

**Encapsulação de um extrato hidroalcoólico de *Rosa micrantha*  
Borrer ex Sm para fins alimentares**

**Joana Santos Viegas**

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

Orientado por

**Professora Doutora Isabel Cristina F. R. Ferreira**

**Professora Doutora Filomena Barreiro**

**Bragança**

**2013**

## Agradecimentos

Gostaria de agradecer a algumas pessoas o contributo de cada uma delas para a conclusão deste trabalho.

Gostaria primeiramente de agradecer a orientação da Doutora Isabel Ferreira e da Doutora Filomena Barreiro e os conhecimentos e experiência partilhados.

À Doutora Isabel Fernandes pelo apoio técnico e moral e à Doutora Lilian Barros pela atenção e ajuda proporcionada.

Agradeço à Professora Doutora Ana Carvalho pela recolha e identificação da amostra vegetal já utilizada e caracterizada quimicamente pelo grupo de investigação em trabalhos anteriores.

Gostaria ainda de agradecer aos meus pais e irmão pelo apoio ao longo de todo este trabalho e pela ajuda em todos os aspetos da minha vida académica.

Aos meus amigos, Joana Rocha, Rafaela Fonseca, Sara Lopes Helena Pires, Sandra Luzio, Catarina Pires e Alzira Sarmiento por todos os momentos inesquecíveis e pela companhia nesta fase da minha vida.

Por último agradeço a todas as pessoas, que de forma direta ou indireta permitiram a conclusão deste trabalho.

A todos um MUITO OBRIGADO!!

# Índice

|  |     |
|--|-----|
| Agradecimentos .....   | i   |
| Lista de figuras .....   | iv  |
| Lista de Tabelas .....   | vi  |
| Lista de abreviaturas .....  | vii |
| Resumo .....   | ix  |
| Abstract.....  | x   |
| 1. Introdução.....   | 1   |
| 1.1 Motivação e objetivos .....  | 2   |
| 1.2 Organização da tese .....  | 3   |
| 2. Revisão Bibliográfica.....  | 4   |
| 2.1. Compostos fenólicos.....  | 5   |
| 2.1.1. <i>Stress</i> oxidativo e produção de radicais livres.....            | 5   |
| 2.1.2. Aspectos químicos e bioativos dos compostos fenólicos.....            | 6   |
| 2.1.3. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos .....                      | 11  |
| 2.1.4. <i>Rosa micrantha</i> como fonte de compostos fenólicos .....         | 12  |
| 2.2 Microencapsulação de compostos fenólicos.....                            | 14  |
| 2.2.1 Conceito de microencapsulação .....                                    | 14  |
| 2.2.2. Materiais encapsulantes .....   | 15  |
| 2.2.3. Alginato .....  | 16  |
| 2.2.4. Técnicas de microencapsulação.....                                    | 19  |
| 2.3. Incorporação de compostos fenólicos em alimentos .....                  | 21  |
| 2.3.1. Interesse e vantagens .....   | 21  |
| 2.3.2. Microencapsulação de extratos fenólicos .....                         | 22  |
| 3. Materiais e métodos .....   | 25  |
| 3.1. Materiais .....   | 26  |
| 3.1.1. Materiais utilizados no processo de microencapsulação .....           | 26  |
| 3.1.2. Materiais utilizados para a avaliação da atividade antioxidante.....  | 26  |
| 3.2 Métodos .....  | 26  |
| 3.2.1. Processo de encapsulação .....  | 26  |
| 3.2.2 Obtenção e microencapsulação do extrato de <i>Rosa micrantha</i> ..... | 28  |

---

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 3.2.3. | Caracterização das microesferas.....   | 29 |
| 3.2.4. | Incorporação do extrato de <i>Rosa micrantha</i> encapsulado e livre num iogurte natural ..... | 31 |
| 3.2.5. | Avaliação <i>in vitro</i> das propriedades antioxidantes do iogurte.....                       | 32 |
| 4      | Resultados e discussão .....   | 34 |
| 4.1    | Processo de encapsulação .....   | 35 |
| 4.1.1. | Desenvolvimento do processo .....  | 35 |
| 4.1.2  | Eficiência de microencapsulação.....   | 38 |
| 4.2.   | Microencapsulação do extrato de <i>Rosa micrantha</i> .....                                    | 39 |
| 4.3    | Testes de reidratação.....   | 42 |
| 5.     | Conclusões e perspetivas de trabalho futuro .....  | 47 |
| 5.1.   | Conclusões e perspetivas de trabalho futuro.....   | 48 |
| 6.     | Referências bibliográficas .....   | 50 |
| 7.     | Anexos.....  | 61 |

## Lista de figuras

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 2.1.</b> <i>Rosa micrantha</i> Borrer ex Sm.: 1. Pétalas removidas de botões florais (detalhe do botão) (parte da planta utilizada no presente trabalho); 2. Flor fertilizada; 3. Detalhe dos frutos de flores fertilizadas; 4. Frutos verdes e detalhe dos pelos glandulares; 5. Frutos amadurecidos; 6. Planta apresentando frutos completamente amadurecidos no final do Outono (in Guimarães et al. 2010)..... | 13 |
| <b>Figura 2.2.</b> Principias morfologias das micropartículas (in Munin e Edwards-Lévy, 2011).....   | 15 |
| <b>Figura 2.3.</b> Componentes do alginato: (a) $\alpha$ -L-ácido gulurónico (G), (b) $\beta$ -D-ácido manurónico, (M), (c) Estrutura química (in Souza et al., 2008)..  | 17 |
| <b>Figura 2.4.</b> Representação de gel de alginato utilizando o ião $Ca^{2+}$ como agente reticulante (adaptado de Lee e Mooney, 2012).....   | 18 |
| <b>Figura 3.1.</b> Representação esquemática e fotográfica do sistema NISCO Var J30. ....  | 27 |
| <b>Figura 3.2.</b> Representação esquemática do processo otimizado para produção de microesferas de alginato. ....   | 28 |
| <b>Figura 4.1.</b> Evolução da morfologia das microesferas (Cat_008) durante o processo para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 4 h de consolidação (B).....  | 39 |
| <b>Figura 4.2.</b> Preparação das microesferas por atomização/coagulação. ....   | 39 |
| <b>Figura 4.3.</b> Evolução da morfologia das microesferas durante o processo de microencapsulação (ensaio RM_002) para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 4 h de consolidação (B). ....  | 40 |
| <b>Figura 4.4.</b> Espetro FTIR do alginato, extrato <i>R. micrantha</i> e respectivas microesferas. ....  | 42 |
| <b>Figura 4.5.</b> Processo de reidratação das microesferas de catequina (ampliação de 40x, 100x e 400x): Microesferas liofilizadas (A) e Microesferas após 24 h reidratação (B). ....   | 43 |
| <b>Figura 4.6.</b> Processo de reidratação das microesferas de extrato <i>R. micrantha</i> (ampliação de 40x, 100x e 400x): Microesferas liofilizadas (A) e Microesferas após 24 h reidratação (B). ....   | 44 |

---

**Figura 4.7.** *Incorporação de microesferas num iogurte natural para uma ampliação de 40X, 100X e 400X: (A) para t=0 dias, (B) para t=3 dias. A seta branca põe em evidência as estruturas microencapsuladas. .... 45*

## Lista de Tabelas

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 2.1.</b> <i>Esqueletos estruturais básicos de compostos fenólicos (adaptado de Crozier et al., 2009).</i> .....  | 7  |
| <b>Tabela 2.2.</b> <i>Fontes alimentares de compostos polifenólicos vegetais (adaptado de Ignat e Popa, 2011).</i> .....   | 8  |
| <b>Tabela 2.3.</b> <i>Material para uso na área alimentar (adaptado de Munin e Edwards-Lévy, 2011).</i> .....  | 16 |
| <b>Tabela 2.4.</b> <i>Aplicações e funcionalidade do alginato (adaptado de Draget e Taylor, 2011).</i> .....   | 18 |
| <b>Tabela 2.5.</b> <i>Técnicas de microencapsulação (adaptado de Munin e Edwards-Lévy, 2011).</i> .....  | 19 |
| <b>Tabela 2.6.</b> <i>Tecnologias aplicadas na encapsulação de extratos naturais</i> .....   | 23 |
| <b>Tabela 2.7.</b> <i>Tecnologias aplicadas na encapsulação de catequinas</i> .....  | 24 |
| <b>Tabela 4.1.</b> <i>Ensaio realizado na otimização das condições de microencapsulação.</i> .   | 36 |
| <b>Tabela 4.2.</b> <i>Ensaio realizado para otimização de condições do processo de microencapsulação.</i> .....  | 40 |
| <b>Tabela 4.3.</b> <i>Atividade antioxidante de iogurte natural enriquecido com extrato <i>Rosa micrantha</i> livre e encapsulado (média <math>\pm</math> SD).</i> ..... | 46 |

## Lista de abreviaturas

**am** Amostra

**A<sub>DPPH</sub>** Absorvância da solução de DPPH

**A<sub>S</sub>** Absorvância da solução que contém a amostra

**b-CD** b-ciclodextrina

**CAT** Catalase

**CDs** Ciclodextrinas

**DPPH** 2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo

**EC<sub>50</sub>** Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor

**EE** Eficiência de encapsulação

**EGCg (-)**-epigallocatequina galato

**EUA** Estados Unidos da América

**FDA** Administração Federal de alimentos e medicamentos (Food and Drug Administration)

**FTIR** Infravermelho por transformada de Fourier

**GPx** Glutathione-peroxidase

**GRAS** Geralmente reconhecidos como seguros (Generally regarded as safe)

**GSH** Glutathione

**HDL** Lipoproteína de alta densidade

**HPLC** Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

**LDL** Lipoproteína de baixa densidade

**LSRE-IPB** Laboratório de Processos de Separação e Reação-Instituto Politécnico de Bragança

**MIC** Microesferas

**MO** Microscopia ótica

**m/m** Relação massa/massa

**m/v** Relação massa/volume

**Mp.a.i.** Massa princípio ativo teórico

**Mp.a.ne** Massa princípio ativo não encapsulado

**MTPT** 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina

- n.a.** Não aplicável  
**p.a.** Princípio ativo  
**p. ex.** Por exemplo  
**ROS** Espécies Reativas de Oxigénio  
**RNS** Espécies Reativas de Nitrogénio  
**rpm** Rotações por minuto  
**RSA** Atividade captadora de radicais  
**s.a.** Solução de alginato  
**s.c.** Solução de coagulação  
**SD** Desvio padrão  
**SOD** Superoxido-dismutase  
**TPP** Tripolifosfato  
**U.V.** Ultravioleta  
**v/v** Relação volume/volume

## Resumo

Os extratos de plantas são fontes abundantes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes reconhecidas. Dados os benefícios que aportam para a saúde humana, estes assumem grande relevância na indústria alimentar, nomeadamente no desenvolvimento de alimentos funcionais. No entanto, estes compostos de reconhecida instabilidade, podem sofrer alterações durante o processamento dos alimentos onde são incorporados e após processos metabólicos. Neste contexto, a microencapsulação possibilita a proteção destes antioxidantes naturais, permitindo ainda a sua libertação controlada. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes do extrato hidroalcoólico de *Rosa micrantha* Borrer ex Sm na sua forma livre e microencapsulada quando incorporados num iogurte natural. Para o efeito, foram preparadas microesferas de alginato utilizando uma técnica de microencapsulação por atomização seguida de coagulação. O processo foi otimizado numa primeira fase utilizando a catequina como composto modelo, sendo posteriormente aplicada ao extrato de *R. micrantha*. Quando comparada com o seu homólogo microencapsulado, a incorporação direta do extrato de *R. micrantha* conduziu a produtos com atividade antioxidante inicial superior (avaliação para  $t=0$ ) tendo-se verificado a sua diminuição para  $t=3$  dias o que foi associado à sua degradação. Os iogurtes aditivados com o microencapsulado mostraram um ligeiro incremento da atividade antioxidante para o período em análise tendo sido esta melhoria associada à libertação do extrato a partir das microesferas. Assim, o processo de microencapsulação parece favorecer a manutenção da atividade antioxidante do extrato através da sua proteção na matriz de alginato e posterior libertação faseada no tempo. A observação por Microscopia ótica das microesferas incorporadas na matriz de iogurte permitiu comprovar que os “reservatórios” de alginato se mantêm estáveis para o período em análise apontando para a viabilidade da utilização deste material para a aplicação em estudo. Os estudos de reidratação comprovaram ainda uma boa capacidade de recuperação de água por parte das microesferas liofilizadas, característica importante para a aplicação em desenvolvimento.

## Abstract

Plant extracts are abundant sources of phenolic compounds with recognized antioxidant properties. Given their benefits to human health, they assume a great importance in the food industry, namely in the development of functional foods. However, these compounds of known instability may suffer modifications during food processing and after metabolic processes. In this context, microencapsulation enables the protection of these natural antioxidants, allowing also their controlled release. This study aimed to evaluate the antioxidant properties of *Rosa micrantha* Borrer ex Sm hydroalcoholic extract in its free and microencapsulated form when incorporated into natural yogurt. For this purpose, alginate microspheres were prepared using a spray/coagulation microencapsulation technique. The process was optimized initially using catechin as a model compound, and subsequently applied to *R. micrantha* extract. When compared with its microencapsulated counterpart, the direct incorporation of the *R. micrantha* extract led to products with higher initial antioxidant activity (assessment for  $t=0$ ) followed by a reduction for  $t=3$  days, which was related with its degradation. The yogurts added with the microencapsulated extract showed a slight antioxidant activity increase in the analyzed time period, being this improvement associated with the release of the extract from the microspheres. Thus, the microencapsulation process seems to favor the maintenance of the extract antioxidant activity through its protection on an alginate matrix and its subsequent time-phased release. Microscopic observation of the microspheres incorporated in the yogurt allowed confirming that the alginate “shells” remained stable during the 3-day period of analysis thus pointed out for the viability of using this material for the application under study. Rehydration studies based on freeze-dried microspheres have shown a good ability of water recovery of the produced microparticles, important feature for the application under development.

# 1. Introdução



## 1.1 Motivação e objetivos

A sociedade atual procura alimentos que sejam não apenas nutricionalmente equilibrados, mas que apresentem também caráter funcional, isto é, alimentos com capacidade para beneficiar claramente a saúde do consumidor. Neste contexto, as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos realçam a importância dos extratos naturais que os contêm, podendo atuar como coadjuvantes na prevenção de certas doenças. No entanto, é necessário primeiramente superar certas fragilidades destes compostos nomeadamente, o seu sabor amargo e a sua instabilidade durante o metabolismo e trânsito intestinal. Neste contexto, a proteção dos compostos fenólicos através da sua microencapsulação representa uma forma de ultrapassar as restrições referidas, permitindo ainda a programação da sua libertação no organismo. Esta foi a principal motivação do presente trabalho.

Os principais objetivos do presente trabalho foram:

- 1- Encapsulação dos extratos fenólicos obtidos a partir de *Rosa micrantha* Borrer ex Sm utilizando a técnica de atomização seguida de coagulação. Este objetivo compreendeu as seguintes etapas:
  1. Otimização de um método base utilizando como composto modelo o flavonoide maioritário do extrato, a catequina;
  2. Desenvolvimento/teste das metodologias de caracterização das microesferas: eficiência de encapsulação; resíduo seco e capacidade de reidratação.
- 2- Incorporação das microesferas produzidas numa matriz alimentar, mais concretamente num iogurte natural, estudos de estabilidade e do efeito antioxidante.

## 1.2 Organização da tese

A tese encontra-se organizada da seguinte forma:

No capítulo 2 intitulado “**Revisão bibliográfica**” é realizada uma revisão da literatura de interesse para a fundamentação do tema sendo focados os seguintes tópicos:

(i) Microencapsulação de compostos fenólicos; (ii) Incorporação de compostos fenólicos em alimentos e (iii) *Rosa micrantha* como fonte de compostos fenólicos.

No capítulo 3, “**Materiais e métodos**”, é feita a descrição dos reagentes utilizados nas atividades laboratoriais desenvolvidas bem como as metodologias experimentais levadas a cabo para produção e caracterização das microesferas, testes de incorporação num iogurte natural e avaliação da atividade antioxidante.

No capítulo 4 designado por “**Resultados e discussão**” encontram-se descritos os principais desenvolvimentos experimentais acompanhados da sua discussão e principais conclusões no que respeita: (i) Desenvolvimento do processo de microencapsulação; (ii) Aplicação do processo de microencapsulação ao extrato de *Rosa micrantha*; (iii) Avaliação da capacidade de reidratação das microesferas produzidas e (iv) Testes de incorporação do extrato livre e microencapsulado num iogurte natural e correspondente avaliação da estabilidade e atividade antioxidante.

No capítulo 5, “**Conclusões e perspetivas de trabalho futuro**” é feita uma síntese apresentando as principais conclusões e breve proposta de trabalhos futuros.

## **2. Revisão Bibliográfica**



## 2.1. Compostos fenólicos

### 2.1.1. Stress oxidativo e produção de radicais livres

Os radicais livres designam moléculas possuidoras de um ou mais eletrões não emparelhados numa das orbitais exteriores, sendo reconhecidos pela sua instabilidade e capacidade reativa. São produtos do funcionamento celular normal de organismos aeróbicos e apresentam-se maioritariamente na forma de ROS (espécies reativas de oxigénio) mas também na forma de RNS (espécies reativas de azoto) (Ferreira et al., 2009). As maiorias das ROS são produzidas na mitocôndria, perto da sua membrana o que lhes confere acesso aos lípidos membranares, que pela sensibilidade a estas espécies são alvos dos mesmos num fenómeno designado por peroxidação lipídica. No entanto, as ROS são também conhecidas por atuarem como mensageiros secundários no controlo de funções fisiológicas normais. São, portanto, moléculas sinalizadoras específicas e desde que produzidas de forma controlada são essenciais para a manutenção da homeostase (Ferreira et al., 2009; Valle, 2011).

