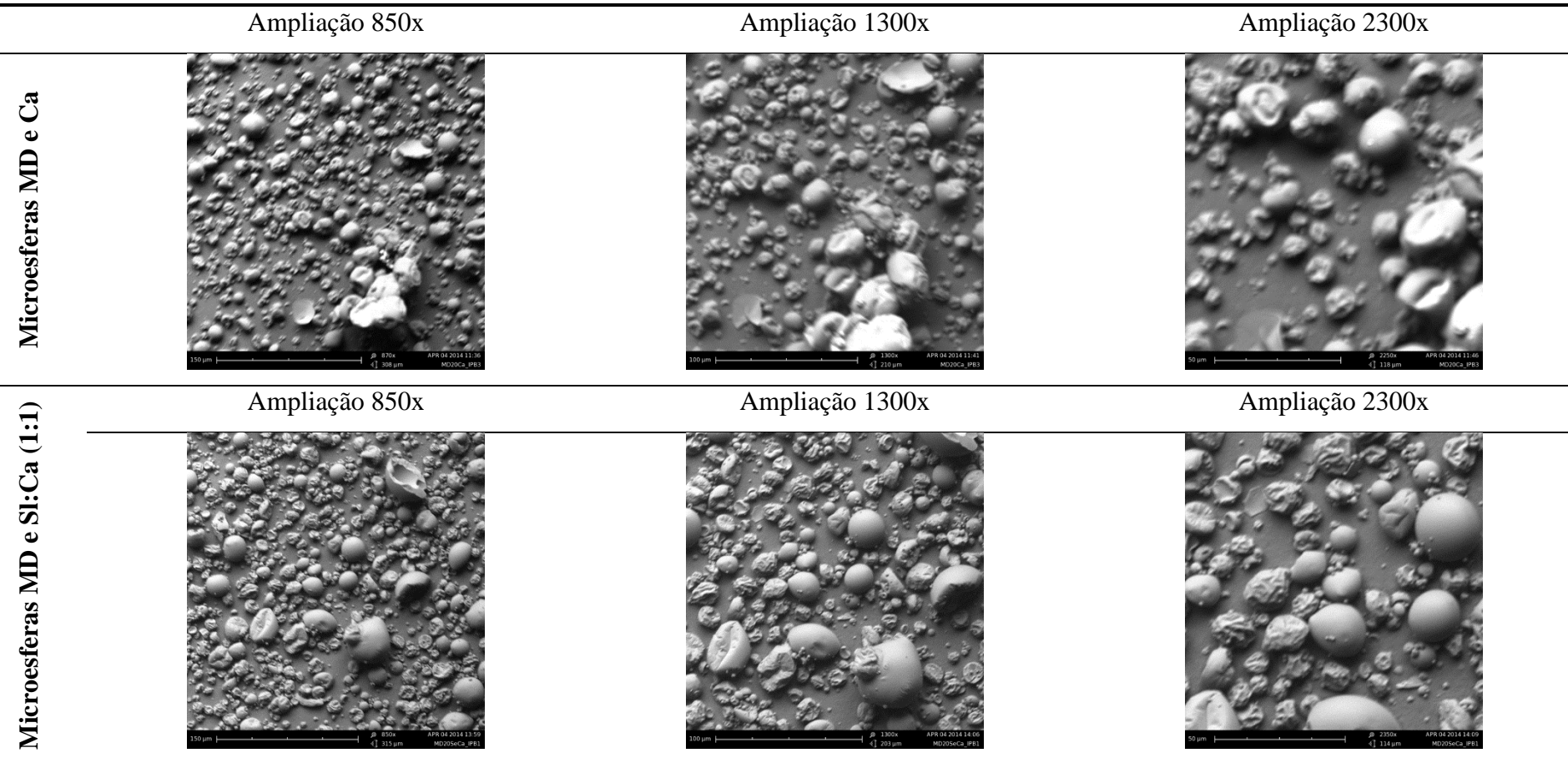
## **6 ANEXOS**



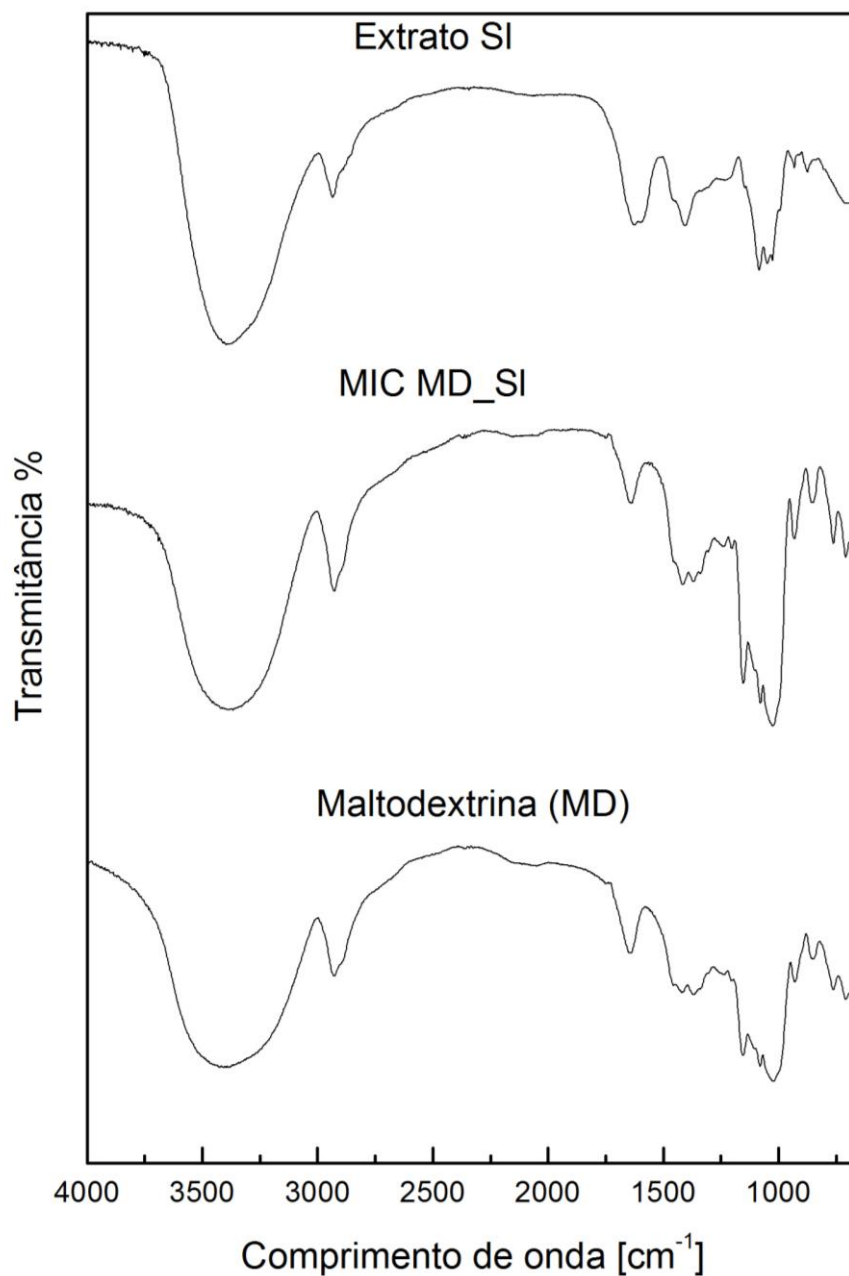
## Anexo A

Tabela .6.1 - Imagens MEV das várias microesferas produzidas por *spray drying*.

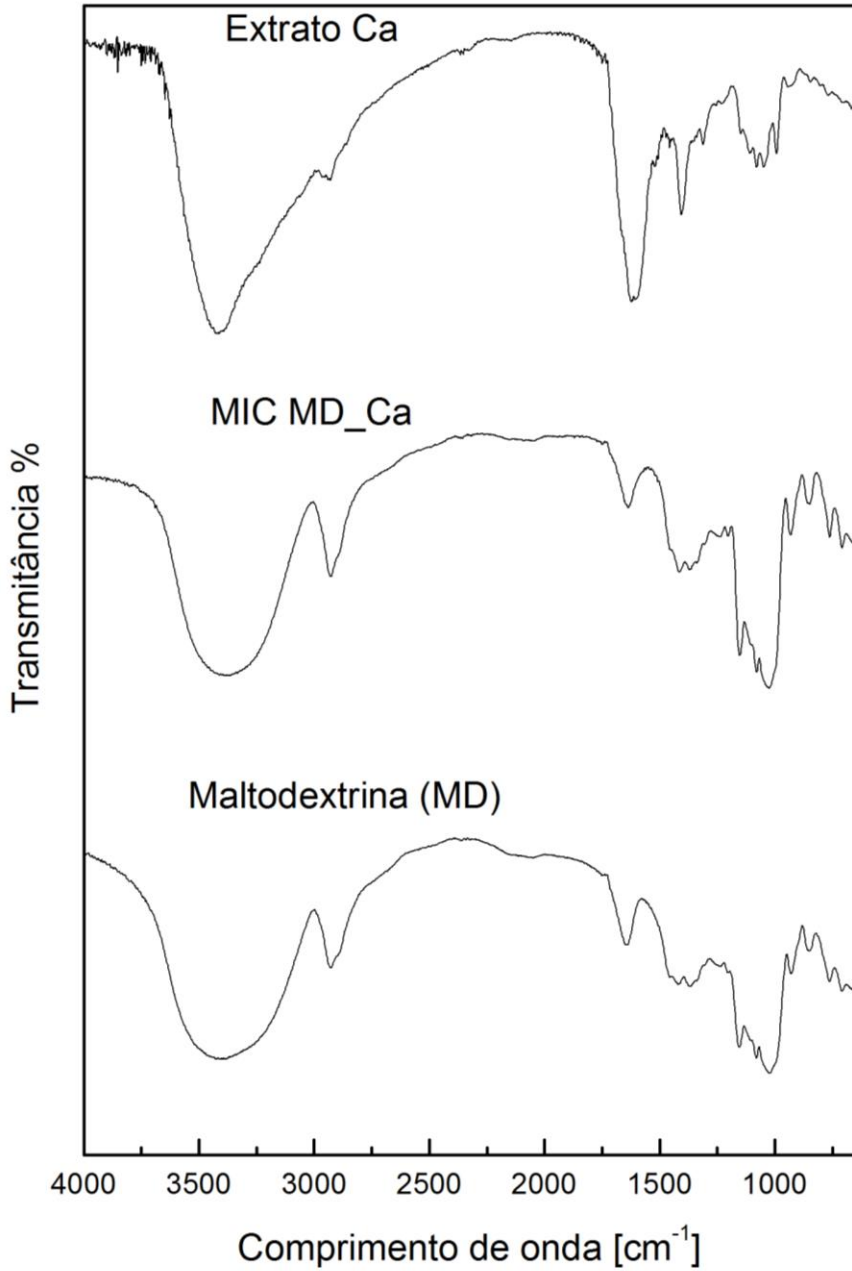




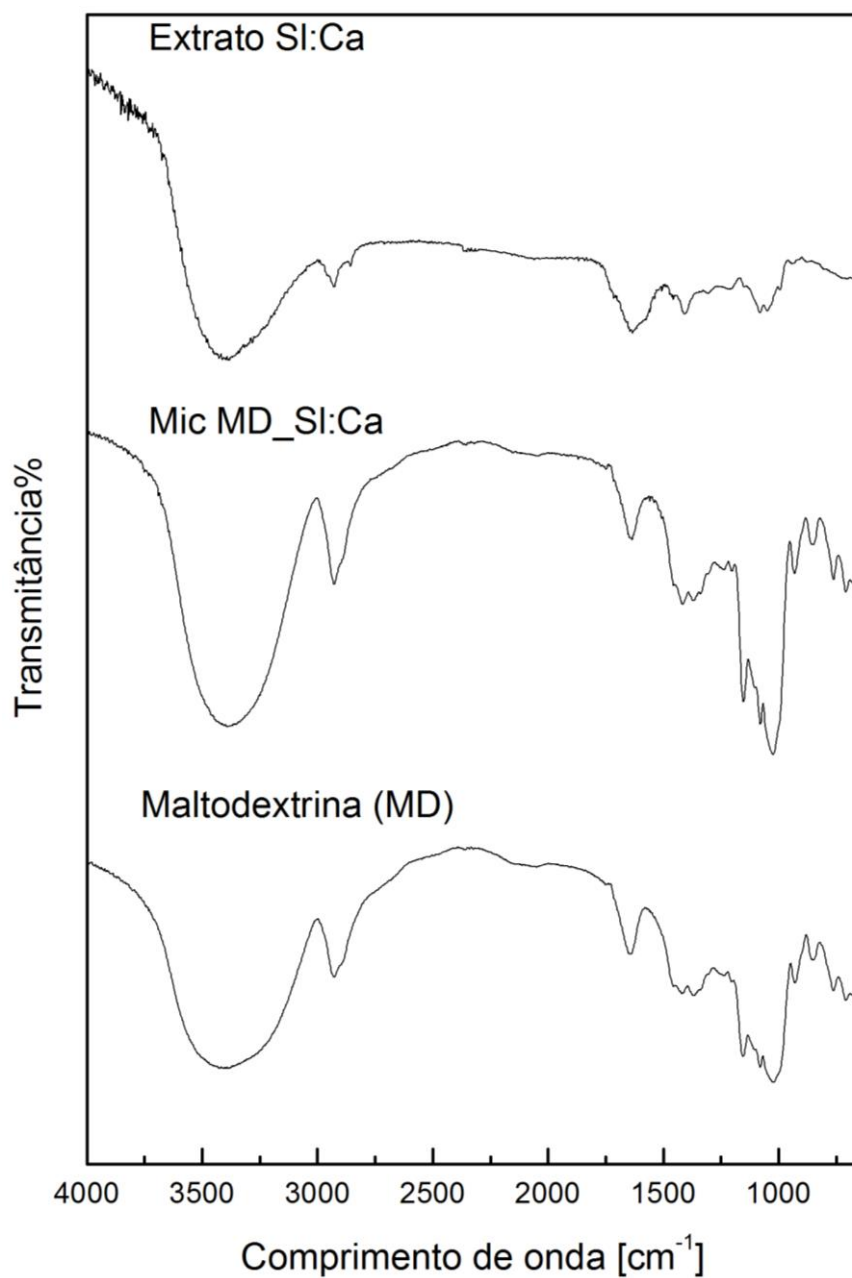
## Anexo B – Espetros FTIR



*Figura 6.1* – Espectro FTIR para o extrato de *Suillus luteus* (SI), SI incorporado com maltodextrina (MD) e também para o polímero utilizado MD.