A grande maioria destas espécies é removida pelas defesas celulares antioxidantes, desenvolvidas pelo organismo de modo a assegurar um funcionamento normal. Estas defesas são de dois tipos distintos, enzimáticas e não enzimáticas (Fang et al., 2002).

As defesas enzimáticas incluem a superóxido-dismutase (SOD), a glutathione-peroxidase (GPx) e a catalase (CAT). A SOD atua conjuntamente com a CAT; primeiramente a SOD converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio que é de seguida transformado em água pela CAT nos lisossomas, ou pela GSH-Px nas mitocôndrias. A GSH-R regenera a GSH que é utilizada pela CAT como dadora do hidrogénio utilizado na redução do peróxido de hidrogénio a água (Ferreira e Abreu, 2007).

As defesas não enzimáticas incluem ácido ascórbico (vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E) ou glutathione (GSH). A vitamina E procura prevenir a peroxidação lipídica, por se posicionar nas membranas. As ROS reagem com esta vitamina formando um radical pouco reativo que é eliminado pela vitamina C que regenera a vitamina E à sua conformação inicial. A GSH é um tripéptido de baixa massa molecular

que desempenha diversas funções de defesa tais como, facilitar a eliminação de xenobióticos, regenerar moléculas antioxidantes ou quelatar radicais livres (Ferreira e Abreu, 2007).

Quando se verifica um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e a sua eliminação pelas defesas antioxidantes estes radicais podem oxidar e danificar diversas estruturas celulares (proteínas, lípidos ou ácidos nucleicos) num processo designado *stress* oxidativo (Valle, 2011).

Os efeitos biológicos resultantes do processo de *stress* oxidativo incluem alterações fenotípicas como ativação da expressão génica, senescência ou morte celular. Estas alterações são associadas ao processo de envelhecimento e outros processos patológicos (Valko et al., 2007).

Para auxiliar as defesas antioxidantes endógenas existem um conjunto de moléculas, denominadas fitoquímicas que atuam exogenamente enquanto antioxidantes contra as ROS. Estas moléculas incluem carotenoides, compostos fenólicos, compostos azotados, alcaloides e compostos organossulfurados (Ferreira e Abreu, 2007, Carochio e Ferreira, 2013).


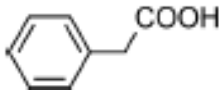
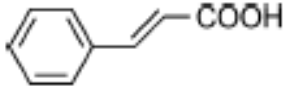

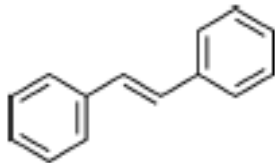
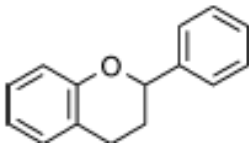
### **2.1.2. Aspetos químicos e bioativos dos compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos são produzidos em resultado do metabolismo secundário de plantas. Derivam de uma de duas vias de síntese, a do ácido chiquímico ou do acetato, apresentando diversas funções na planta onde são produzidos (Crozier et al., 2009). Assumem uma função protetora, conferindo resistência contra agentes agressores como ameaças microbianas ou insetos. A proteção contra raios UV é mais uma das potencialidades destes compostos nas plantas, bem como o envolvimento na pigmentação e crescimento das mesmas. O seu conteúdo na planta depende de fatores como o amadurecimento na altura da colheita, fatores ambientais, processamento e armazenamento (Quideau et al., 2011).

A característica comum a todos os compostos fenólicos é a presença de um anel de benzeno hidroxilado na sua estrutura. A sua classificação encontra-se dependente do número de anéis benzénicos que possuem, bem como do tipo de estrutura que liga estes anéis entre si. As principais classes conhecidas incluem ácidos

fenólicos, estilbenos, flavonoides e cumarinas. A Tabela 2.1 ilustra as diferentes classes e a sua estrutura química básica.

**Tabela 2.1.** Esqueletos estruturais básicos de compostos fenólicos (adaptado de Crozier et al., 2009).

| Esqueleto                                      | Classificação               | Estrutura básica  |
|--|-----------------------------|---|
| C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>                 | Ácidos hidroxibenzoicos     |    |
| C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>                 | Ácidos hidroxifenilacéticos |    |
| C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                 | Ácidos hidroxicinâmicos     |   |
| C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>                 | Cumarinas                   |  |
| C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub> | Estilbenos                  |  |
| C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> | Flavonoides                 |  |

Os polifenóis são praticamente ubíquos nos vários alimentos de origem vegetal e em algumas bebidas (Gharras, 2009). Estes compostos são comuns em alimentos como vegetais, frutos ou cereais onde são muitas vezes responsáveis por características como

sabor amargo, adstringência, cor, sabor ou odor dos mesmos. São igualmente comuns em bebidas como o vinho tinto, o café e chás (verde e preto). A Tabela 2.2 descreve algumas classes de polifenóis e alimentos onde estes são mais abundantes.

**Tabela 2.2.** Fontes alimentares de compostos polifenólicos vegetais (adaptado de Ignat e Popa, 2011).

| Composto fenólico       | Fonte alimentar  |
|-------------------------|--|
| <b>Ácidos fenólicos</b> | Ácidos hidroxicinâmicos - Damascos, mirtilos, cenoura, cereais, peras, cerejas, frutas cítricas, sementes oleaginosas, pêssegos, ameixas, espinafre, tomate, beringelas<br>Ácidos hidroxibenzoicos - Mirtilos, cereais, sementes oleaginosas |
| <b>Flavonoides</b>      | Maçãs, feijão, trigo mourisco, mirtilos, alho-porro, alface, cebola, azeitona, pimenta, tomates, frutos cítricos, groselhas negras e vermelhas, amoras, cerejas, soja, cebola, espinafre, morango  |
| <b>Estilbenos</b>       | Uvas   |

A sua concentração depende da exposição à luz, bem como da preparação culinária dos alimentos. A exposição à luz e a outros fatores ambientais pode afetar propriedades organolépticas e de cor uma vez que estes compostos são facilmente oxidáveis. A confeção dos alimentos ou o descasque dos frutos afeta a concentração; no caso dos frutos, a redução destes compostos ocorre porque a sua presença é maior nas camadas exteriores (D'Archivio et al., 2007).

A inclusão destes alimentos na dieta humana comporta benefícios para o consumidor, daí a importância do estudo da bioatividade destes compostos. O efeito de compostos fenólicos na saúde humana tem sido exaustivamente estudado tendo sido feita a atribuição de propriedades antioxidantes e outras com impacto no organismo humano. Entre as propriedades que lhe são atribuídas incluem-se o potencial anticancerígeno, cardioprotetor, neuroprotetor ou anti-envelhecimento. Seguidamente serão descritas, de forma geral, algumas destas propriedades e o modo como são levadas a cabo (Crozier et al., 2009; Han et al., 2007).

Os compostos fenólicos apresentam as seguintes propriedades/funções:

**Função antioxidante:** A capacidade oxidante destes compostos é a função mais estudada e aquela que reúne mais consenso. Este poder é o resultado de três ações: eliminação de ROS (*e.g.*, radical superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo), doação de átomos de hidrogénio ou eletrões e quelatação de catiões metálicos envolvidos na produção de radicais livres (Sakihama et al., 2002; Balasundram et al., 2006). A eliminação das ROS ocorre por via dos grupos hidroxilo, que sendo dadores de hidrogénios, reagem com átomos de oxigénio e azoto reativos quebrando o ciclo de produção de novos radicais (Pereira et al., 2009). A inibição de enzimas (isoformas de citocromo P<sub>450</sub>, lipoxigenases, ciclo-oxigenase e xantina oxidase) envolvidas na formação de radicais livre pode ser outro dos mecanismos de ação antioxidante destes compostos. Pode ainda referir-se o efeito sinergista com outros antioxidantes, nomeadamente o ácido ascórbico, o  $\beta$ -caroteno ou o  $\alpha$ -tocoferol (Pereira et al., 2009).

**Função cardio-protetora:** Existem vários estudos que demonstram que o consumo de polifenóis limita a incidência de doenças coronárias por inibição da agregação de plaquetas que podem ser a causa do entupimento dos vasos sanguíneos (Dubick e Omaye, 2001; Vita, 2005). Limitam o desenvolvimento de lesões ateromatosas, inibindo a oxidação de lipoproteínas LDL (lipoproteínas de baixa densidade), que são particularmente importantes no mecanismo das lesões endoteliais que ocorrem na aterosclerose, uma doença crónica inflamatória que se desenvolve nas artérias (Zerne e Fernandez, 2005; D'Archivio et al., 2007). Para além do efeito referido, os polifenóis têm ainda um efeito anti-plaquetário e anti-inflamatório, contribuindo ainda para o aumento do colesterol HDL e para o melhoramento da função endotelial (Vita, 2005).

**Função anticancerígena:** Os polifenóis exercem um efeito inibidor do crescimento de linhas celulares tumorais e de vários tumores em modelos animais (Carocho e Ferreira, 2013b). Este efeito tem sido observado para células tumorais localizadas em tecidos tão diversos como a boca, a pele ou o fígado (Peters et al., 2001). Os efeitos conhecidos incluem anti-proliferação, indução de apoptose celular, prevenção

da oxidação, indução da detoxificação de enzimas, regulação do sistema imune do hospedeiro, atividade anti-inflamatória e alterações na sinalização celular (García-Lafuente et al., 2009). Os polifenóis influenciam ainda o metabolismo de pró-carcinogêneos através da modulação da expressão da enzima citocromo P<sub>450</sub> que está envolvida na ativação de carcinogêneos (Pereira et al, 2009).

**Função antidiabética:** A diabetes é uma doença que afeta uma parte substancial da população e que está relacionada com uma produção inexistente ou deficiente de insulina pelo organismo. Numerosos estudos têm descrito um efeito antidiabético dos polifenóis; as catequinas presentes no chá são um dos exemplos (Matsui et al., 2002). Os polifenóis afetam o nível de glucose sanguínea através da inibição da absorção de glucose no intestino e nos tecidos periféricos.

**Função anti-envelhecimento:** O envelhecimento está relacionado com uma acumulação de processos prejudiciais que ocorrem nas células e nos tecidos com o aumento da idade, e a explicação mais consensual para este processo é a teoria dos radicais livres/*stress* oxidativo. Estes processos ocorrem ao longo de toda a vida, no entanto, com o avançar da idade a eficácia dos mecanismos de reparação antioxidante diminui, tornando essencial o consumo de substâncias antioxidantes, como os polifenóis, para amenizar estes efeitos (Harman, 2006). Pode dar-se o exemplo do resveratrol, cujo consumo é associado um prolongamento do tempo de vida (Harikumar e Aggarwal, 2008).

**Função neuro-protetora:** As doenças neurodegenerativas são em grande parte resultado de *stress* oxidativo e de danos às células cerebrais sendo as doenças de Alzheimer e Parkinson algumas das mais comuns. O efeito protetor é muitas vezes conseguido através do consumo de antioxidantes (Letenneur et al., 2007). Alguns estudos têm associado o consumo de chá verde (rico em catequinas) a uma redução do risco de doença de Parkinson, nomeadamente pelo facto de exercer um efeito protetor contra a neurotoxina MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetraidropiridina) que causa a doença (Rossi et al., 2008).

**Outras funções:** Outros benefícios incluem o efeito preventivo no tratamento da asma, evitando a obstrução das vias aéreas associadas a esta doença, ou a prevenção da perda de densidade mineral óssea (Nakajima et al., 2001; Woods et al., 2003). Proteção de danos na pele por exposição prolongada à luz solar, regeneração de tecidos, atividade antiviral ou antimicrobiana e capacidade hepatoprotetora são outras das propriedades atribuídas (Havsteen, 2002; Gharras, 2012; Ray et al., 1999).

Para uma atividade efetiva destes compostos recomenda-se uma ingestão mínima diária entre 100-150 mg/dia. Este valor situa-se bem acima da ingestão habitual real dos indivíduos europeus em consequência de padrões alimentares caracterizados por um baixo consumo de fruta e vegetais (Manach et al., 2004). No entanto, não deve ser feita uma ingestão excessiva devido aos potenciais efeitos pró-oxidantes destes compostos.

### 2.1.3. Biodisponibilidade dos compostos fenólicos

A biodisponibilidade diz respeito à porção do composto que é digerido, absorvido e metabolizado pelas vias normais. Cada classe de polifenóis apresenta uma biodisponibilidade diferente, não existindo qualquer ligação entre a quantidade ingerida e a disponibilidade no corpo humano (D'Archivio et al., 2007; Stevenson et al., 2010). Os polifenóis podem apresentar-se sob a forma glicosilada e, uma pequena parte, sob forma agliconada. Quando na forma agliconada, podem ser absorvidos diretamente pelo intestino delgado, no entanto, como a maioria dos fenóis estão presentes nos alimentos sob a forma de ésteres, glicosídeos ou polímeros, antes de serem absorvidos sofrem modificações estruturais (D'Archivio et al., 2007; Stevenson et al., 2010).

Quando apresentam esta última forma são hidrolisados por enzimas intestinais ( $\beta$ -glucosidases e lactase-florizina hidrolase) ou pela microflora do cólon, sofrendo ainda outras modificações durante o processo de absorção. Os polifenóis que não são absorvidos pelo intestino delgado chegam ao cólon onde os glicosídeos são hidrolisados a agliconas e estas são metabolizadas em ácidos aromáticos (Martin et al., 2009). Os polifenóis são conjugados nas células intestinais e mais tarde no fígado por metilação, sulfatação ou glucuronidação. Os processos de conjugação constituem um processo de detoxificação, que aumenta a sua hidrofiliabilidade, facilitando o seu processo de

eliminação. Estes processos de conjugação ocorrem em diferentes locais; a sulfatação ocorre apenas no fígado e a glucuronidação pode ocorrer no fígado e intestino. Estas modificações dificultam a determinação da biodisponibilidade uma vez que a forma na qual são absorvidos é diferente daquela presente nos alimentos. No entanto, é dada uma indicação indireta deste parâmetro pelo aumento da capacidade antioxidante do plasma após consumo de alimentos ricos em polifenóis (Martin et al, 2009).

É a quantidade de polifenóis acumulada nos tecidos que exerce atividade biológica, daí que seja desejável que este valor seja elevado. A eliminação de polifenóis e dos seus derivados ocorre através da bÍlis e urina, sendo os mais extensamente conjugados são preferencialmente eliminados pela primeira via enquanto os de menor tamanho, como monosulfatos, são eliminados na urina (Martin et al, 2009; Stevenson et al., 2010).

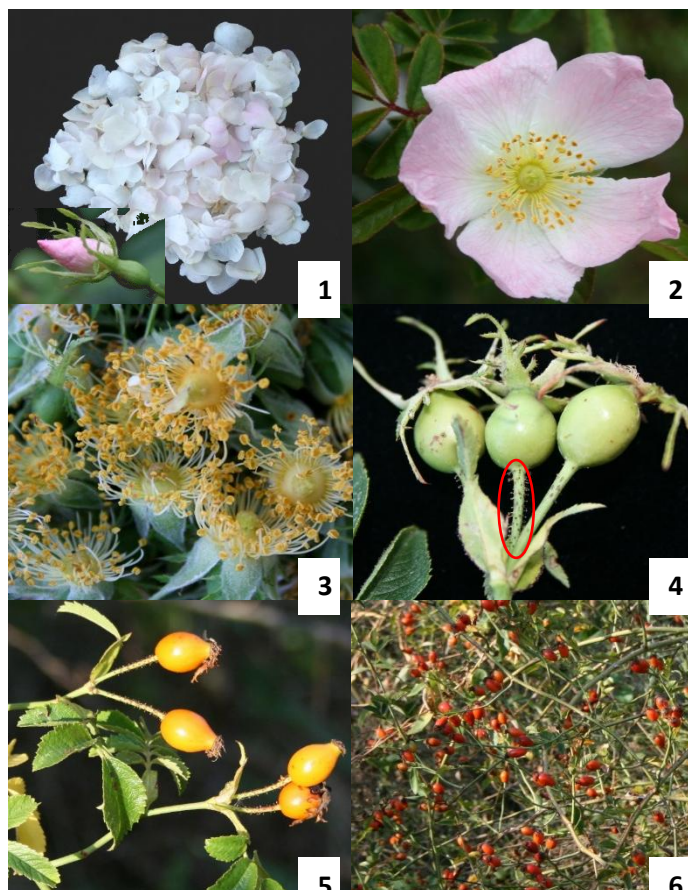
#### **2.1.4. *Rosa micrantha* como fonte de compostos fenólicos**

Os extratos naturais de plantas são fontes reconhecidas de substâncias fitoquímicas, nomeadamente de compostos fenólicos. Estes extratos têm sido explorados pela medicina tradicional, no entanto, só mais recentemente foram estudados experimentalmente e as suas propriedades validadas.

A *Rosa micrantha* Borrer ex Sm pertence à família Rosacea, que desde há muito tem sido utilizada para fins alimentares e medicinais. De nome comum roseira-brava, encontra-se distribuída por grande parte da Europa e região Mediterrânica. Apresenta-se como um arbusto de folha caduca que se encontra nas imediações de florestas de carvalhos, partilhando o espaço com outras espécies silvestres da mesma família (ex.: *Crataegus monogyna*, *Prunus spinosa*). As folhas e os pedúnculos são espaçados e cobertos de pelos glandulares.