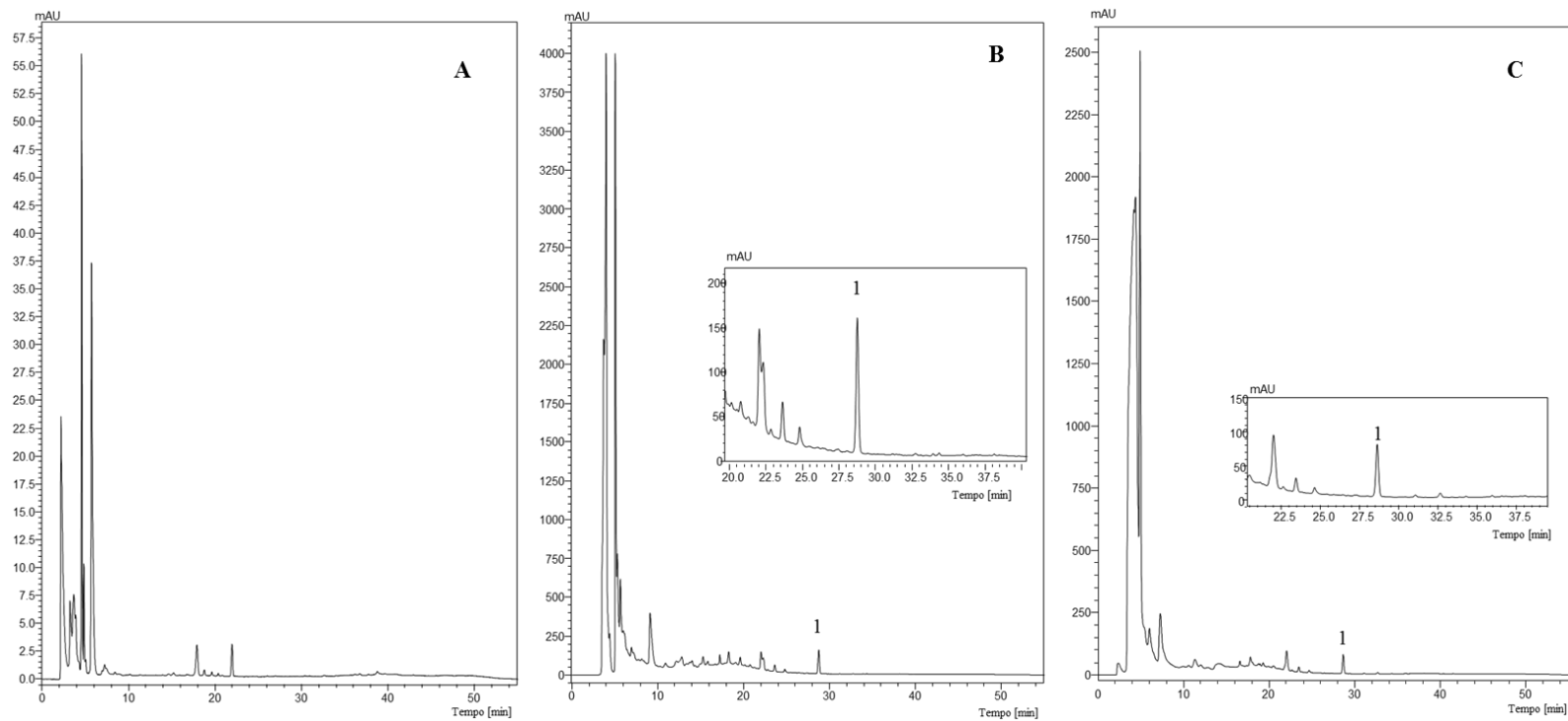


**Figura 6.2** - Espectro FTIR para o extrato de *Coprinopsis atramentaria* (Ca), Ca incorporado com maltodextrina (MD) e também para o polímero utilizado MD.

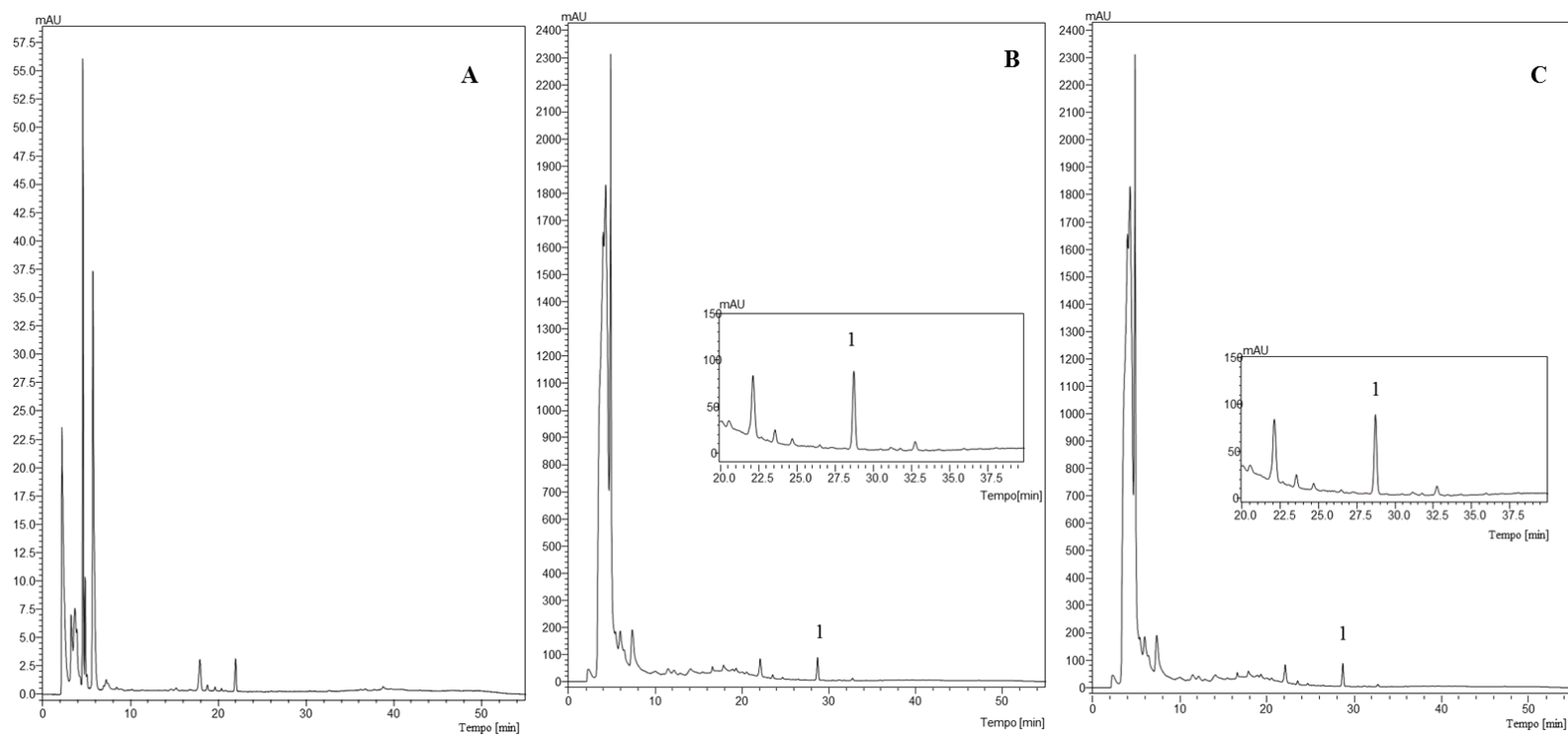


**Figura 6.3** - Espectro FTIR para a mistura de extrato de *Suillus luteus* (SI) e *Coprinopsis atramentaria* (Ca), SI:Ca(1:1) incorporado com maltodextrina (MD) e também para o polímero utilizado MD.

## Anexo C – Cromatogramas HPLC



**Figura 6.4 - A) Cromatograma MD. B) Cromatograma extrato livre Ca. C) Cromatograma Mic com Ca incorporado. 1 – Ácido cinâmico.**



**Figura 6.5** - **A)** Cromatograma MD. **B)** Cromatograma extrato livre SI:Ca(1:1). **C)** Cromatograma Mic com SI:Ca(1:1) incorporado. **1** – Ácido cinâmico.

## Anexo D – Quantificação de ácidos gordos

**Tabela 6.2** – Quantificação de ácidos gordos (percentagem relativa) presentes nos requeijões controlo, com extrato SICA livre e microencapsulado no tempo inicial.

Ácido Gordo	Requeijão Controlo t=0	Requeijão com extrato livre- SICA – t=0	Requeijão com microesferas – SICA – t=0
C4:0	6,56±0,83	9,51±0,50	8,07±0,85
C6:0	4,67±0,42	6,11±0,23	4,84±0,02
C8:0	3,08±0,26	3,83±0,15	3,11±0,09
C10:0	6,64±0,35	7,81±0,26	6,78±0,27
C11:0	0,06±0,00	0,06±0,00	0,06±0,00
C12:0	3,26±0,07	3,54±0,07	3,38±0,13
C13:0	0,07±0,00	0,07±0,00	0,07±0,00
C14:0	7,83±0,04	8,12±0,07	8,11±0,29
C14:1	0,12±0,00	0,12±0,00	0,13±0,00
C15:0	1,02±0,00	1,01±0,02	1,02±0,03
C16:0	20,90±0,02	19,98±0,36	20,55±0,36
C16:1	0,82±0,02	0,83±0,02	0,84±0,01
C17:0	0,83±0,01	0,75±0,03	0,79±0,00
C17:1	0,05±0,00	0,05±0,01	0,05±0,00
C18:0	13,06±0,16	11,25±0,11	12,26±0,06
C18:1n9	24,99±0,06	21,82±0,50	24,21±0,21
C18:2n6	3,46±0,04	3,00±0,03	3,30±0,05
C18:3n3	1,19±0,01	1,02±0,01	1,15±0,01
C20:0	0,34±0,01	0,26±0,00	0,32±0,00
C20:1	0,12±0,00	0,13±0,02	0,14±0,01
C20:3n6	0,03±0,00	0,02±0,00	0,03±0,01
C20:4n6	0,28±0,00	0,23±0,00	0,26±0,00
C20:3n3+C21:0	0,07±0,00	0,06±0,01	0,06±0,00
C20:5n3	0,13±0,01	0,12±0,00	0,12±0,01
C22:0	0,15±0,01	0,11±0,00	0,14±0,00
C22:1n9	0,03±0,00	0,00±0,00	0,03±0,01
C23:0	0,05±0,00	0,04±0,00	0,05±0,00
C22:6n3	0,11±0,01	0,08±0,02	0,06±0,01
C24:0	0,08±0,01	0,05±0,00	0,07±0,00
<b>Soma dos ácidos gordos</b>			
<b>SFA</b>	68,60±0,15	72,52±0,61	69,62±0,28
<b>MUFA</b>	26,13±0,28	22,95±0,55	25,40±0,23
<b>PUFA</b>	5,27±0,07	4,53±0,07	4,98±0,06

**Tabela 6.3** - Quantificação de ácidos gordos (percentagem relativa) presentes nos requeijões controlo, com extrato SICA livre e microencapsulado decorridos 7 dias.

Ácido Gordo	Requeijão Controlo t=7	Requeijão com extrato livre- SICA – t=7	Requeijão com microesferas – SICA – t=7
C4:0	8,55±0,48	7,98±0,81	8,34±0,21
C6:0	5,44±0,52	5,24±0,49	5,06±0,37
C8:0	3,59±0,47	3,50±0,22	3,27±0,31
C10:0	7,77±0,96	7,73±0,32	7,25±0,53
C11:0	0,07±0,01	0,07±0,00	0,06±0,00
C12:0	3,67±0,25	3,71±0,09	3,48±0,09
C13:0	0,08±0,00	0,08±0,00	0,07±0,00
C14:0	8,45±0,06	8,51±0,06	8,12±0,09
C14:1	0,13±0,00	0,13±0,00	0,12±0,00
C15:0	1,06±0,01	1,06±0,00	1,01±0,00
C16:0	20,44±0,66	20,74±0,43	20,74±0,33
C16:1	0,79±0,04	0,78±0,00	0,81±0,02
C17:0	0,77±0,04	0,76±0,04	0,75±0,06
C17:1	0,06±0,00	0,05±0,00	0,06±0,01
C18:0	11,50±0,55	11,84±0,48	12,43±0,13
C18:1n9	22,45±0,97	22,64±0,85	23,02±0,98
C18:2n6	3,09±0,18	3,14±0,10	3,23±0,04
C18:3n3	1,05±0,09	1,07±0,04	1,10±0,02
C20:0	0,29±0,03	0,27±0,01	0,31±0,00
C20:1	0,11±0,01	0,11±0,02	0,12±0,00
C20:3n6	0,02±0,01	0,02±0,00	0,03±0,00
C20:4n6	0,23±0,02	0,18±0,01	0,26±0,01
C20:3n3+C21:0	0,07±0,01	0,06±0,00	0,07±0,01
C20:5n3	0,10±0,00	0,10±0,00	0,11±0,01
C22:0	0,11±0,01	0,12±0,00	0,13±0,02
C22:1n9	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
C23:0	0,04±0,00	0,04±0,00	0,04±0,00
C22:6n3	0,07±0,01	0,09±0,01	0,06±0,04
C24:0	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
<b>Soma dos ácidos gordos</b>			
<b>SFA</b>	71,81±1,32	71,64±1,02	71,04±0,90
<b>MUFA</b>	23,55±1,01	23,70±0,87	24,12±1,00
<b>PUFA</b>	4,65±0,31	4,65±0,15	4,85±0,11



10 – 12 Sept. 2014  
PORTO  
PORTUGAL

**12<sup>th</sup> International Chemical and Biological  
Engineering Conference**

# **BOOK OF EXTENDED ABSTRACTS**



This volume contains the communications presented at the 12<sup>th</sup> International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2014, held in Porto, Portugal, between September 10<sup>th</sup> and 12<sup>th</sup>, 2014.