Os extratos obtidos a partir de amostras silvestres de *R. micrantha* têm sido alvo de estudos de determinação da sua composição química bem como do seu potencial antioxidante. A composição química desta planta foi estudada por Guimarães et al. (2010) e Barros et al. (2013), nomeadamente os macronutrientes, ácidos gordos, açúcares, tocoferóis, ácido ascórbico e compostos fenólicos. Foram igualmente levados a cabo ensaios para determinação da sua atividade antioxidante. As partes da planta

analisadas foram as flores e os frutos em diferentes alturas do seu ciclo de vida (Figura 2.1).



**Figura 2.1.** *Rosa micrantha* Borrer ex Sm.: 1. Pétalas removidas de botões florais (detalhe do botão) (parte da planta utilizada no presente trabalho); 2. Flor fertilizada; 3. Detalhe dos frutos de flores fertilizadas; 4. Frutos verdes e detalhe dos pelos glandulares; 5. Frutos amadurecidos; 6. Planta apresentando frutos completamente amadurecidos no final do Outono (in Guimarães et al. 2010).

A proteína apresenta valores semelhantes rondando 4 g/100 g massa seca em todas as partes da planta estudadas. A gordura é o macronutriente menos abundante, apresentando-se em maior quantidade nas pétalas e frutos muito maduros. Os hidratos de carbono, por outro lado, são os macronutrientes mais abundantes apresentando uma valor mínimo de 88,76 g/100 g massa seca. A quantidade de açúcares redutores varia substancialmente entre o fruto verde e o fruto maduro, sendo superior no último caso.

O fruto muito maduro é a parte da planta que apresenta maior valor energético. A composição em ácidos gordos foi analisada, tendo sido identificados e quantificados

vinte e dois destes compostos; a planta é rica em ácidos gordos polinsaturados, principalmente ácido  $\alpha$ -linoleico. Seguem-se os ácidos gordos saturados, apresentando-se em maior quantidade nas pétalas e flores fertilizadas. Os ácidos gordos monoinsaturados são menos prevalentes e seguem a mesma distribuição na planta que os anteriores.

A quantificação dos açúcares permite verificar que para as pétalas, flores fertilizadas e frutos muito maduros, o açúcar predominante é a frutose. Nos frutos verdes e maduros, é a sacarose. As pétalas e as flores fertilizadas são as maiores fontes de tocoferóis.  $\beta$ -caroteno e licopeno são dois pigmentos também presentes nesta planta; ambos apresentam maior predominância nos frutos muito maduros.

Toda a planta apresenta atividade antioxidante, sendo mais pronunciada nas flores fertilizadas. A concentração de flavonoides varia consoante a parte da planta, apresentando valor mais elevado na flor fertilizada, cerca de 220 mg equivalentes de catequina/g extrato. Dos flavonoides presentes no extrato desta planta, o mais representativo é a catequina, conforme determinado por Barros et al. (2013) apresentando um valor de 1354,14  $\mu\text{g/g}$  massa fresca. A catequina é um flavonoide pertencente à sub-classe dos flavan-3-óis, comuns em alimentos como maçãs e ameixas e em bebidas como chá verde ou preto, vinho tinto e sumo de uva (Gharras, 2012).

O extrato fenólico desta planta silvestre revela ainda promissoras capacidades antifúngicas contra fungos da família *Candida*. O efeito verificado foi fungicida ou fungistático dependendo da estirpe. Os efeitos observados foram superiores em comparação com outras plantas silvestres, o que se supõe ser resultado do perfil de flavonoides apresentado por *R. micrantha* nomeadamente, catequina e dímeros e trímeros de procianidinas (Barros et al., 2013).

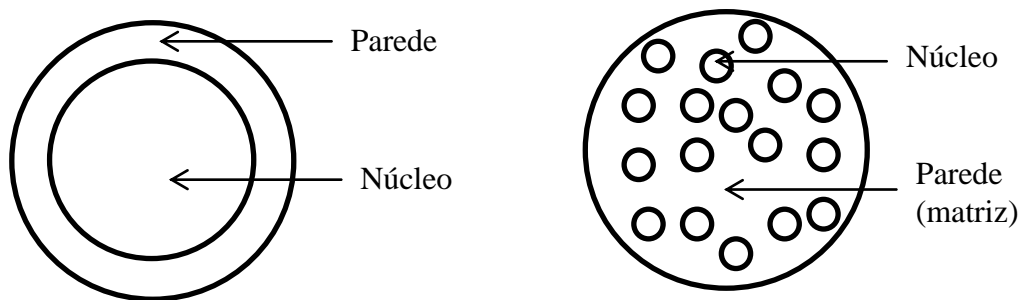
## **2.2 Microencapsulação de compostos fenólicos**

### **2.2.1 Conceito de microencapsulação**

O processo de microencapsulação foi desenvolvido há aproximadamente 60 anos e define-se como uma tecnologia capaz de encapsular materiais sólidos, líquidos ou gasosos em pequenas cápsulas seladas, permitindo a libertação do seu conteúdo a taxas

controladas sob condições específicas (Fang e Bhandari, 2010). A primeira tentativa de aplicação deste processo surge por volta de 1930, no entanto o primeiro produto microencapsulado é produzido apenas em 1954 por uma empresa norte-americana para a indústria do papel (papel químico).

O processo de microencapsulação pode originar partículas com distintas morfologias, no entanto podem definir-se duas formas mais comuns: as microesferas e as microcápsulas (Figura 2.2). Nas microesferas o material a encapsular (princípio ativo) encontra-se uniformemente distribuído na matriz do material encapsulante, enquanto nas microcápsulas existe um núcleo único envolvido por uma cápsula do material encapsulante (Munin e Edwards-Lévy, 2011). Outras morfologias compreendem partículas contendo uma cápsula constituída por mais de uma parede e partículas apresentando uma forma irregular (Fang e Bhandari, 2010).



**Figura 2.2.** Principias morfologias das micropartículas (in Munin e Edwards-Lévy, 2011).

### 2.2.2. Materiais encapsulantes

Existem produtos de natureza diversa com potencial para aplicação como material encapsulante. O processo de seleção deve ter em conta diversos fatores, entre os quais se realça a estabilidade do produto encapsulado durante o período de vida útil das micropartículas (Nedovic et al., 2011).

Assim, e de uma forma geral, o material encapsulante deve, ser capaz de proteger o material encapsulado de condições ambientais adversas, separar substâncias incompatíveis ou ainda condicionar o local de libertação consoante as suas características. A aplicação da microencapsulação na área alimentar exige que estes materiais sejam seguros para contato humano. Estes devem ser certificados por

entidades alimentares competentes como materiais “geralmente reconhecidos como seguros” (GRAS).

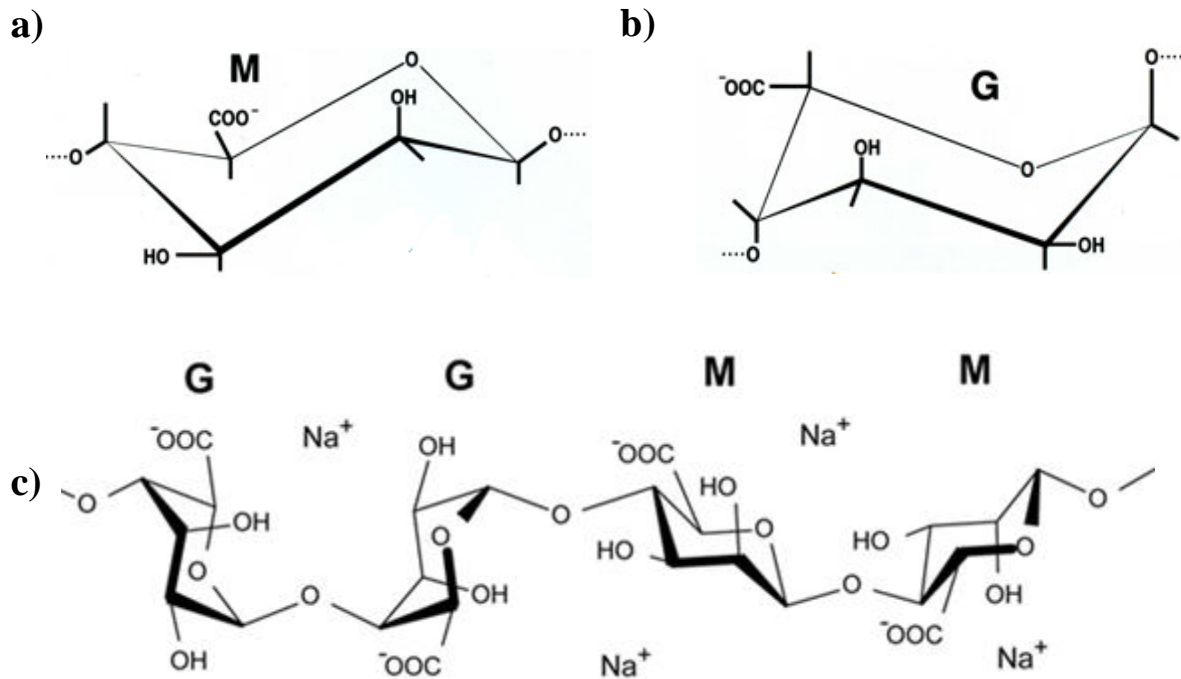
Os principais materiais usados são polissacarídeos, lípidos ou proteínas. Exemplos de materiais classificados nos vários grupos podem ser consultados na Tabela 2.3. Entre os vários materiais, os polissacarídeos apresentam a vantagem de proteger o composto encapsulado das condições do estômago e duodeno (Nedovic et al., 2011).

**Tabela 2.3.** Material para uso na área alimentar (adaptado de Munin e Edwards-Lévy, 2011).

| Designação             | Exemplos   |
|------------------------|--|
| <b>Polissacarídeos</b> | <u>Amidos e derivados</u> (Amilose, amilopectina, dextrina, maltodextrina, celulose) |
|                        | <u>Exsudados/estratos plantas</u> (Gomas, pectinas)                                  |
|                        | <u>Extratos marinhos</u> (Alginato, carragenato)                                     |
|                        | <u>Animais/microbiológicos</u> (Quitosano, dextrano, xantano)                        |
| <b>Proteínas</b>       | Caseína, glúten  |
| <b>Lípidos</b>         | Ácidos gordos, ceras, glicosídeos, fosfolípidos                                      |
| <b>Outros</b>          | Parafina, PVP, materiais inorgânicos   |

### 2.2.3. Alginato

Os alginatos constituem uma família de copolímeros polianiónicos obtidos a partir de bactérias ou algas, sendo a alga castanha a fonte mais comum. A sua constituição base inclui dois blocos ( $\alpha$ -L-ácido gulurónico (G) e  $\beta$ -D-ácido manurónico (M)) que se encontram linearmente associados através de ligações glicosídicas do tipo 1→4 (Figura 2.3) (Goh et al., 2012).



**Figura 2.3.** Componentes do alginato: (a)  $\beta$ -D-ácido manurónico, (M), (b)  $\alpha$ -L-ácido gulurónico (G), (c) Estrutura química (adaptado de Souza et al., 2008).

As propriedades físicas e químicas do alginato tornam a sua aplicação comercial comum em diversas áreas. A Tabela 2.4 resume algumas das suas aplicações e o respetivo objetivo funcional pretendido. Destacam-se a sua aplicabilidade na indústria alimentar, onde é usado como estabilizante em bebidas e espessante em geleias. As aplicações mais recentes incluem a utilização como biocatalisador capaz de sequestrar metais no tratamento de águas (Goh et al., 2012).

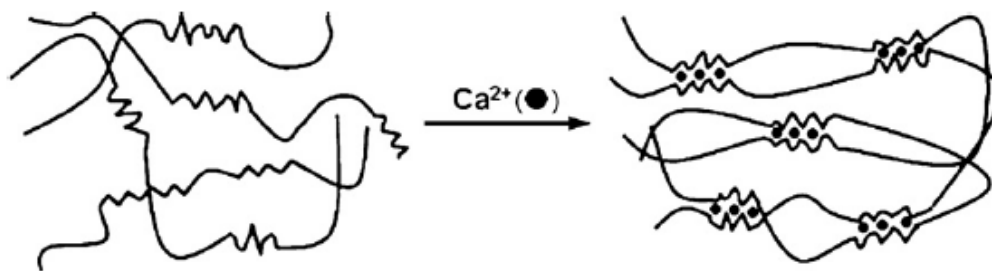
As propriedades do alginato permitem a formação de gel a partir de uma solução aquosa, na presença de catiões. Este processo é denominado de reticulação iónica. Os catiões polivalentes podem substituir e estabelecer uma ligação preferencial com os locais de ligação dos iões de sódio nos segmentos de poliguluronato, produzindo um modelo conhecido por “egg box” (Pasin et al., 2012).

Em geral, iões divalentes como  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  podem ser utilizados como agentes reticulantes. A quelatação no resíduo-G das moléculas de alginato resulta numa interação iónica entre os grupos do ácido gulurónico. As forças de *van der waals* entre segmentos de alginato resultam numa rede de gel tridimensional.

A Figura 2.4 ilustra o processo de formação do gel usando o íon  $\text{Ca}^{2+}$  como agente reticulante (Pasin et al., 2012). A produção de géis mais maleáveis é formada a partir de alginatos com baixo conteúdo de ácido  $\alpha$ -L-ácido gulurónico (Pasin et al., 2012).

**Tabela 2.4.** Aplicações e funcionalidade do alginato (adaptado de Draget e Taylor, 2011).

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



**Figura 2.4.** Representação de gel de alginato utilizando o íon  $\text{Ca}^{2+}$  como agente reticulante (adaptado de Lee e Mooney, 2012).

O alginato é caracterizado por apresentar as seguintes propriedades:

**Biocompatibilidade:** A classificação do alginato como GRAS pela FDA torna-o passível de administração oral sem mostrar sinais de toxicidade. Estudos efetuados

revelaram a biodegradabilidade e a não toxicidade deste composto, provocando uma baixa resposta imunitária quando ingerido oralmente (George e Abraham, 2006).

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

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

#### 2.2.4. Técnicas de microencapsulação

O processo de microencapsulação pode ser efetuado através de diversas técnicas, nomeadamente químicas, físico-químicas ou físicas, conforme descrito na Tabela 2.5.

**Tabela 2.5.** *Técnicas de microencapsulação (adaptado de Munin e Edwards-Lévy, 2011).*

| <b>Técnica</b>         | <b>Exemplo</b>   |
|------------------------|--|
| <b>Químicas</b>        | Policondensação, polimerização interfacial, inclusão molecular   |
| <b>Físico-químicas</b> | Coacervação complexa, emulsão, lipossomas  |
| <b>Físicas</b>         | <i>Spray-drying, spray-cooling, extrusão, processos usando fluidos supercríticos, co-cristalização, liofilização (Freeze drying)</i> |

De entre as técnicas referidas, as mais aplicadas à encapsulação de polifenóis são: *spray-drying*, coacervação, preparação de lipossomas, inclusão, co-cristalização e técnicas baseadas na preparação de emulsões (Munin e Edwards-Lévy, 2011).

Cada uma destas tem um conjunto de parâmetros específicos que condicionam a sua utilização. Seguidamente apresenta-se uma breve descrição das técnicas mais utilizadas

***Spray-drying***: Esta técnica consiste na formação de micropartículas pela atomização (através de um *nozzle* ou atomizador) de uma solução contendo o princípio ativo e o material encapsulante. A consolidação das micropartículas ocorre por contacto destas com um gás (ar ou azoto) aquecido promovendo a evaporação do solvente. As micropartículas são recolhidas após depositarem num ciclone ou num filtro (Fang e Bhandari, 2010; Augustin e Hemar, 2009).

**Coacervação**: Esta técnica é baseada na capacidade que os polímeros aniónicos e catónicos solúveis em água apresentam para interagir e formar uma fase rica em polímero, denominada de coacervado. A formação das micropartículas ocorre através da deposição da fase coacervada à volta do princípio ativo suspenso ou emulsionado no mesmo meio, através de alterações físico-químicas tais como pH, polaridade, força iónica ou temperatura. É um processo de elevado custo para uso em ingredientes alimentares, no entanto é utilizado para ingredientes funcionais pouco estáveis como os polifenóis (Fang e Bhandari, 2010; Augustin e Hemar, 2009).

**Lipossomas**: Os lipossomas são micropartículas coloidais compostas por um sistema de membranas formado por uma bi-camada lipídica que encapsula a fase aquosa. A presença destas duas fases permite a captura, distribuição e libertação de materiais solúveis em água, lípidos e substâncias anfífilas (Fang e Bhandari, 2010; Augustin e Hemar, 2009).

**Inclusão molecular**: A inclusão molecular realiza-se a maioria das vezes recorrendo a ciclodextrinas (CDs) como material encapsulante. Estes compostos são oligossacarídeos cíclicos derivados do amido. São constituídos por uma parte exterior

hidrofílica e uma parte interior hidrofóbica. Esta estrutura torna as CDs um meio adequado para encapsular moléculas de baixa polaridade, em micropartículas com interior apolar, através de interações hidrofóbicas (Fang e Bhandari, 2010; Augustin e Hemar, 2009).

**Co-cristalização:** A co-cristalização é um processo de encapsulação em que a estrutura cristalina da sacarose é modificada de um cristal perfeito para um cristal aglomerado irregular, de modo a formar uma matriz porosa. Este processo decorre de forma espontânea a temperaturas na ordem dos 120°C e em condições de humidade baixa. Ao longo da formação do cristal, o princípio ativo é distribuído pelos espaços vazios formados no interior destes. Este processo apresenta como vantagens a melhoria da solubilidade, dispersibilidade e da estabilidade dos materiais encapsulados (Fang e Bhandari, 2010; Augustin e Hemar, 2009).

**Técnicas baseadas na preparação de emulsões:** A tecnologia de preparação de emulsões pode ser utilizada para a encapsulação de agentes bioativos em soluções aquosas, que poderão ser aplicadas posteriormente na forma líquida ou ser sujeitas a secagem para obtenção de um pó. Uma emulsão é constituída, pelo menos, por dois líquidos imiscíveis, sendo normalmente constituída por uma fase óleo e por uma fase água, onde um dos líquidos é disperso no outro na forma de pequenas gotículas. A denominação de “emulsão funcional” associa-se à incorporação de princípios ativos numa emulsão com aplicação na área alimentar. Este tipo de emulsões foi patenteado nos Estados Unidos, e consiste na dissolução dos polifenóis em etanol emulsionado em óleo vegetal (Fang e Bhandari, 2010; Augustin e Hemar, 2009).

## **2.3. Incorporação de compostos fenólicos em alimentos**

### **2.3.1. Interesse e vantagens**

Os compostos fenólicos apresentam benefícios reconhecidos para a saúde humana, destacando-se em particular as suas propriedades antioxidantes, sendo a sua inclusão na dieta humana considerada de grande importância. No entanto, para que

ocorra o aproveitamento máximo destes compostos devem ultrapassar-se certos fatores limitantes à sua ingestão. A maioria dos compostos fenólicos apresenta características que limitam a sua bioatividade e probabilidade de ingestão quando incluídos nos alimentos sob a forma livre (Crozier et al., 2009; Chatterjee e Bhattacharjee, 2013).

Para além disto, outros fatores que têm também um efeito prejudicial na estabilidade destes compostos, são:

- a instabilidade das condições do processamento alimentar, distribuição e armazenagem;
- condições ambientais (luz, pH, temperatura ou luz);
- condições do metabolismo do trato intestinal (pH, enzimas, presença de outros nutrientes).

Como resultado, após a sua administração apenas uma pequena porção das moléculas dos compostos fenólicos permanece disponível. Apresentam ainda tendência para oxidar, originando alterações organolépticas inconvenientes (coloração acastanhada ou odores indesejáveis). Muitos destes compostos apresentam um gosto desagradável (adstringência e amargura) que deve ser mascarado antes da sua introdução em produtos alimentares (Crozier et al., 2009; Lesschaeve e Noble, 2012).

### **2.3.2. Microencapsulação de extratos fenólicos**

O processo de microencapsulação surge como possível alternativa às limitações apresentadas por estas substâncias, permitindo superar a sua instabilidade, aligeirar o gosto, e aumentar o seu tempo de meia-vida no organismo. Este processo permite a proteção do composto encapsulado, mantendo a bioatividade destes compostos que de outro modo poderia perder-se (Dueñas et al., 2010; Nedovic et al., 2011). A encapsulação de extratos naturais ricos em compostos fenólicos ou de compostos isolados foi efetuada por diversos autores. A Tabela 2.6 apresenta um resumo de alguns estudos encontrados na literatura para o caso dos extratos naturais e a Tabela 2.7. apresenta estudos de encapsulação de um composto isolado, neste caso a catequina, dado o seu interesse para o trabalho a desenvolver.

O interesse comercial nos compostos fenólicos ou em moléculas bioativas encapsuladas é bastante relevante tendo em conta o número de patentes registadas sobre este tema. O objetivo do processo é semelhante em todos os casos e consiste principalmente na proteção de substâncias instáveis e programação da libertação numa localização específica, normalmente o intestino delgado (Patente WO 2005/048998, WO2008/083152, US2012/0058195, MX2011/006005, CN102550817, KR20040057565). A atualidade deste tema é evidenciada pelo facto de grande parte destas patentes ter sido registada no corrente ano (p.ex. CN103005156, CN102499353).

**Tabela 2.6.** Tecnologias aplicadas na encapsulação de extratos naturais.

| Princípio ativo   | Material encapsulante  | Técnica                                 | Referência                             |
|---|--|---|--|
| <i>Myrciaria jaboticaba</i><br>(Extrato etanólico)                        | Maltodextrina,<br>Maltodextrina/goma-arábica,<br>maltodextrina/amido | <i>Spray-drying</i>                     | Silva et al., 2013                     |
| <i>Opuntia ficus-indica</i><br>(Extrato etanólico)                        | Maltodextrina, inulina   | <i>Spray-drying</i>                     | Saéñz et al., 2009                     |
| <i>Entada Africana</i><br>(Extrato etanólico)                             | Alginato   | <i>Spray-drying</i>                     | Obidike e Emeje,<br>2011               |
| <i>Morinda citrifolia L.</i><br>(Extrato acetato-etílico)                 | Maltodextrina  | <i>Spray-drying</i>                     | Krishnaiah et al.,<br>2012             |
| <i>Hypericum perforatum</i><br>(Extrato metanólico)                       | b-ciclodextrina (b-CD)   | Inclusão<br>complexa                    | Kalogeropoulos et<br>al., 2010         |
| <i>Cortex Moutan,</i><br><i>Rhizoma Atractylodis</i><br>(Extrato aquoso)  | Alginato   | Emulsão                                 | Hui et al., 2013                       |
| <i>Lippia sidoides</i> (Extrato<br>etanólico)                             | Maltodextrina/goma-arábica   | <i>Spray-drying</i>                     | Fernandes et al.,<br>2012              |
| <i>Garcinia cowa</i> (Extrato<br>aquoso)                                  | Maltodextrina, proteína  | <i>Freeze drying</i>                    | Ezhilarasi et al.,<br>2013             |
| <i>Daucus carota L.</i><br>(Extrato etanólico)                            | Maltodextrina/ <i>Glucodry</i><br>210/ <i>Stardri</i> 10             | <i>Spray-drying</i>                     | Ersus e Yurdagel,<br>2007              |
| <i>Punica granatum L.</i><br>(Extrato aquoso)                             | Maltodextrina  | <i>Spray-drying</i>                     | Çam et al., 2013                       |
| <i>Vaccinium myrtillus</i><br>(Extrato aquoso)                            | Proteína   | <i>Spray-drying</i>                     | Betz et al., 2012                      |
| <i>Urtica dioica</i><br><i>L., Crategus laevigata</i><br>(Extrato aquoso) | Alginato/quitosano   | Extrusão<br>eletrostática               | Belščak-<br>Cvitanović et al.,<br>2011 |
| <i>Prunus cerasus L.</i><br>(Extrato etanólico)                           | Maltodextrina/goma-arábica   | Emulsão/ <i>Freeze</i><br><i>drying</i> | Cilek et al., 2012                     |

**Tabela 2.7. Tecnologias aplicadas na encapsulação de catequinas.**

| <b>Princípio ativo</b>                             | <b>Material encapsulante</b>                                | <b>Técnica</b>      | <b>Referência</b>         |
|--|---|---------------------|---------------------------|
| (+)-catequina e (-)-epigalocatequina galato (EGCg) | Quitossano/tripolifosfato (TPP)                             | Gelificação iônica  | Dube et al., 2010         |
| Catequina  | b-ciclodextrina (b-CD)                                      | Inclusão molecular  | Krishnaswamy et al., 2012 |
| (-)-epigalocatequina-3-galato                      | Mistura lipídica (L- $\alpha$ -fosfatidilcolina+colesterol) | Lipossomas          | Lee et al., 2008          |
| (-)-epigalocatequina galato (EGCg)                 | Goma-arábica/maltodextrina                                  | <i>spray-drying</i> | Peres et al., 2011        |
| (+)-Catequina                                      | poli(l-lactido)   | Co-precipitação     | Songtipya e Sane, 2013    |

### **3. Materiais e métodos**



### 3.1. Materiais

#### 3.1.1. Materiais utilizados no processo de microencapsulação

O cloreto de cálcio di-hidratado foi adquirido na Panreac Quimica SAV e o alginato de sódio na Fluka Chemie.A (+)-catequina foi adquirida na Sigma.

#### 3.1.2. Materiais utilizados para a avaliação da atividade antioxidante

O padrão utilizado nos ensaios da atividade antioxidante foi o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), e foi adquirido na Sigma. O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). A água foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Puré Water Systems, EUA).

### 3.2 Métodos

#### 3.2.1. Processo de encapsulação

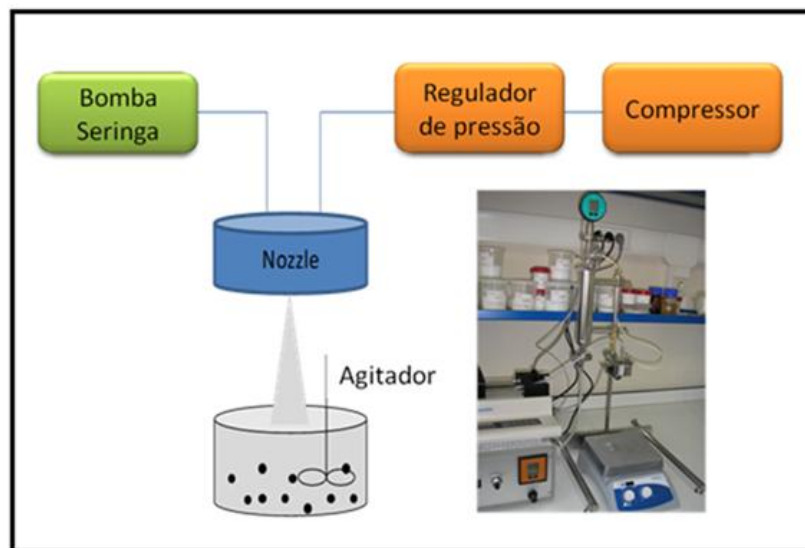
O processo de microencapsulação foi desenvolvido utilizando a catequina, o flavonoide maioritário do extrato alvo (*Rosa micrantha*), como composto modelo. Este ponto teve como objetivo otimizar as condições do processo e definir as metodologias de caracterização. O método desenvolvido teve por base trabalhos anteriores desenvolvidos no LSRE-IPB (Ribeiro e Vieira, 2012). A pressão e o caudal de atomização foram fixados em 0,1 bar e 0,3 mL/min, respetivamente.

A concentração do material de encapsulação (alginato) foi de 4% (m/v) e a do agente de coagulação (cloreto de cálcio) foi também de 4% (m/v). No que respeita à otimização do processo foram testadas as seguintes variáveis: razão catequina/alginato (0,025; 0,0625; 0,125), volume da solução de coagulação (500 mL; 250 mL) e tempo de coagulação (24 h; 4 h). O processo de lavagem/recuperação das microesferas foi efetuado de uma forma sequencial, sendo constituído pelas seguintes etapas: (i) recuperação das microesferas por filtração sob vácuo; (ii) lavagem com água destilada seguido de recuperação das microesferas por filtração (iii) liofilização. As microesferas

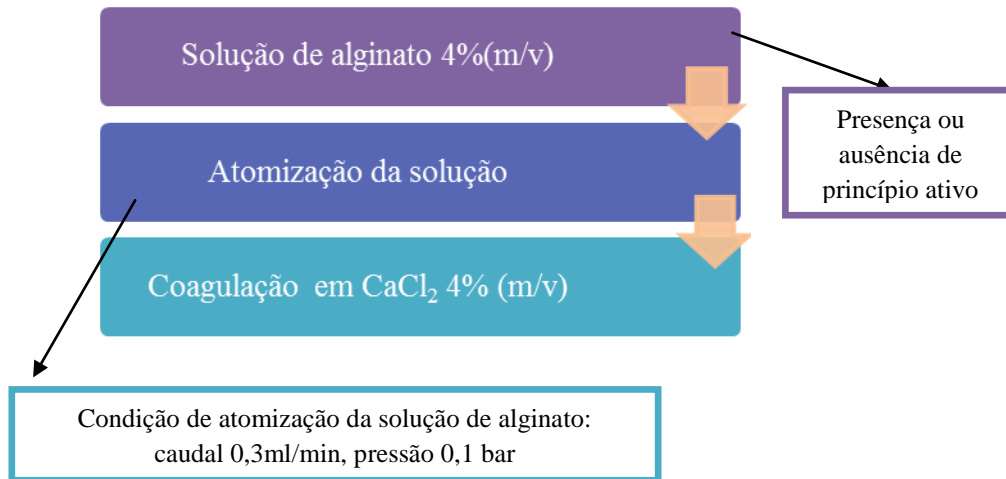
secas foram depois acondicionadas em frascos protegidos da luz à temperatura ambiente para posterior caracterização e utilização.

O equipamento NISCO Var J30 está instalado no LSRE-IPB. O procedimento de preparação das microesferas é constituído por 2 etapas principais: (i) Atomização da solução; (ii) Consolidação das microesferas atomizadas.

O sistema NISCO Var J30 é constituído por um controlador de pressão ligado a uma fonte de gás e bomba de seringa para controlo do caudal da solução do material encapsulante contendo o princípio ativo. Esta solução é alimentada ao bico atomizador (*nozzle*) onde ocorre a formação do *spray*. As micropartículas formadas por atomização entram em contato com uma solução contendo um agente de coagulação ocorrendo a sua consolidação. A Figura 3.1 ilustra de forma esquemática e fotográfica o sistema NISCO Var J30 e na Figura 3.2 encontra-se representado o processo produtivo para as condições otimizadas.



**Figura 3.1.** Representação esquemática e fotográfica do sistema NISCO Var J30.



**Figura 3.2.** Representação esquemática do processo otimizado para produção de microesferas de alginato.

### 3.2.2 Obtenção e microencapsulação do extrato de *Rosa micrantha*

**Amostra vegetal:** Flores e inflorescências (partes mais citadas para propósitos terapêuticos pela medicina tradicional segundo informadores chave) da espécie *Rosa micrantha* foram recolhidas no território do Parque Natural de Montesinho (Trás-os-Montes, zona nordeste de Portugal), em 2009, de acordo com critérios de uso medicinal e padrões de crescimento da planta. As pétalas foram removidas de botões em flor e de flores após antese (antras já abertas, estames em processo de secagem) no início da Primavera. Os exemplares prensados e montados encontram-se depositados no Herbário da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança. As amostras foram liofilizadas no equipamento Ly-8-FM-ULE e mantidas nas melhores condições para posterior uso.

**Preparação do extrato:** Exatamente 1 g de amostra foi extraída com 30 mL de uma mistura metanol:água 80:20 (v/v) à temperatura ambiente, sob agitação (150 rpm) durante 1h. O extrato foi filtrado através de papel de filtro *whatman* nº 4. O extrato foi re-extraído uma segunda vez utilizando 30 mL adicionais da mistura metanol:água 80:20 (v/v). O extrato foi, de seguida, evaporado a 35°C no evaporador rotativo (Büchi

R-210) para remoção do solvente e posteriormente liofilizado. Esta foi a forma utilizada para microencapsular.

**Microencapsulação:** A microencapsulação do extrato de *Rosa micrantha* foi realizada seguindo as condições otimizadas descritas no ponto 3.2.1. Em síntese, as condições finais estabelecidas e utilizadas foram: caudal 0,3 mL/min, pressão 0,1 bar, volume solução de coagulação de 250 mL e tempo de coagulação de 4 h. O extrato foi dissolvido em 10ml de água destilada, tendo a solução resultante sido filtrada (filtro 0,22 $\mu$ m) para a remoção de resíduos insolúveis do extrato. Posteriormente adicionaram-se 400 mg de alginato à solução anterior que foi mantida sob agitação até apresentar uma aparência homogênea. A seringa foi carregada com 10 mL da solução de alginato de sódio contendo o extrato o que correspondeu a cerca 8 mL efetivamente atomizados dado os volumes mortos do equipamento e outras perdas. O procedimento de lavagem/recuperação das microesferas foi idêntico ao descrito anteriormente no ponto 3.2.1.

### 3.2.3. Caracterização das microesferas

As microesferas produzidas contendo a catequina ou o extrato hidroalcoólico de *Rosa micrantha* foram caracterizadas utilizando as seguintes metodologias:

**Microscopia ótica:** As microesferas foram analisadas através de microscopia ótica (MO) com recurso a um microscópio da marca Nikon equipado com camara digital para aquisição de dados. Foram adquiridas imagens com a ampliação de 40, 100, e 400X. Para monitorizar o processo de produção foram registadas imagens imediatamente após a finalização da atomização e após a etapa de coagulação. Para monitorizar o processo de coagulação registaram-se imagens para dois tempos de coagulação (4 e 24 horas). Como análise de rotina foram registadas imagens após produção, coagulação, liofilização e reidratação. Os dados obtidos permitiram analisar a morfologia e estimar o tamanho das partículas produzidas, mediante o uso de uma calibração existente do microscópio que estabelece a relação entre o número de pixéis e a unidade de comprimento (micrómetros ( $\mu$ m)). Adicionalmente avaliou-se de forma

qualitativa a consolidação das microesferas: numa fase inicial (não consolidadas) apresentavam um aspeto de gel fino deformando-se facilmente; numa fase final (consolidadas) apresentavam uma forma regular e não se deformavam.

**Análise por FTIR:** A presença do princípio ativo na matriz de alginato das microesferas produzidas foi verificada por intermédio da análise por FTIR, recorrendo a um espectrofotómetro FTIR Bomen (modelo MB 104). Analisaram-se amostras de alginato de sódio, do princípio ativo e respetivas microesferas. As amostras foram analisadas através da preparação de pastilhas de KBr com uma concentração de 0.8% (8 mg de amostra/100 mg de KBr). A leitura foi realizada para a gama compreendida entre  $650\text{ cm}^{-1}$  e  $4000\text{ cm}^{-1}$  utilizando 48 varrimentos.