CHEMPOR 2014 was organized by  
FACULDADE DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO  
&  
ORDEM DOS ENGENHEIROS

Title: **Book of Extended Abstracts of the 12<sup>th</sup> International Chemical and Biological Engineering Conference - CHEMPOR 2014**

**Published by:**  
**Faculdade de Engenharia**  
**Universidade do Porto**

<http://chempor.ordemengenheiros.pt>

Edited by **A. Alves, N. F. Azevedo, J. M. Loureiro, L. M. Madeira, V. B. Oliveira, M. F. R. Pereira, A. M. F. R. Pinto, P. C. R. Pinto, R. J. Santos, A. M. T. Silva**

First edition August 2014

ISBN: 978-972-752-170-8

FEUP Edições

<http://feupedicoes.fe.up.pt>

Universidade do Porto, Faculdade de Engenharia, Departamento de Engenharia Química, Rua Dr. Robertos Frias s/n 4200 - 465 Porto, PORTUGAL

© FEUP

**TABLE OF CONTENTS - ORAL SESSION - BIOLOGICAL ENGINEERING**

<b>3. ORAL SESSION - BIOLOGICAL ENGINEERING</b>	<b>3-1</b>
<b>Membrane reactors in process intensification of mannosylerythritol lipids production from sugars</b>	<b>3-2</b>
O-BE1 M. V. Santos, N.T. Faria, C. Fonseca, F.C. Ferreira	
<b>Effect of Biopolymer Purification Process on the Properties of Exopolysaccharides Membranes for Pervaporation</b>	<b>3-5</b>
O-BE2 I. T. Meireles, C. Portugal, V. D. Alves, J. G. Crespo, I. M. Coelho	
<b>Packed bed enzyme microreactor: application in sucrose hydrolysis as proof-of-concept</b>	<b>3-7</b>
O-BE3 P. Fernandes, F. Carvalho	
<b>Development of Biofiller to Permeable Reactive Barriers for Treatment of Groundwater Polluted with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons</b>	<b>3-9</b>
O-BE4 L. Ferreira, E. Rosales, M.A. Sanromán, M. Pazos	
<b>Development of New Disinfection Solutions Including the Use of Chemical Combinations</b>	<b>3-12</b>
O-BE5 A. Meireles, R. Fulgêncio, I. Machado, F. Mergulhão, L. Melo, M. Simões	
<b>Synthesis and Characterization of a Graphene-based Composite Photocatalyst Applied to the Photoinactivation of Microorganisms</b>	<b>3-15</b>
O-BE6 Pedro Magalhães, Joana Ângelo, Vera M. Sousa, Olga C. Nunes, Luísa Andrade, Adélio Mendes	
<b>Stability evaluation of polymer-liposome complexes for drug delivery systems prepared with bacterial lipids.</b>	<b>3-18</b>
O-BE7 P. Alves, A.A. Hugo, E.E. Tymczynsyn, F. Szymanowski, P.F. Pérez, J.F.J. Coelho, P.N. Simões and A. Gómez-Zavaglia	
<b>Sustainable biosurfactants: Yeast conversion of lignocellulosic biomass into mannosylerythritol lipids</b>	<b>3-21</b>
O-BE8 N.T. Faria, M.V. Santos, C. Ferreira, S. Marques, F.C. Ferreira, C. Fonseca	

---

<b>Phenylboronic Acid Chromatography: Validation and Scale-up of a Multi-modal Process for the Purification of Monoclonal Antibodies</b>	<b>3-23</b>
O-BE9 S.A.S.L. Rosa, R. dos Santos, M. R. Aires-Barros, A. Tover, A.M. Azevedo	
<b>Scalable expansion of neural stem cells supported in electrospun nanofiber scaffolds</b>	<b>3-26</b>
O-BE10 M. C. A. Sousa, C. A. V. Rodrigues, J. M. S. Cabral, F. C. Ferreira	
<b>Enzyme Superactivity Induced by Ionic Liquids Aggregates as the Key for Boosting the Reactions Yield</b>	<b>3-29</b>
O-BE11 P. de Morais, L. D. F. Santos, F. A. e Silva, S.P.M. Ventura, J. A. P. Coutinho	
<b>Detection and Discrimination of Microorganisms Using Locked Nucleic Acid - Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization (LNA-FISH)</b>	<b>3-32</b>
O-BE12 A.S. Azevedo, B. Pereira, C. Almeida, L. Melo, J. Wengel, N.F. Azevedo	
<b>Yeasts identification in microfluidic devices through peptide nucleic acid fluorescence <i>in situ</i> hybridization (PNA-FISH)</b>	<b>3-35</b>
O-BE13 D. Moreira, L. Cerqueira, J. Miranda, N. F. Azevedo	
<b>Extraction of Bovine Serum Albumin (BSA) by Aqueous Biphasic Systems (ABS) composed of Good's buffer ionic liquids</b>	<b>3-38</b>
O-BE14 M. V. Quental, M. Taha, F. A. e Silva, S. P. M. Ventura, M. G. Freire, J. A. P. Coutinho	
<b>Integral production and concentration of surfactin from <i>Bacillus</i> sp ITP-001 by semi-batch foam fractionation</b>	<b>3-40</b>
O-BE15 M. T. S. da Silva, C. M. F. Soares A. S. Lima, C. C. Santana	
<b>Bioethanol Production from Rockrose Pretreated by Steam Explosion</b>	<b>3-43</b>
O-BE16 A.M.R.B. Xavier, M. Ferro, A.F.C Paulino, J. Gravitis, D.V. Evtuguin, M.C. Fernandes	
<b>Spray-drying of <i>Suillus luteus</i> and <i>Cropinopsis atramentaria</i> mushroom alcoholic extracts and its synergistic antioxidant effect</b>	<b>3-46</b>
O-BE17 A. Ribeiro, G. Ruphuy, L. Barros, J. C. Lopes, M. M. Dias, I. C. F. R. Ferreira, M. F. Barreiro	