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

**Eficiência de microencapsulação:** O processo para a determinação da eficiência de microencapsulação foi otimizado neste trabalho tendo por base os ensaios realizados com a catequina. No método final adotado, a avaliação da eficiência de encapsulação (EE) foi determinada por quantificação do extrato não encapsulado. O valor da eficiência de encapsulação (EE) foi determinado através da razão entre a massa do princípio ativo encapsulado e a massa princípio ativo teórico (Mp.a.i). A massa de princípio ativo encapsulado é determinada pela diferença entre Mp.a.i e a massa princípio ativo não encapsulado (Mp.a.ne). O Mp.a.ne é quantificado cumulativamente através da técnica de HPLC nas soluções de coagulação e na primeira solução de lavagem (primeiro ciclo de lavagem). A eficiência de encapsulação foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$EE (\%) = \frac{Mp.a.i - Mp.a.ne}{Mp.a.i} \times 100 \quad \text{Eq.(1)}$$

Nos ensaios de encapsulação do extrato a eficiência de encapsulação foi estimada com base na catequina, o flavonoide maioritário.

**Capacidade de reidratação:** A capacidade de reidratação das microesferas liofilizadas foi efetuada colocando 50 mg destas em 1 mL de água destilada. Seguidamente acondicionou-se a amostra num local ao abrigo da luz durante 24 h. Decorrido este período, procedeu-se à observação das microesferas por microscopia ótica para avaliar a recuperação do volume e forma e efetuou-se a sua pesagem.

#### **3.2.4. Incorporação do extrato de *Rosa micrantha* encapsulado e livre num iogurte natural**

A incorporação das microesferas contendo o extrato de *Rosa micrantha* foi testada utilizando como matriz alimentar um iogurte natural. Nesta etapa avaliaram-se as propriedades antioxidantes do iogurte, após incorporação do extrato livre ou microencapsulado, relativamente a um controlo (iogurte puro). O iogurte selecionado correspondeu a um iogurte natural sem adição de açúcares e com 3,5% de matéria gorda (MG Milbona).

De forma a garantir a homogeneidade da amostra foram colocados 140 g de iogurte num recipiente de vidro. Esta matriz foi dividida em 6 porções para a preparação das seguintes amostras: (A) duas amostras de 25 g de iogurte simples (controlo); (B) duas amostras de 25 g de iogurte para incorporação do extrato livre (6,25 mg); (C) duas amostras de 20 g para incorporação do extrato microencapsulado (40 mg). O conteúdo de microesferas adicionado na amostra (C) foi selecionado tendo em conta que a quantidade de princípio ativo presente em 40 mg microesferas deveria ser equivalente à quantidade de princípio ativo livre utilizada em (B).

Foi efetuada a análise de dois tempos distintos: tempo inicial ( $t_0$ ) isto é o momento imediatamente após a adição do extrato e do respetivo microencapsulado, e o tempo de 3 dias ( $t_3$ ). Durante este período de três dias as amostras foram acondicionadas a 4°C num frigorífico. Após recolha das amostras, seguindo a metodologia planeada ( $t=0$  e  $t=3$  dias), estas foram liofilizadas e acondicionadas para posterior análise.

As amostras foram submetidas a dois ensaios laboratoriais para a determinação da atividade antioxidante (atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor):

### 3.2.5. Avaliação *in vitro* das propriedades antioxidantes do iogurte

Foram aplicados dois ensaios seguindo a metodologia descrita no trabalho de Barros et al. (2013): (i) atividade captadora de radicais DPPH e (ii) poder redutor.

O fundamento do teste (i) assenta na capacidade do princípio ativo para reduzir o radical DPPH através da doação de hidrogénio, o que estabiliza esta molécula. Para o teste (ii) a atividade antioxidante do princípio ativo é avaliada através da redução de Ferro (III) a Ferro (II).

Precedendo a aplicação das técnicas, as amostras de iogurte liofilizadas foram alvo de um processo extrativo onde exatamente 1,5 g de amostra foi extraída com 20 mL de metanol à temperatura ambiente sob agitação (150 rpm durante 1 h). O extrato foi filtrado através de papel de filtro *whatman* nº 4. Os extratos recuperados foram, de seguida, evaporados a 35°C no evaporador rotativo (Büchi R-210) para remoção do metanol. Preparou-se uma solução mãe com 100 mg/mL tendo-se realizado seguidamente 5 diluições sucessivas. A gama da concentração de extrato para determinar os valores de EC<sub>50</sub> variou entre 100 e 1,5625 mg/mL.

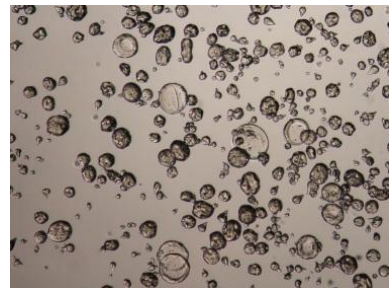
O procedimento mais detalhado para a aplicação de cada uma das técnicas descreve-se de seguida.

**Atividade captadora de radicais DPPH:** Esta metodologia foi realizada utilizando um Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek equipamento, Inc.). A mistura da reação em cada um dos 96 poços consistiu em: extrato de cada uma das concentrações testadas (30 µL) e solução metanólica (270 µL) contendo radicais DPPH ( $6 \times 10^{-5}$  mol/L). A mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro. A redução do radical DPPH foi determinada pela medição da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais (RSA) foi calculada como percentagem da descoloração da solução de DPPH, usando a equação:  $\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_S)/A_{\text{DPPH}}] 100$ , onde  $A_S$  é a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e  $A_{\text{DPPH}}$  é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato que leva a 50% da atividade captadora de radicais (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico de percentagem RSA em função da concentração de extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

**Poder redutor:** Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As diferentes concentrações de extrato (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e adicionou-se ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 0,5 mL).

A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto férrico (0,1% w/v, 0,16 mL). A absorvância foi medida a 690 nm. A concentração de extrato que fornece 0,5 de absorvância (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Utilizou-se trolox como padrão.

## **4 Resultados e discussão**



## 4.1 Processo de encapsulação

### 4.1.1. Desenvolvimento do processo

Esta etapa foi realizada com o objetivo de determinar as condições ótimas de microencapsulação. O material encapsulante selecionado foi o alginato dado as suas propriedades gelificantes, sensibilidade ao pH e aplicabilidade na área alimentar. É a sua sensibilidade ao pH que potencia a libertação do princípio ativo no trato intestinal.

O processo de microencapsulação foi desenvolvido utilizando a catequina, o flavonoide maioritário do extrato alvo (*Rosa micrantha*), como composto modelo. O método desenvolvido teve por base trabalhos anteriores desenvolvidos no LSRE-IPB (Ribeiro e Vieira, 2012). A concentração do material de encapsulação (alginato) foi fixada em 4% (m/v) e a do agente de coagulação (cloreto de cálcio) também em 4% (m/v). Como condições de atomização utilizou-se uma pressão e o caudal de 0,1 bar e 0,3 mL/min, respetivamente.

Foram estudadas as seguintes variáveis: (i) razão catequina/alginato, (ii) volume da solução de coagulação e (iii) tempo de coagulação. No total foram realizados 8 ensaios de otimização que estão documentados nas fichas de registo presentes no ANEXO A. A Tabela 4.1 apresenta um resumo das condições aplicadas em cada ensaio. A designação de Alg diz respeito à produção de microesferas vazias (sem princípio ativo) e a de Cat à produção de microesferas contendo catequina.

**Razão catequina/alginato:** foram testadas três razões catequina/alginato (0,0250; 0,0625; 0,1250). O aumento da razão catequina/alginato foi também acompanhado por um aumento de volume de água dado os problemas detetados para a solubilidade da catequina em meio aquoso. Inicialmente partiu-se de uma razão 0,0250 (10/400) tomando por base 10 mL de água (ensaios Cat\_002 e Cat\_004). Face aos ensaios realizados foi considerado como viável utilizar uma razão catequina/alginato de 0,1250 sendo esta testada inicialmente no ensaio Cat\_007 tendo por base os 10 mL de água inicialmente previstos. O ensaio Cat\_008 correspondeu à duplicação do ensaio Cat\_007 mas efetuado a uma escala superior de forma a obter a quantidade necessária para realizar os ensaios posteriores de incorporação do microencapsulado no iogurte.

Tabela 4.1. Ensaios realizados na otimização das condições de microencapsulação.

| Ensaio  | Massa princípio ativo ( $m_{PI}$ , mg) | Massa alginato ( $m_{Alg}$ , mg) | Razão $m_{PI}/m_{Alg}$ | Volume solução princípio ativo ( $V_{S,PI}$ , mL) | Volume solução coagulação ( $V_{S,Coag}$ , mL) | Tempo coagulação ( $t_{coag}$ , h) | Volume atomizado ( $V_{at}$ , mL) | Massa microesferas húmidas ( $m_{MIC-h}$ , g) | Massa microesferas secas ( $m_{MIC-s}$ , g) | Eficiência de encapsulação (EE, %) |
|---------|--|----------------------------------|------------------------|---|--|------------------------------------|-----------------------------------|---|---|------------------------------------|
| Alg_001 | n.a.                                   | 400                              | n.a.                   | 10  | 500  | 24                                 | 7                                 | 3,677   | 0,257 (1)                                   | n.a                                |
| Cat_002 | 10                                     | 400                              | 0,025                  | 10  | 500  | 24                                 | 7                                 | 3,107   | 0,217 (1)                                   | n.a                                |
| Alg_003 | n.a.                                   | 400                              | n.a.                   | 10  | 500  | 24                                 | 7                                 | 2,666   | 0,194 (2)                                   | n.a                                |
| Cat_004 | 10                                     | 400                              | 0,025                  | 10  | 500  | 24                                 | 7                                 | 2,905   | 0,196 (2)                                   | 61                                 |
| Cat_005 | 50                                     | 800                              | 0,0625                 | 20  | 500  | 24                                 | 10                                | 5,6388  | 0,369 (2)                                   | 72                                 |
| Cat_006 | 25                                     | 400                              | 0,0625                 | 10  | 500  | 4                                  | 7                                 | 3,065   | n.a.  | 70                                 |
| Cat_007 | 50                                     | 400                              | 0,125                  | 10  | 250  | 4                                  | 7                                 | 2,182   | 0,140 (2)                                   | 9                                  |
| Cat_008 | 100                                    | 800                              | 0,125                  | 20  | 500  | 4                                  | 18                                | 5,969   | 0,399 (2)                                   | 53                                 |

(1) Processo de secagem –na estufa a 100°C; (2) Processo de secagem – liofilização

n.a. – não aplicável

Para todos os ensaios o valor de resíduo seco determinado foi de aproximadamente 7%

**Volume da solução de coagulação:** Neste estudo fixou-se a concentração do agente de coagulação ( $\text{CaCl}_2$ ) e testou-se a utilização de diferentes volumes, nomeadamente 500 e 250 mL. Inicialmente utilizaram-se as condições do trabalho de Ribeiro e Vieira (2012) (500 mL). No entanto durante o desenvolvimento da metodologia para determinação da eficiência de encapsulação (realizada em paralelo com o desenvolvimento do processo) verificou-se que a utilização de um volume de 500 mL facilitava a perda do princípio ativo. Nesse sentido testou-se a redução do volume para 250 mL, mantendo-se a concentração, tendo-se verificado que o processo no respeito à consolidação das microesferas não foi prejudicado. De facto o uso dos 500 mL corresponde à utilização de uma razão  $\text{CaCl}_2$ /alginate de 50X (m/m) que passou a ser 25X no caso dos 250 mL. Estas condições passaram a ser utilizadas a partir do ensaio Cat\_007 e corresponde às condições otimizadas.

**Tempo de coagulação:** O tempo de contato das microesferas recém-produzidas com a solução de coagulação foi estabelecido inicialmente em 24 h com base no trabalho de Ribeiro e Vieira, 2012. No entanto, no ensaio cat\_005 fez-se a monitorização do processo de consolidação tendo-se retirado amostras para os tempos de 4 e 24 h. Para esses tempos foi feita a observação ao microscópio e analisou-se a quantidade de catequina, expressa em  $\mu\text{g/mL}$ , presente na solução de coagulação. Verificou-se que esta concentração foi de 4,38  $\mu\text{g/mL}$  e de 10,9  $\mu\text{g/mL}$ , respetivamente ao fim de 4 e 24 horas. Como a consolidação das microesferas, tal como verificado por microscopia ótica, foi considerada suficiente (idêntica à obtida para 24 h) passou a utilizar-se um tempo de coagulação de 4 h (a partir do ensaio Cat\_006).

Em síntese as condições do processo de encapsulação estudadas foram fixadas da seguinte forma:

Razão catequina/alginate: 0,125

Volume da solução de coagulação: 250 mL

Tempo de coagulação: 4 h

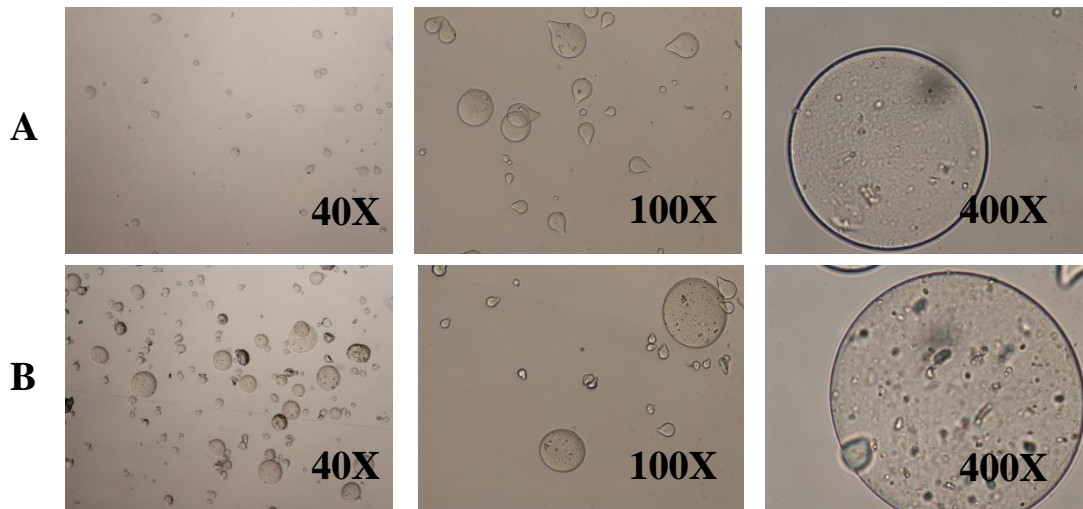
#### 4.1.2 Eficiência de microencapsulação

A eficiência de microencapsulação foi determinada recorrendo à quantificação da catequina por HPLC. Foram testados dois métodos:

**Método direto:** com esta metodologia pretendeu-se avaliar a quantidade encapsulada por destruição das microesferas recorrendo à utilização de um tampão de fosfato conforme descrito nos trabalhos Lee et al (2008), Prasanth et al (2011), e Raj (2013) tendo sido testados 2 pHs (6,8 e 7,4). Verificou-se que a quantidade de catequina detetada foi baixa ou nula, possivelmente devido à destruição/complexação da catequina com algum dos reagentes do tampão. O registo destes ensaios pode ser consultado no ANEXO A.

**Método indireto:** nesta metodologia a eficiência foi calculada tendo por base a quantificação da catequina não encapsulada. Este parâmetro começou a ser determinado no ensaio Cat\_004. Contudo, para estabelecer o método foi realizado o ensaio Cat\_006 onde se avaliou a presença de catequina nas soluções de coagulação e lavagem. Foram retiradas as seguintes amostras para análise por HPLC: (i) solução de coagulação obtida no final do processo após filtração; (ii) 1ª e 2ª solução de lavagem (efetuadas com 100 mL e 50 mL de água, respetivamente). Verificou-se a presença de catequina na solução de coagulação analisada assim como na 1ª solução de lavagem. No que respeita a 2ª solução de lavagem não foi detetada a presença de catequina. Desta forma a quantificação da catequina por encapsular foi calculada adicionando as contribuições da solução de coagulação e 1ª solução de lavagem. Para o ensaio em causa obteve-se um valor de cerca de 70% de eficiência de encapsulação.

A Figura 4.1 mostra o registo por MO das microesferas produzidas no último ensaio (Cat\_008). As microesferas obtidas apresentaram um tamanho que variou entre 48 µm e 270 µm. Para estas microesferas obteve-se uma eficiência de encapsulação de 53,3% e um resíduo seco de 7%.



**Figura 4.1.** Evolução da morfologia das microesferas (Cat\_008) durante o processo para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 4 h de consolidação (B).

#### 4.2. Microencapsulação do extrato de *Rosa micrantha* (Figura 4.2)

As microesferas de alginato incorporando o extrato de *R. micrantha* foram preparadas através da técnica atomização/coagulação tendo sido realizados dois ensaios de microencapsulação (Tabela 4.2). O primeiro ensaio destinou-se a testar a aplicação do método desenvolvido com a catequina e o segundo teve por objetivo a produção para utilização nos ensaios de incorporação no iogurte. O registo completo destas experiências encontra-se no ANEXO B. A Figura 4.3 mostra a análise por MO das microesferas obtidas após atomização e após decorrido o período de coagulação.

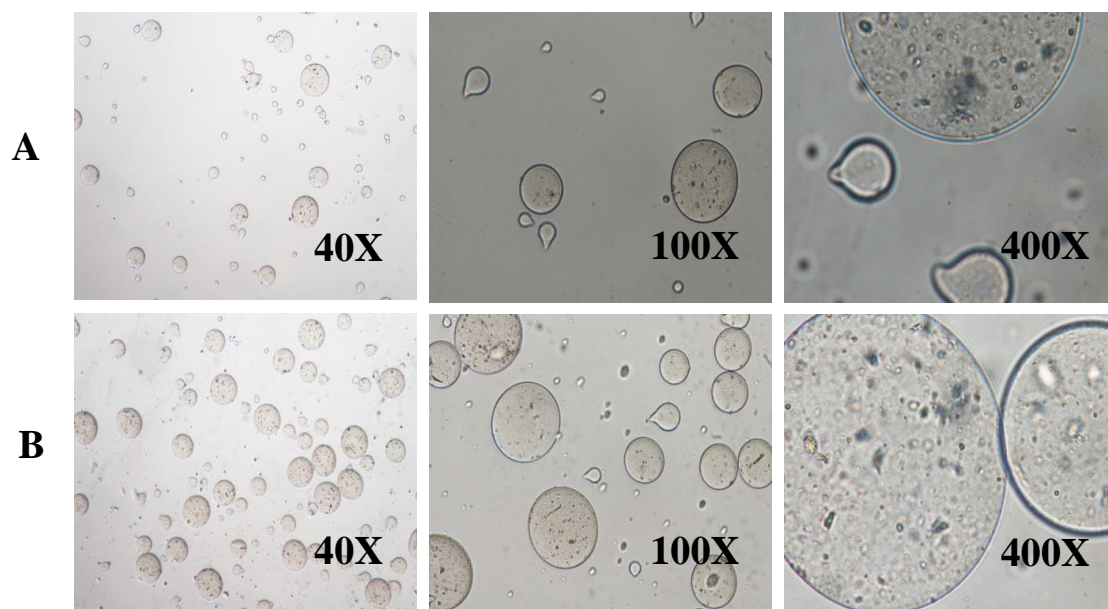


**Figura 4.2.** Preparação das microesferas por atomização/coagulação.

Tabela 4.2. Ensaios realizados para otimização de condições do processo de microencapsulação.

| Ensaio | Massa princípio ativo ( $m_{PI}$ , mg) | Massa alginato ( $m_{Alg}$ , mg) | Razão $m_{PI}/m_{Alg}$ | Volume solução princípio ativo ( $V_{S,PI}$ , mL) | Volume solução coagulação ( $V_{S,Coag}$ , mL) | Tempo coagulação ( $t_{coag}$ , h) | Volume atomizado ( $V_{at}$ , mL) | Massa microesferas húmidas ( $m_{MIC-h}$ , g) | Massa microesferas secas ( $m_{MIC-s}$ , g) | Eficiência de encapsulação (EE, %) |
|--------|--|----------------------------------|------------------------|---|--|------------------------------------|-----------------------------------|---|---|------------------------------------|
| RM_001 | 50                                     | 400                              | 0,125                  | 10  | 250  | 4                                  | 6                                 | 2,361   | 0,158                                       | 100                                |
| RM_002 | 100                                    | 800                              | 0,125                  | 20  | 500  | 4                                  | 15                                | 4,879   | 0,319                                       | 100                                |

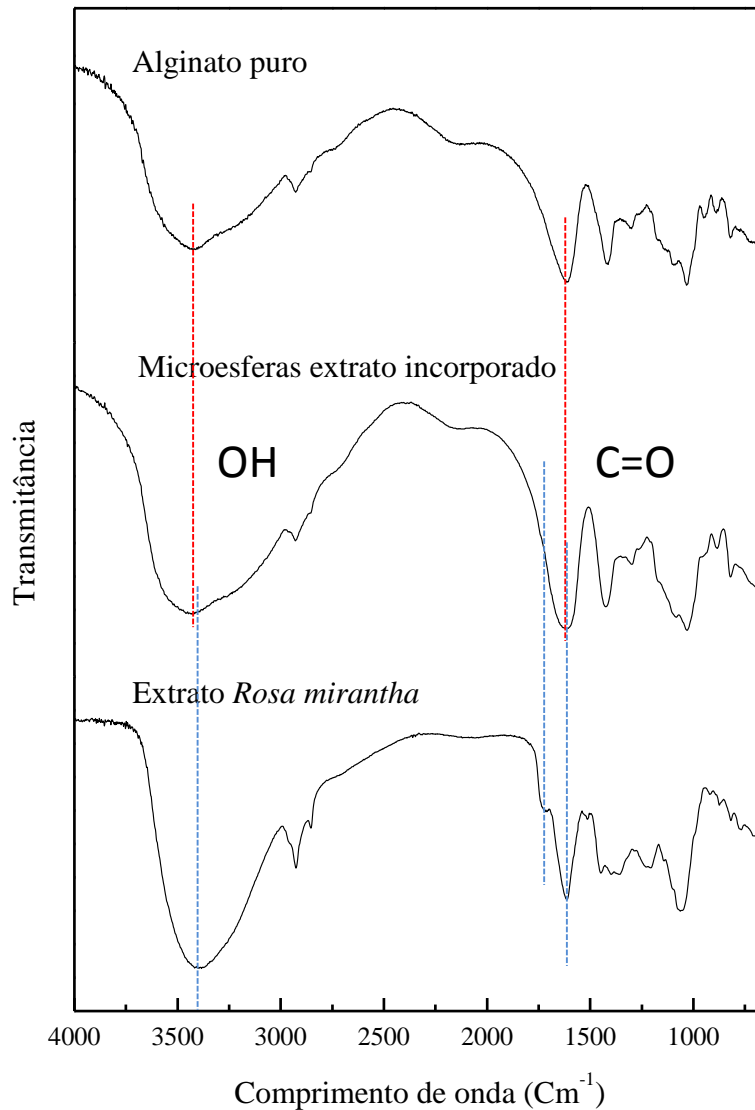
Para todos os ensaios o valor de resíduo seco determinado foi de aproximadamente 7%



**Figura 4.3.** Evolução da morfologia das microesferas durante o processo de microencapsulação (ensaio RM\_002) para uma ampliação de 40x, 100x e 400x: Após atomização (A) e após 4 h de consolidação (B).

Após atomização as microesferas produzidas apresentavam uma ligeira deformação (forma semelhante a uma pera). Após o período de consolidação o número de microesferas com morfologia esférica aumentou, comprovando que houve uma boa consolidação. O tamanho das microesferas obtidas neste ensaio variou entre 59  $\mu\text{m}$  e 331  $\mu\text{m}$ . Obteve-se um resíduo sólido de 7% e a eficiência de encapsulação foi estimada em 100% (não foi registada a presença de catequina na análise por HPLC nas soluções utilizadas para a sua quantificação).

A análise FITR foi realizada para verificar se houve uma microencapsulação efetiva do extrato A Figura 4.4 mostra os espectros obtidos para o alginato puro, extrato *Rosa micrantha* e respetivas microesferas. Como era esperado o espectro das microesferas é marcado pela dominância da presença do alginato (razão alginato/extrato 400:50 (mg/mg)). Apesar deste resultado podemos verificar por comparação do espectro do alginato com o espectro das microesferas que para este último ocorre uma intensificação da banda OHs relativamente à dos C=Os, o que pode ser justificado pela incorporação de um extrato rico em OHs.



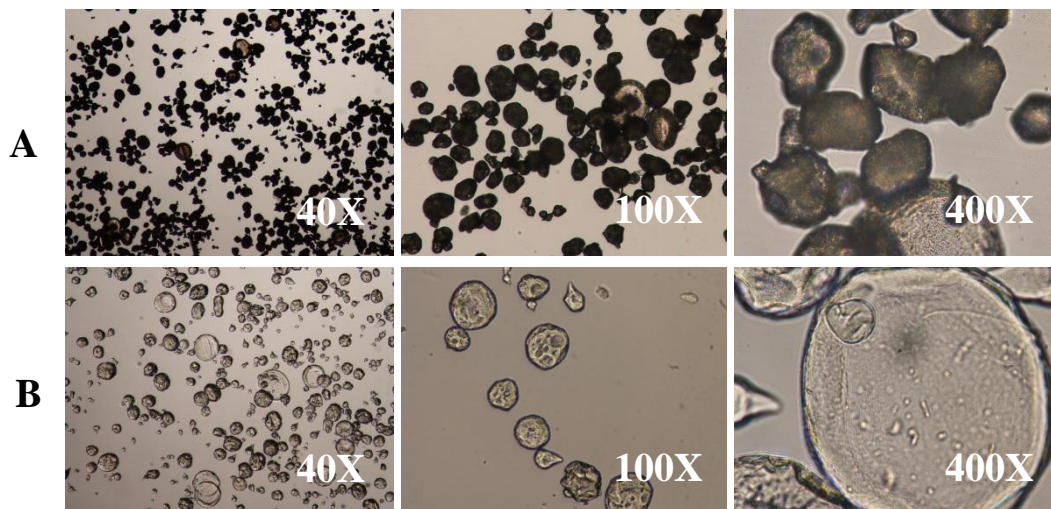
**Figura 4.4.** Espectro FTIR do alginato, extrato *R. micrantha* e respectivas microesferas.

### 4.3 Testes de reidratação

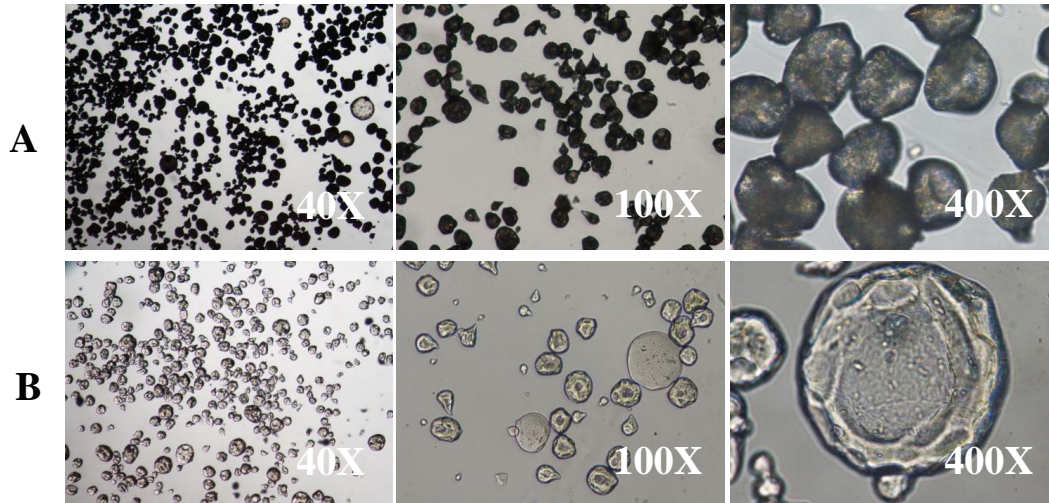
O processo de reidratação das microesferas foi realizado utilizando as microesferas preparadas com catequina e com o extrato. O procedimento consistiu em colocar as microesferas em contacto com a água ao longo de um período de 24 h sendo depois avaliada a quantidade de água recuperada. A Figura 4.5 mostra o registo de

imagens realizado por MO antes da reidratação (microesferas liofilizadas) e após 24 horas em contacto com a água (microesferas reidratadas) das microesferas contendo catequina. A Figura 4.6 mostra o registo equivalente para as microesferas contendo o extrato.

Para o ensaio utilizou-se uma amostra de microesferas liofilizadas de 50 mg (correspondente a uma massa de 714 mg de microesferas hidratadas tendo em consideração um resíduo seco de 7%). No que refere às microesferas contendo catequina, após o período de reidratação, a massa das microesferas foi de 583 mg, correspondendo a uma capacidade de reidratação de 81,6%. Para as microesferas contendo o extrato obteve-se uma massa 575 mg. Esta variação indica que a capacidade de reidratação foi de cerca de 80,5% consistente com um valor obtido anteriormente. Em síntese, as partículas produzidas revelam elevada capacidade para recuperar a forma original indicando que a liofilização é uma boa forma de acondicionar as microesferas após produção.



**Figura 4.5** Processo de reidratação das microesferas de catequina (ampliação de 40x, 100x e 400x): Microesferas liofilizadas (A) e Microesferas após 24 h reidratação (B).



**Figura 4.6.** Processo de reidratação das microesferas de extrato *R. micrantha* (ampliação de 40x, 100x e 400x): Microesferas liofilizadas (A) e Microesferas após 24 h reidratação (B).

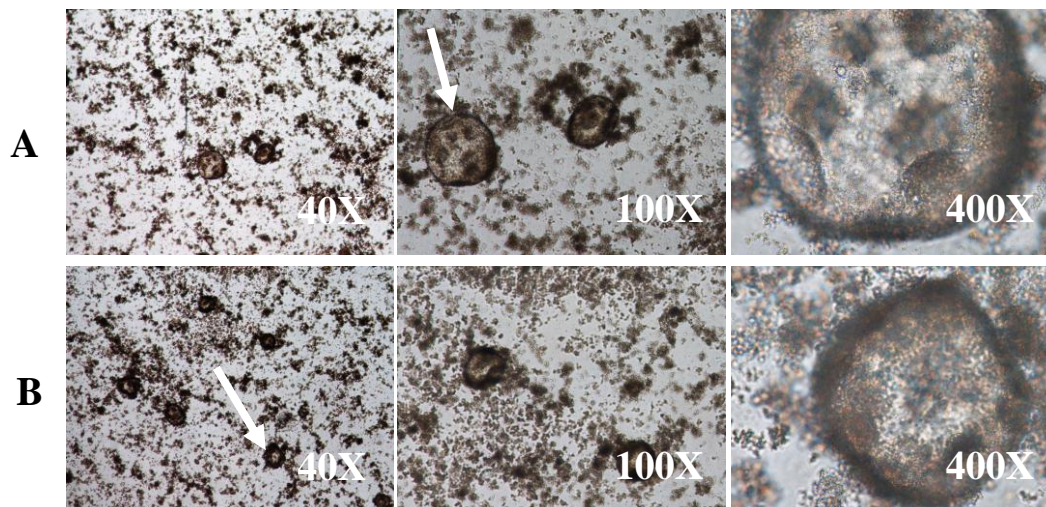
#### 4.4 Incorporação do extrato de *Rosa micrantha* encapsulado e livre num iogurte natural

A Figura 4.7 mostra o aspeto das microesferas contendo o extrato distribuídas na matriz de iogurte para o tempo zero ( $t=0$ ) e após três dias ( $t=3$ ). Este registo confirma a manutenção das microesferas ao longo do período em análise comprovando que alginato é um material viável para encapsular estes compostos tendo em vista a sua utilização em iogurtes. A Tabela 4.3 mostra os resultados obtidos para a atividade antioxidante avaliada de acordo com dois parâmetros: atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor para  $t=0$  e  $t=3$ . A análise foi realizada com o iogurte aditivado com o extrato livre e o extrato encapsulado comparativamente com um controlo (iogurte natural sem qualquer aditivação).

Segundo o teste da atividade captadora de radicais DPPH o extrato livre apresentava para  $t=0$  uma atividade antioxidante que superava a do controlo e da forma microencapsulada. O mesmo não se verificou para  $t=3$ , no qual ocorre uma redução da atividade antioxidante da amostra contendo extrato livre. Tal sugere que ocorreu degradação do extrato livre (extrato não protegido). No que respeita ao microencapsulado, após  $t=3$  dias verificou-se uma diminuição do valor de  $EC_{50}$  (incremento da atividade antioxidante do iogurte analisado) podendo significar que

ocorreu alguma libertação do extrato a partir das microesferas. Tal aponta para uma capacidade protetora da microesfera, a qual permite estabilizar o extrato nas condições de aplicação do teste.

Os resultados do teste do poder redutor apontam no mesmo sentido, indicando que apesar de o extrato livre apresentar uma atividade antioxidante inicial superior esta é perdida com o tempo ( $t=3$ ) apontando a sua degradação. Por outro lado, as microesferas contendo o extrato encapsulado parecem promover uma libertação lenta deste o que é comprovado pela observação de uma ligeira diminuição do valor do  $EC_{50}$ . De realçar que estas conclusões supõem que o material da microesfera não é destruído pelos reagentes utilizados nos testes de atividade antioxidante sendo a variação observada devida apenas ao extrato libertado e não ao que permaneceu protegido nas microesferas. Desta forma os resultados parecem indicar uma proteção efetiva do extrato pelas esferas de alginato o que potencia a sua biodisponibilidade no momento da ingestão.

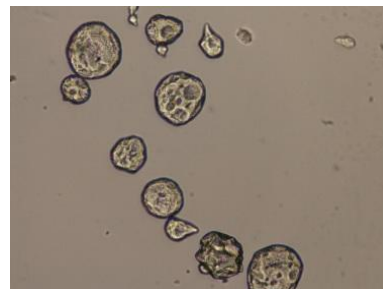


**Figura 4.7.** Incorporação de microesferas num iogurte natural para uma ampliação de 40X, 100X e 400X: (A) para  $t=0$  dias, (B) para  $t=3$  dias. A seta branca põe em evidência as estruturas microencapsuladas.

**Tabela 4.3.** Atividade antioxidante de iogurte natural enriquecido com extrato *Rosa micrantha* livre e encapsulado (média  $\pm$  SD).

|  | <b>Iogurte Controlado</b> |                  | <b>Iogurte com princípio livre</b> |                  | <b>Iogurte com princípio microencapsulado</b> |                  |
|--|---------------------------|------------------|------------------------------------|------------------|---|------------------|
|  | 0 dias                    | 3 dias           | 0 dias                             | 3 dias           | 0 dias  | 3 dias           |
| Atividade captadora de radicais DPPH (mg/mL) | 142,30 $\pm$ 16,13        | 90,20 $\pm$ 1,92 | 49,36 $\pm$ 1,45                   | 68,73 $\pm$ 3,91 | 138,73 $\pm$ 4,62                             | 94,68 $\pm$ 1,18 |
| Poder redutor (mg/mL)                        | 5,20 $\pm$ 0,10           | 5,71 $\pm$ 0,09  | 2,85 $\pm$ 0,05                    | 3,17 $\pm$ 0,04  | 5,54 $\pm$ 0,05                               | 5,01 $\pm$ 0,09  |

**5. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro**



### 5.1. Conclusões e perspectivas de trabalho futuro

O principal objetivo do presente trabalho consistiu na produção e caracterização de microesferas contendo um extrato hidroalcoólico de extrato de *Rosa micrantha*, extrato rico em compostos fenólicos de elevado poder antioxidante, e posterior avaliação das vantagens da sua incorporação numa matriz alimentar (iogurte natural). Os compostos fenólicos são conhecidos pela sua instabilidade, podendo sofrer alterações durante o processamento dos alimentos onde são incorporados e após processos metabólicos. Neste contexto, a microencapsulação permite ultrapassar estes fatores limitantes protegendo-os e permitindo ainda a sua libertação controlada e/ou localizada.