## Spray-drying of *Suillus luteus* and *Coprinopsis atramentaria* mushroom alcoholic extracts and its synergistic antioxidant effect

O-BE17

A. Ribeiro<sup>1,2</sup>, G. Ruphuy<sup>3</sup>, L. Barros<sup>2</sup>, J. C. Lopes<sup>3</sup>, M. M. Dias<sup>3</sup>, I. C. F. R. Ferreira<sup>2</sup>, M. F. Barreiro<sup>1</sup>. (1) Laboratory of Separation and Reaction Engineering (LSRE) – Associate Laboratory LSRE/LCM, Bragança Polytechnic Institute, Bragança, Portugal; (2) Mountain Research Centre (CIMO), School of Agriculture, Bragança, Portugal; (3) Laboratory of Separation and Reaction Engineering (LSRE) – Associate Laboratory LSRE/LCM, Faculty of Engineering, University of Porto, Porto, Portugal; \*barreiro@ipb.pt.



Mushrooms are widely appreciated all over the world for their nutritional and pharmacological value being sources of important bioactive compounds. In this study the antioxidant potential of *Suillus luteus* and *Coprinopsis atramentaria* mushroom alcoholic extracts, and its synergistic effect, was evaluated before and after being spray-dried with maltodextrin, aiming at its exploitation as functional food ingredients. The antioxidant activity of free and spray-dried extracts was studied *in vitro* by DPPH radical scavenging activity, reducing power and inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching (this only applied with free extracts assays). The encapsulation yield of the spray-drying process was around 50% and efficiency, determined in terms of cinnamic acid, comprised between 40-60%. The evaluation of the antioxidant activity of the combined extracts pointed out for synergistic effects.

### Introduction

Mushrooms are widely appreciated all over the world for their nutritional and/or medicinal properties. Mushrooms are rich in water, minerals, proteins, fibres and carbohydrates, but possess a low fat content (low caloric value). Their reported bioactive properties can be associated with the phenolic, polysaccharidic and lipidic fractions. In what concerns phenolic compounds, they can exhibit a wide range of physiological properties, such as anti-allergenic, anti-atherogenic, anti-inflammatory, antimicrobial, antithrombotic, cardioprotective, and vasodilatory effects, which have been partly related with their antioxidant activity [1].

Apart from its instability at high temperatures, presence of oxygen and light, mushroom extracts are characterized by a strong odour and flavour. One way to ensure its viability as functional food ingredients is to proceed with their microencapsulation, providing protection against oxidation and masking odour and flavour. Despite the numerous available microencapsulation possibilities, spray-drying is still one of the most used processes to encapsulate food ingredients. The main advantages are related to its easy industrialization and continuous production. Nevertheless, care must be taken to avoid prolonged contact with high temperatures, which can compromise bioactive properties [2,3].

Among several possibilities, maltodextrin (MD), a hydrolysed starch, offers various advantages as microencapsulation material. It has a low cost, neutral aroma and flavour, high water solubility,

low viscosity at high solids contents and provides an effective protection against oxidation [4,5].

In the present work, the antioxidant potential of *Suillus luteus* (L.: Fries) Gray and *Coprinopsis atramentaria* (Bull.) Redhead, Vilgalys & Moncalvo mushroom alcoholic extracts, and its synergistic effect, was evaluated before and after being spray-dried with maltodextrin, aiming at its exploitation as functional food ingredients. The potential synergistic effects were primarily evaluated based on the free extracts (DPPH radical scavenging activity, reducing power and inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching) and thereafter with the encapsulated homologue. Powders obtained by spray-drying were characterized by SEM (morphological and size analysis), FTIR, encapsulation yield (EY), encapsulation efficiency (EE) and antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity and reducing power).

### Materials and methods

**Preparation of alcoholic extracts:** The lyophilized mushroom samples (1.5 g) were extracted with methanol (30 mL) at room temperature during 2h under stirring. The extract was filtered through a Whatman paper filter N° 4 and the remaining residue subjected to an additional extraction. The combined methanolic extracts were evaporated at 40 °C in a rotary evaporator until dryness, re-dissolved in methanol at a concentration of 20 mg/mL and stored at 4 °C for antioxidant properties evaluation. For spray-drying purposes, the extract was lyophilized and stored in a desiccator protected against light. Two

mushroom extracts have been produced: *Suillus luteus* (Sl) and *Coprinopsis atramentaria* (Ca).

#### Preparation of solutions for spray-drying:

The mushroom extracts (1 g) were dissolved firstly in ethanol (10 mL) followed by water addition (90 mL) to achieve a homogenous solution. Thereafter 20 g of MD with a dextrose equivalent (DE) of 18 was added under stirring. The used conditions were adapted from the best ones achieved in the work of Wu and co-workers [2] resulting in a ratio extract/maltodextrin of 1/20 (w/w) and a solids content around 20% (w/w). Solutions of MD alone, the two individual mushrooms and a combination of both (Sl:Ca of 1:1) were prepared.

**Spray-drying of solutions:** A Büchi mini spray dryer B-290 was used operating at the following conditions (also based on [2]): inlet temperature 170 °C, outlet temperature 95 °C, aspiration at 90% and pump at 20% (6 mL/min). The equipment was connected to a condenser and nitrogen was used due to the present of organic solvents in the atomized solutions. The nozzle size was 0.7 mm and the atomized volume 100 mL.

**Evaluation of antioxidant properties of free and spray-dried extracts:** Antioxidant properties were evaluated through DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) radical scavenging activity, reducing power and inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching following the methodologies well established at CIMO and found elsewhere [1]. The inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching method was only applied with the free extracts. The results are expressed as the extract concentration (mg/mL) yielding 50% of antioxidant activity or 0.5 of absorbance in reducing power assay ( $EC_{50}$ ).

**Characterization of spray-dried extracts:** In addition to antioxidant activity, powders obtained by spray-drying were characterized by SEM (morphological and size analysis) and FTIR. Encapsulation yield (EY) was calculated as the ratio between the obtained microcapsules weight and the atomized one. Encapsulation efficiency (EE) was determined by HPLC-DAD as the ratio between the experimentally determined encapsulated extract, in terms of cinnamic acid (the major compound identified in the extracts), and the theoretical one.

#### Results

DPPH radical scavenging activity, reducing power and inhibition of  $\beta$ -carotene bleaching  $EC_{50}$  values obtained with free extracts are presented in the Table 1. Comparing the individual mushroom extracts, we can notice that Sl has the highest antioxidant activity, as shown by the obtained lower  $EC_{50}$  values for all the performed assays. Additionally, the combination Sl:Ca of 1:1

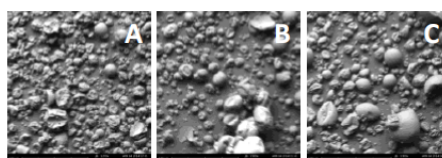
exhibited a synergistic effect. This tendency was corroborated by the tests performed with other Sl:Ca ratios (1:2 and 2:1) (data not shown).

The microparticles produced by spray-drying showed a good encapsulation yield and encapsulation efficiency (Table 2). The obtained powders were lightly yellow in colour and the mushroom aroma was masked (qualitative evaluation). Although the FTIR analysis was inconclusive due to the predominant influence of MD in the obtained spectra (data not shown) the HPLC analysis showed that the extract was retained after spray-drying. Moreover based on preliminary tests, bioactivity was also retained.

In what concerns SEM analysis (Figure 1), the obtained microparticles showed a heterogeneous size distribution (particles with sizes comprised between 2 and 50  $\mu$ m were registered). A mixture of particles with round shape, both with smooth or rough surface, can be noticed. The appearance of teeth or invaginations on the particles surface can be attributed to a rapid evaporation of water during the drying process [2]. Nevertheless, differences were observed as a function of the encapsulated extracts. Particles with rough surface are predominant in the assay performed with Sl extract, being almost absent in the one done with the mixture Sl:Ca (1:1). Also, a higher particle size was registered for this last case.

**Table 2.** Encapsulation yield (EY) and efficiency (EE) obtained with individual extracts and a combination.

Extract	EY (% w/w)	EE (% w/w)
Sl	55.2	62.6
Ca	51.8	43.5
Sl:Ca (1:1)	47.1	59.8



**Figure 1.** SEM analysis of microparticles containing Sl (A), Ca (B) and the mixture Sl:Ca (1:1) (C) under a magnification of 1300X.

#### Conclusions

In this work, the antioxidant activity of Sl and Ca alcoholic extracts was evaluated being observed that their combination results in synergistic effects. The spray-drying of the extracts using an extract/maltodextrin ratio of 1/20 and an inlet temperature of 170 °C resulted in a good yield (around 50%) and good encapsulation efficiency (40-60%). In conclusion, this study could help to promote the use of mushroom extracts as functional food ingredients.

**Table 1.** Antioxidant activity values expressed as  $EC_{50}$  (mg/mL) for free individual extracts and a combination of both (SI:Ca (1:1)). Results are presented as average $\pm$ SD calculated from 3 replicas.

Assay	SI	Ca	SI:Ca (1:1)		
			Theoretical (*)	Experimental	Effect
DPPH scavenging activity	2.86 $\pm$ 0.02	4.62 $\pm$ 0.10	3.70	3.49 $\pm$ 0.13	SE
Reducing Power	0.97 $\pm$ 0.02	1.11 $\pm$ 0.02	1.00	1.05 $\pm$ 0.02	AE
Inhibition of $\beta$ -carotene bleaching	1.64 $\pm$ 0.20	5.28 $\pm$ 0.36	3.50	1.46 $\pm$ 0.04	SE

(\*) The theoretical values were calculated as the weighted average of the individual values ( $EC_{50,theoretical}=0.5*EC_{50,SI}+0.5*EC_{50,CA}$ ); SE (Synergistic Effect) means that the experimentally determined antioxidant activity is 5% higher ( $EC_{50}$  value 5% lower) than the theoretical one, AE (Additive Effect) means that the difference is lower to 5%.

#### Acknowledgements

Financial support was provided by FCT and FEDER under Programme COMPETE (LSRE: Project PEst-C/eqB/LA0020/2013 and CIMO: PEst-OE/AGR/UI0690/2011) and QREN, ON2 and FEDER (Project NORTE-07-0162-FEDER-000050). G. Ruphuy thanks Universidad de Costa Rica (UCR) and Ministerio de Ciencia, Tecnología y Telecomunicaciones de Costa Rica (MICITT) for her scholarship and L. Barros FCT for her contract (Compromisso para a Ciência 2008). A special thanks to Cargill for having provided us with the maltodextrin sample used in this work (reference C\*Dry MD 01915).

#### References

- [1] S. Heleno, L. Barros, A. Martins, M. Queiroz, C. Buelga, I. Ferreira, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (2012) 4634-4640.
- [2] Y. Wu, L. Zou, J. Mao, J. Huang, S. Liu, *Carbohydrate Polymers*, 102 (2014) 497-503.
- [3] A. Gharsallaoui, G. Roudaut, O. Chambin, A. Voilley, R. Saurel, *Food Research International*, 40 (2007) 1107-1121.
- [4] S. Ersus, U. Yurdagel, *Journal of Food Engineering*, 80 (2007) 805-812.
- [5] C. Saénz, S. Tapia, J. Chávez, P. Robert, *Food Chemistry*, 114 (2009) 616-622.