Numa primeira etapa procedeu-se à otimização do processo de microencapsulação utilizando o flavonoide maioritário presente neste extrato, a catequina. A microencapsulação foi realizada no sistema NISCO Var J30. A técnica de atomização/coagulação foi aplicada utilizando como condições de atomização uma pressão de 0,1 bar e um caudal de alimentação ao nozzle de 0,3 mL/min. Como material encapsulante seleccionou-se o alginato (utilizou-se uma solução aquosa a 4%, m/v) e como agente de coagulação o CaCl<sub>2</sub> (utilizou-se uma solução aquosa a 4%, m/v). Foram estudadas as seguintes variáveis: (i) razão catequina/alginato; (ii) volume da solução de coagulação e (iii) tempo de coagulação. Como resultado do estudo realizado as condições do processo foram fixadas em: (i) razão catequina/alginato: 0,125; (ii) volume da solução de coagulação: 250 mL e (iii) tempo de coagulação: 4h. Estas condições otimizadas foram, numa segunda fase do trabalho, aplicadas à microencapsulação do extrato de *R. micrantha*.

A monitorização do processo de microencapsulação efetuou-se analisando os seus pontos críticos, por visualização das microesferas em fase de produção por microscopia ótica. As microesferas finais foram caracterizadas relativamente ao resíduo seco, eficiência de encapsulação e capacidade de reidratação. Adicionalmente a estas caracterizações, a presença do extrato no interior das microesferas foi examinada por análise FTIR. O resíduo seco determinado rondou os 7%, e as microesferas reidratadas conseguiram, num período de 24h recuperar cerca de 80% e 81% da sua massa original, respetivamente para as microesferas de catequina. O processo de encapsulação do

extrato de *R. micrantha* apresentou um rendimento, estimado com base na catequina, muito próximo dos 100%.

Numa terceira etapa do trabalho, e após a obtenção das microesferas liofilizadas contendo o extrato, procedeu-se à sua incorporação num iogurte natural. O principal objetivo deste estudo consistiu na avaliação das propriedades antioxidantes do iogurte quando aditivado com o encapsulado produzido, comparativamente com a situação de se utilizar o extrato na sua forma livre e com o iogurte natural simples (controlo). A atividade antioxidante foi avaliada recorrendo a dois testes (atividade captadora de radicais DPPH e poder redutor) em dois períodos de tempo: instante inicial ( $t=0$ ) e após três dias ( $t=3$ ).

Foi observado que para  $t=0$  a atividade antioxidante do iogurte contendo o extrato na forma livre foi superior à do controlo e à do iogurte contendo a forma microencapsulada. Para  $t=3$ , registou-se uma redução da atividade antioxidante da amostra contendo o extrato livre, o que apontou para a sua degradação. No que respeita ao iogurte contendo o microencapsulado, após  $t=3$  dias verificou-se uma diminuição do valor de  $EC_{50}$  (incremento da atividade antioxidante) podendo esta observação ser justificada pela ocorrência de libertação do extrato a partir das microesferas. Tal aponta para uma capacidade protetora da microesfera, a qual permite estabilizar o extrato proporcionando a manutenção da sua capacidade antioxidante nas condições de realização do ensaio. Assim, perspectiva-se que no ato de ingestão do iogurte a quantidade de extrato biodisponível seja superior numa situação em que se utilize a sua forma microencapsulada.

Como trabalho futuro, e numa perspectiva de continuidade deste trabalho, poderão ser realizados ensaios de libertação do conteúdo das microesferas em condições orgânicas, simulando as condições do organismo humano, nomeadamente as condições do estômago e trato intestinal. A incorporação do extrato microencapsulado em outras matrizes alimentares, a realização de testes laboratoriais complementares ou o incremento do tempo de estudo para os testes aplicados neste trabalho, podem contribuir também para uma melhor compreensão da atividade biológica destes compostos microencapsulados.

## **6. Referências bibliográficas**



- Arun, R.R. (2013). Design and development of aceclofenac alginate beads for sustained release drug delivery. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 82-85.
- Augustin, M.A., Hemar, Y. (2009). Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, 38, 902–912.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agriindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99, 191–203.
- Barros, L., Alves, C.T., Dueñas, M., Silva, S., Oliveira, R., Carvalho, A.M., Henriques, M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Characterization of phenolic compounds in wild medicinal flowers from Portugal by HPLC–DAD–ESI/MS and evaluation of antifungal properties. *Industrial Crops and Products*, 44, 104-110.
- Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I.J., Nedović, V., Bugarski, B. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Research International*, 94, 1094-1101.
- Betz, M., Steiner, B., Schantz, M., Oidtmann, J., Mäder, K., Richling, E., Kulozik, U. (2012). Antioxidant capacity of bilberry extract microencapsulated in whey protein hydrogels. *Food Research International*, 47, 51-57.
- Çam, M., İçyer, N.C., Erdogan, F. (2013). Pomegranate peel phenolics: Microencapsulation, storage stability and potential ingredient for functional food development. *LWT - Food Science and Technology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.09.011>.

- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (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.F.R. (2013b). The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer – A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236-58.
- Chatterjee, D., Bhattacharjee, P. (2013). Comparative evaluation of the antioxidant efficacy of encapsulated and un-encapsulated eugenol-rich clove extracts in soybean oil: Shelf-life and frying stability of soybean oil. *Journal of Food Engineering*, 117, 545–550.
- Cilek, B., Luca, A., Hasirci, V., Sahin, S., Sumnu, G. (2012). Microencapsulation of phenolic compounds extracted from sour cherry pomace: effect of formulation, ultrasonication time and core to coating ratio. *European Food Research and Technology*, 235, 587–596.
- CN103005156, Preparation method of beta-carotene for microencapsulation feed.
- CN102499353, Method for efficiently extracting and stably storing bayberry polyphenol.
- CN102550817, Functional oil microencapsulation and manufacturing method thereof.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. (2009). Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nature Products Reports*, 26, 1001-1043.
- D'Archivio, M. *et al.* (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 3, 348-361.

- Draget, K.I., Taylor, C. (2011). Chemical, physical and biological properties of alginates and their biomedical implications. *Food Hydrocolloids*, 25, 251-256.
- Dube, A., Ken Ng, Nicolazzo, J.A., Larson, I. (2010). Effective use of reducing agents and nanoparticle encapsulation in stabilizing catechins in alkaline solution. *Food Chemistry*, 122, 662–667.
- Dubick, M.A., Omaye, S.T. (2001) Modification of atherogenesis and heart disease by grape wine and tea polyphenols. In: Wildman, R. E.C. (org). *Handbook of Nutraceutical and Functional Food*. Boca Raton: CRC Press. 14, 143-153.
- Dueñas, M., González-Manzano, S., González-Paramás, A., Santos-Buelga, C. (2010). Antioxidant evaluation of *O*-methylated metabolites of catechin, epicatechin and quercetin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 443–449.
- Ersus, S., Yurdagel, U. (2007). Microencapsulation of anthocyanin pigments of black carrot (*Daucuscarota L.*) by spray drier. *Journal of Food Engineering*, 80, 805-812.
- Ezhilarasi, P.N., Indrani, D., Jena, B.S., Anandharamakrishnan, C. (2013). Freeze drying technique for microencapsulation of *Garcinia* fruit extract and its effect on bread quality. *Journal of Food Engineering*, 117, 513-520.
- Fang, Y., Yang, S., Wu, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants, and Nutrition. *Nutrition*, 18, 872– 879.
- Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 510-523.
- Fernandes, L.P., Candido, R.C., Oliveira, W.P. (2012). Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. *Food and Bioproducts Processing*, 90, 425-432.

- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V. (2007). Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*, 2, 32-39.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros L., Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Garcia-lafuente, A., Guillamon, E., Villares, A.; Rostagno, M.A., Martinez, J.A. (2009). Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflammation Research*, 58, 537-552.
- George, M., Abraham, T.E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: Alginate and chitosan — a review. *Journal of Controlled Release*, 114, 1-14.
- Gharras, H.L. (2009). Polyphenols: food sources, properties and applications – a review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 2512–2518.
- Goh, C.H., Heng, P.W.S., Chan, L.W. (2012). Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. *Carbohydrate Polymers*, 88, 1-12.
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2010). Studies on Chemical Constituents and Bioactivity of *Rosa micrantha*: An Alternative Antioxidants Source for Food, Pharmaceutical, or Cosmetic Applications. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 6277–6284.
- Han, X., Shen, T., Lou, H. (2007). Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. *International Journal of Molecular Science*, 8, 950-988.
- Harikumar, K.B., Aggarwal B.B. (2008) Resveratrol: a multitargeted agent for age-associated chronic diseases. *Cell Cycle*, 7, 1020-1035.

- Harman, D. (2006). Healthy aging for functional longevity: molecular and cellular interactions in senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 928, 1-21.
- Havsteen, B.H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 67–202.
- Hui, P.C., Wang, W., Kan, C., Sau-Fun, F., Wat, E., Zhang, V., Chan, C., Lau, C.B., Leung, P. (2013). Microencapsulation of Traditional Chinese Herbs—PentaHerbs extracts and potential application in healthcare textiles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 111, 156-161.
- Ignat, I.I.V., Popa V.I. (2011). A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126, 1821-1835.
- Kalogeropoulos, N., Yannakopoulou, K., Gioxari, A., Chiou, A., Makris, D.P. (2010). Polyphenol characterization and encapsulation in b-cyclodextrin of a flavonoid-rich *Hypericum perforatum* (St John's wort) extract *LWT - Food Science and Technology*, 43, 882-889.
- KR20040057565, Microcapsule containing water-soluble isoflavone, production and application thereof.
- Krishnaiah, D. Bono, A., Sarbatly, R., Nithyanandam, R., Anisuzzaman, S.M. (2012). Optimisation of spray drying operating conditions of *Morinda citrifolia* L. fruit extract using response surface methodology. *Journal of King Saud University – Engineering Science*,s <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksues.2012.10.004>.
- Krishnaswamy, K., Orsat, V., Thangavel, K. (2012). Synthesis and characterization of nano-encapsulated catechin by molecular inclusion with beta-cyclodextrin. *Journal of Food Engineering*, 111, 255–264.

- Lee, J., Chung, D., Lee, H.G. (2008). Preparation and characterization of calcium pectinate gel beads entrapping catechin-loaded liposomes. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42, 178–184.
- Lee, K.Y., Mooney, D.J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Progress in Polymer Science*, 37,106-126.
- Lesschaeve, I., Noble, A.C. (2012). Polyphenols: factors influencing their sensory properties and their effects on food and beverage preferences. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 330S-335S.
- Letenneur, L., Proust-Lima, C., Gouge, A. *et al.* (2007). Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period. *American Journal of Epidemiology*, 165, 1364-1371.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., Jimenez, L. (2004). Polyphenols: food sources and bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 79, 727-747.
- Martin, K.R., Appel, C.L. (2009). Polyphenols as dietary supplements: A double-edged sword. *Nutrition and Dietary Supplements*, 2, 1-12.
- Matsui, T., Ebuchi, S., Kobayashi, M., Fukui, K., Sugita, K., Terahara, N., *et al.* (2002). Anti-hyperglycemic effect of diacylated anthocyanin from Ipomea batatas cultivar Ayamurasaki can be achieved by through the a-glucosidase inhibitory action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7244–7248.
- Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a Review. *Pharmaceutics*, 3, 793-829.
- MX2011/006005, microencapsulated antioxidants resulting from red fruits: strawberry (*fragaria vesca l*), grape (*vitis vinifera*), blackberry (*rubus fruticosus l*),

cranberry (*vaccinium oxycoccus*) and blueberry (*vaccinium myrtillus*) for being used in food and pharmaceutical products.

Nakajima, H., Kobayashi, M., Pollard, R.B., Suzuki, F. (2001). Monocyte chemoattractant protein-1 enhances HSV-induced encephalomyelitis by stimulating Th2 responses. *Journal of Leukocyte Biology*, 70, 374–380.

Nedovic, V., Kalusevic, A., Manojlovic, V., Levic, S., Bugarski, B. (2011). An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, 1, 1806-1815.

Obidikea, I.C., Emejeb, M.O. (2011). Microencapsulation enhances the anti-ulcerogenic properties of *Entada Africana* leaf extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 137, 553-561.

Pasin, B.L., Azón, C.G., Garriga, A.M. (2012). Microencapsulation in alginate for food. Technologies and applications. *Revista Venezolana de Ciencia e Tecnologia Alimentar*, 3, 130-151.

Pereira D.M., Valentão P., Pereira J. A., Andrade P. B. (2009). Phenolics: From Chemistry to Biology. *Molecules*, 14, 2202-2211.

Peres, I., Rocha, S., Gomes, J., Morais, S., Pereira, M.C., Coelho, M. (2011). Preservation of catechin antioxidant properties loaded in carbohydrate nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, 86, 147– 153.

Peters, U., Poole, C., Arab, L. (2001). Does tea affect cardiovascular disease? A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology*, 154, 495-503.

Prasanth, V. V., Chakraborty A., Mathew S.T., Parthasarathy, G., Mathappan R., Thoppil, S.C. (2011). Formulation and evaluation of salbutamol sulphate -

- alginate microspheres by ionotropic gelation method. *International Journal of Comprehensive Pharmacy*, 2, 1-4.
- Quideau, S., Deffieux, D., Douat-Casassus, C., Pouységu L. (2011). Plant Polyphenols: Chemical Properties, Biological Activities, and Synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, 50, 586 – 621.
- Ray, S.D., Kumar, M.A., Bagchi, D. (1999). A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-XL expression and prevents acetaminophen induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Archives in Biochemistry and Biophysics*, 369, 42-58.
- Ribeiro, A.S.S., Vieira, D.A.M. (2012). Microencapsulação de Vitamina E para fins Médicos/Alimentares. Mestrado Biomédica. Instituto Politécnico de Bragança – Escola superior de Tecnologia e Gestão.
- Rossi, L., Mazzitelli, S., Arciello, M., Capo, C.R., Rotilio, G. (2008). Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer's disease. *Neurochemistry Research*, 33, 2390–2400.
- Saézn, C., Tapia, S., Chávez, J., Robert, P. (2009). Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). *Food Chemistry*. 114, 616-622.
- Sakihama, Y., Cohen M.F., Grace S.C., Yamasaki, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67-80.
- Silvia, P.I., Stringheta, P.C., Teófilo, R.F., Oliveira, I.R.N. (2013). Parameter optimization for spray-drying microencapsulation of jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*) peel extracts using simultaneous analysis of responses. *Journal of Food Engineering*, 117, 538–544.

- Stevenson, D.E., Scheepens, A., Hurst, R.D. (2010). ; Bioavailability and metabolism of dietary flavonoids – Much known – Much more to discover. *Internacional Journal of Medicinal and Biological frontiers*, 16, 250- 300.
- Songtipya, L., Sanea, A. (2013). Effect of concentration and degree of saturation on co-precipitation of catechin and poly(l-lactide) by the RESOLV process. *Journal of Supercritical Fluids*, 75, 72– 80.
- Souza, K.V., Peralta-Zamora, P., Zawadzki, S.F. (2008). Imobilização de ferro (ii) em matriz de alginato e sua utilização na degradação de corantes têxteis por processos fenton. *Quimica Nova*, 31, 1145-1149.
- US 2012/0058195, Microencapsulation of bioactive substances and methods of doing the same.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncola, J., Cronin, M.T.D., Mazura, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Valle, L.G. (2011). Oxidative stress in aging: Theoretical outcomes and clinical evidences in humans. *Biomedicine & Aging Pathology*, 1, 1-7.
- Vita, J.A. (2005). Polyphenols and cardiovascular disease: effects on endothelial and platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 292-297.
- WO 2005/048998, GI track delivery systems.
- WO 2008/083152, Reduction of astringency in polyphenol compositions.
- Woods, R.K., Walters, E.H., Raven, J.M., et al. (2003). Food and nutrient intakes and asthma risk in young adults. *American Journal of Clinical Nutrition*, 78, 414-421.

Zern, T.L., Fernandez, M.L. (2005). Cardioprotective Effects of Dietary Polyphenols. *Journal of Nutrition*, 135, 2291–229.

## **7. Anexos**



|  |    |
|--|----|
| Anexo A. Fichas de registo dos ensaios de otimização.....                        | 63 |
| Anexo B. Fichas de registo – Ensaios com extrato de <i>Rosa micrantha</i> .....  | 80 |
| Anexo C. Abstract 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho .. | 84 |
| Anexo D. Poster 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho..... | 85 |
| Anexo E. Resumo I Encontro Jovens Investigadores 2013.....                       | 86 |

## Anexo A. Fichas de registo dos ensaios de otimização

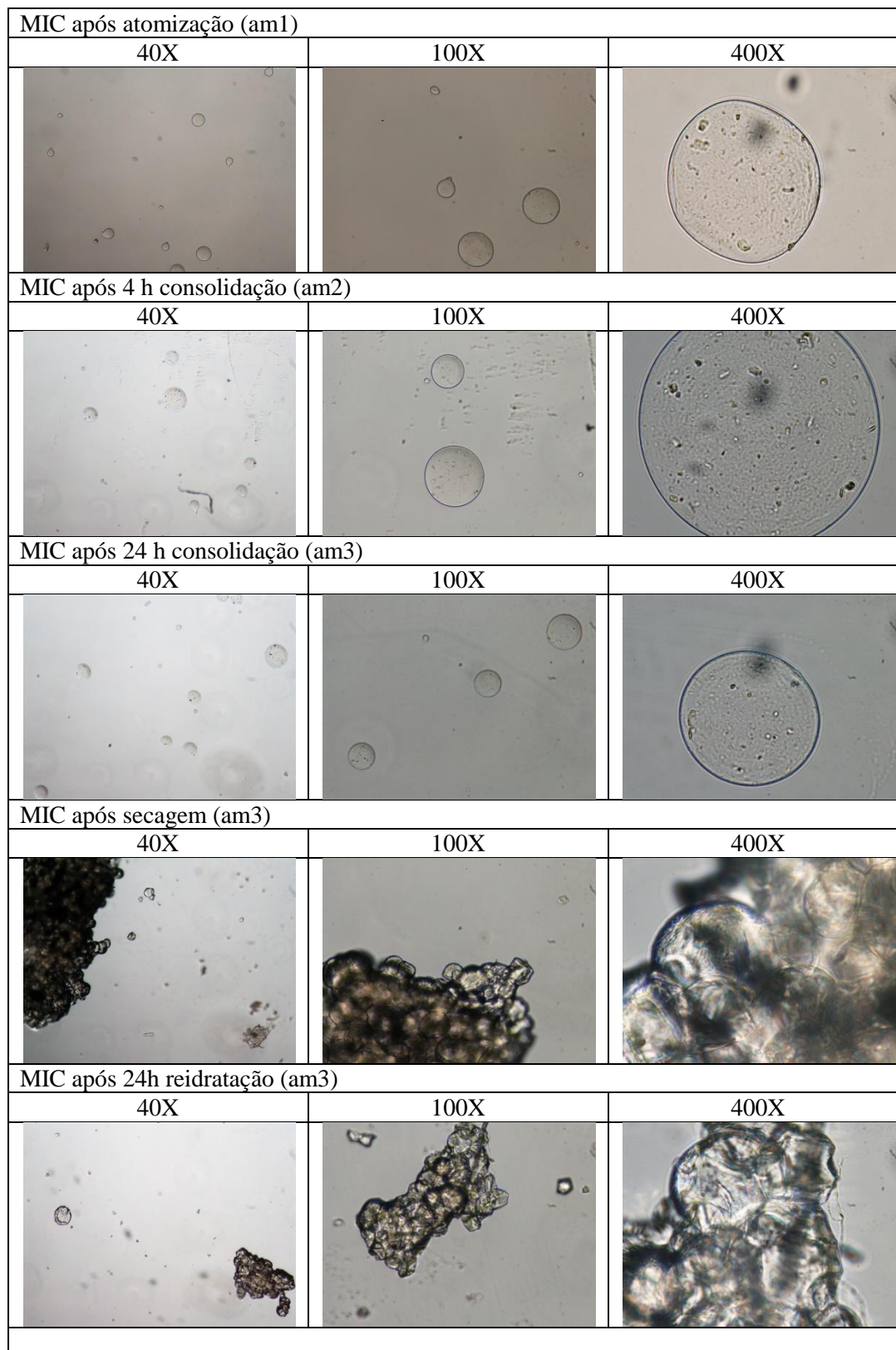
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

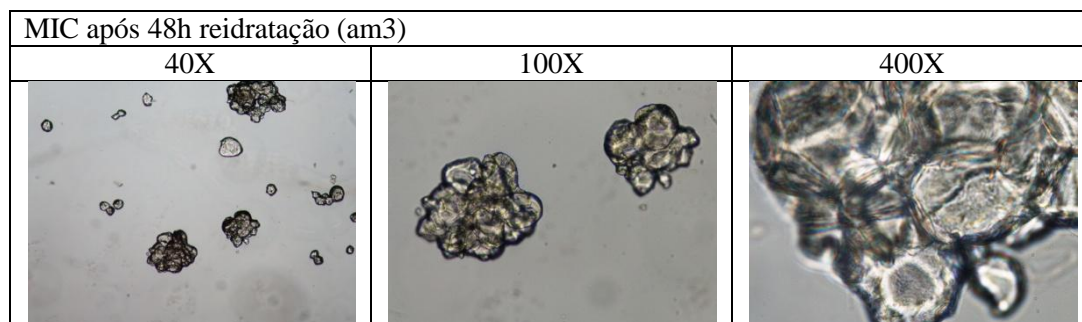
## 1. Síntese das microesferas

|   |   |                                   |                          |
|---|---|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | Alg_001   | <b>Data de realização</b>         | 19_10_2012               |
| <b>Formulação e atomização</b>  |   |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |   | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)  | Não utilizado   | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio        |
| Material de encapsulação  | Alginato  | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4 g+100 mL<br>água)  | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                   |
| Concentração princípio ativo  | n.a.  |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada   | 7 mL  |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação das microesferas</b>  |   |                                   |                          |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 4 h (am2) + noite (am3)  |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação<br>Nº de ciclos efetuados: 1X Lavagem da tina – 50ml H <sub>2</sub> O destilada.<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 3,677 g   |                                   |                          |
| Secagem   | Processo utilizado: Secagem em estufa (am3)<br>Condições utilizadas (se aplicável): Temperatura (100°C)   |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas  | 257 mg  |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação</b>   |   |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração  | n.a.  |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. <sub>i</sub> , mg)  | n.a.  |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. <sub>ne</sub> , mg)   | n.a.  |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a._i - Mp.a._ne) / Mp.a._i) * 100$ )  | n.a.  |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Determinação do resíduo seco - ± 7%   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | MIC secas foram colocadas em 10 mL H <sub>2</sub> O destilada e foram observadas por MO após 24 h (am3) e 48 h (am3).   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.  |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>  |   |                                   |                          |
| As microesferas apresentam forma esférica. Após 24 h de reidratação verificou-se o inchamento das partículas. Nas 24h seguintes não foram registadas alterações visuais relevantes na sua morfologia. |   |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2 e am3





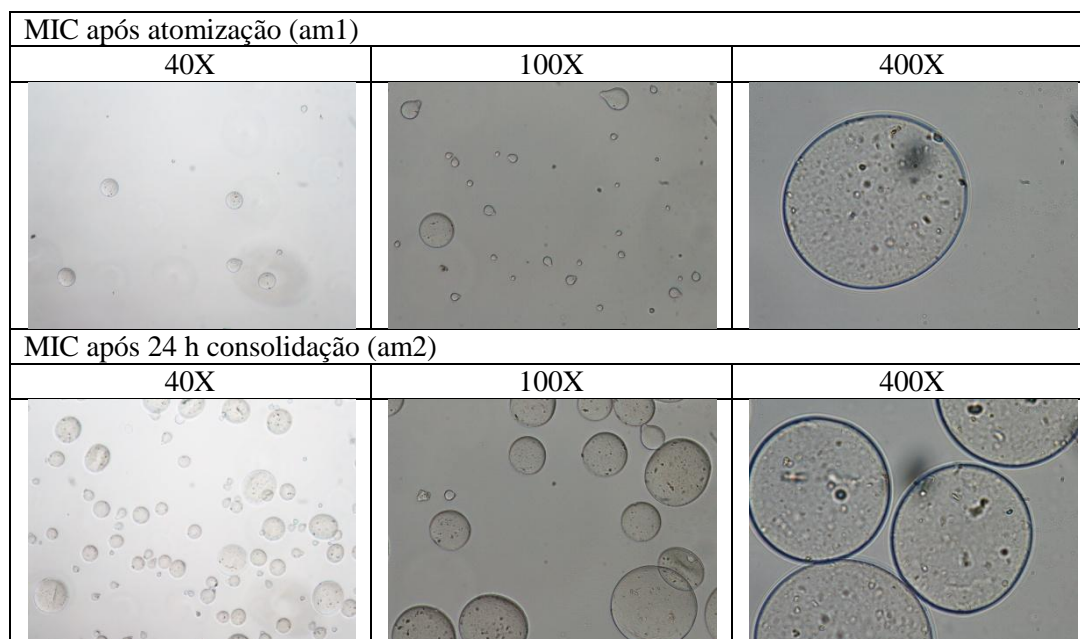
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|   |  |                                   |                          |
|---|--|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | Cat_002  | <b>Data de realização</b>         | 23_10_2012               |
| <b>Formulação e atomização</b>  |  |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)  | Catequina  | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio        |
| Material de encapsulação  | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4 g+100 mL<br>água)   | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                   |
| Concentração princípio ativo  | 1 mg/mL<br>(10 mg+10 mL s.a)   |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada   | 7 mL   |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação das microesferas</b>                        |  |                                   |                          |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 1 noite (am2)   |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação<br>Nº de ciclos efetuados: 1X Lavagem da tina – 50ml H2O destilada.<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 3,107g   |                                   |                          |
| Secagem   | Processo utilizado: Secagem em estufa (am2)<br>Condições utilizadas (se aplicável): Temperatura (100°C)  |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas  | 217mg (7% sólidos)   |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação</b>                                 |  |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração                      | n.a.   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a.i, mg)                     | n.a.   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a.ne, mg)                            | n.a.   |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a.i - Mp.a.ne) / Mp.a.i) * 100$ )         | n.a.   |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Determinação do resíduo seco - ± 7%  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>  |  |                                   |                          |
| As microesferas apresentam forma esférica. O rendimento do processo rondou as 3g. |  |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1 e am2





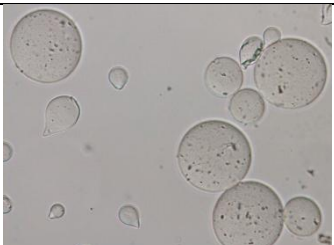
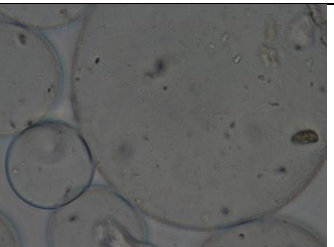
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|   |  |                                   |                          |
|---|--|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | Alg_003  | <b>Data de realização</b>         | 13_02_2013               |
| <b>Formulação e atomização</b>  |  |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)  | Não utilizado  | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio        |
| Material de encapsulação  | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4 g+100 mL<br>água)   | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                   |
| Concentração princípio ativo  | n.a.   |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada   | 7 mL   |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>   |  |                                   |                          |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 1 noite (am2)   |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação<br>Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 100 mL)<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 2.666 g  |                                   |                          |
| Secagem   | Processo utilizado: Liofilização (am2)<br>Condições utilizadas (se aplicável): n.a.<br>Tempo utilizado: 2 dias                               |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas  | 193.9 mg (7 % sólidos)   |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC</b>  |  |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração  | n.a.   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. <sub>i</sub> , mg)  | n.a.   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. <sub>ne</sub> , mg)   | n.a.   |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a._i - Mp.a._ne) / Mp.a._i) * 100$ )  | n.a.   |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Hidratação das microesferas (am2)  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>  |  |                                   |                          |
| Obtenção de microesferas com a forma desejada. As microesferas liofilizadas foram sujeitas a um processo de reidratação. Ao fim de alguns segundos parecem recuperar parte da aparência original. |  |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1 e am2

| MIC após atomização (am1)   |  |   |
|-----------------------------|--|---|
| 40X                         | 100X   | 400X  |
| Não existe registo          |   |   |
| MIC após consolidação (am2) |  |   |
| 40X                         | 100X   | 400X  |
| Não existe registo          |  |  |

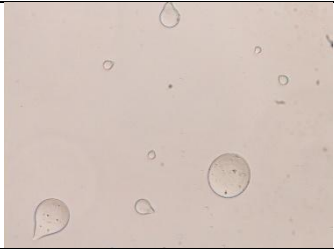

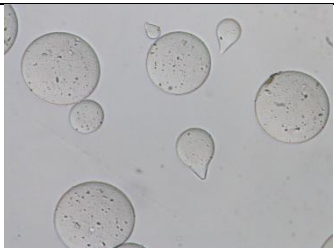
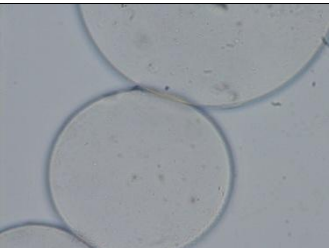
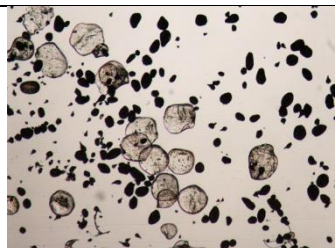
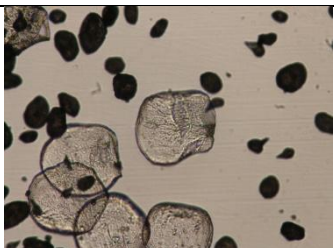
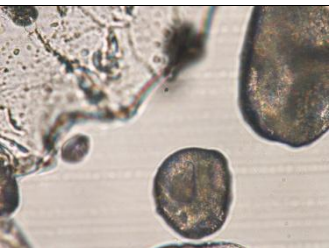

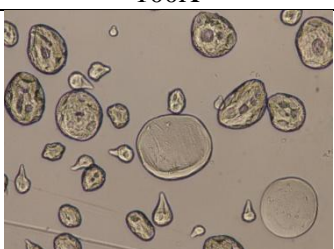

## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|   |  |                                   |                          |
|---|--|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | Cat_004  | <b>Data de realização</b>         | 13_02_2013               |
| <b>Formulação e atomização</b>  |  |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)  | Catequina  | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio        |
| Material de encapsulação  | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4g+100 mL água)   | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                   |
| Concentração princípio ativo  | 1 mg/mL<br>(10 mg+10 mL s.a)   |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada   | 7 mL   |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>   |  |                                   |                          |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 1 noite (am2)   |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação (am3)<br>Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 100 mL – am4)<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 2.9046 g   |                                   |                          |
| Secagem   | Processo utilizado: Liofilização (am2)<br>Condições utilizadas (se aplicável): n.a.<br>Tempo utilizado: 2 dias   |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas  | 195.6 mg (6.7 % sólidos)   |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3+am4)</b>  |  |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração  | 5.43 µg/ml   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. <sub>i</sub> , mg)  | 7 mg   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. <sub>ne</sub> , mg)   | 2.715 mg   |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a._i - Mp.a._ne) / Mp.a._i) * 100$ )  | 61,21%   |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Catequina na primeira solução de lavagem (am4) – 0.0000 mg   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Hidratação das microesferas – Após alguns segundos em contacto com água destilada (am2)  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>  |  |                                   |                          |
| A eficiência de encapsulação determinada no final do processo (com base na amostragem am3 e 4) foi de cerca de 61%. Possíveis justificações a avaliar: (1) Perda do p.a. durante a liofilização, (2) o processo baseado no <i>buffer</i> não está a funcionar corretamente. |  |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2 e am5

| MIC após atomização (am1)   |   |  |
|---|---|--|
| 40X   | 100X  | 400X   |
| Não existe registo  |    |    |
| MIC após consolidação (am2)   |   |  |
| 40X   | 100X  | 400X   |
| Não existe registo  |    |    |
| MIC após liofilização (am2 - liofilizada)   |   |  |
| 40X   | 100X  | 400X   |
|  |  |  |
| MIC após liofilização (am2 – na presença de água)                                   |   |  |
| 40X   | 100X  | 400X   |
|  |  |  |


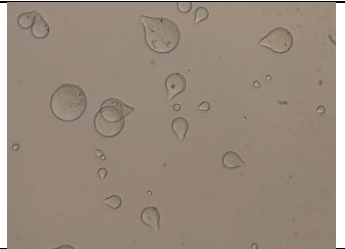


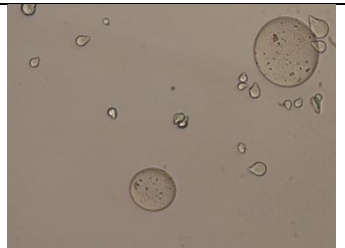
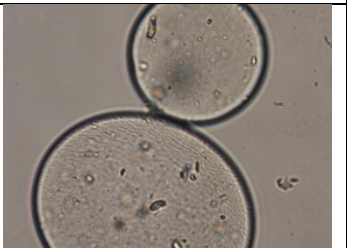
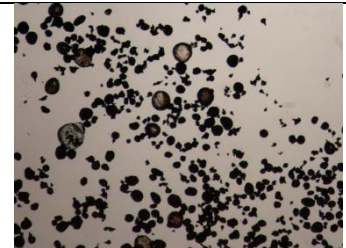
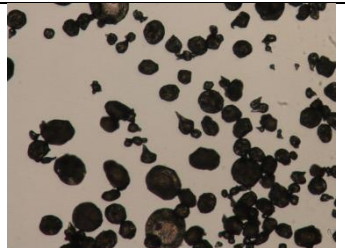
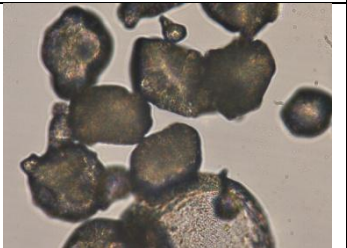
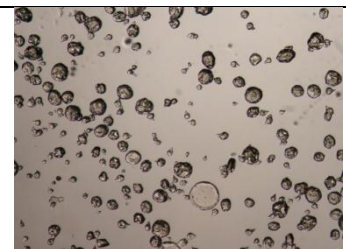
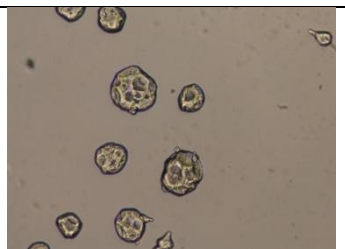



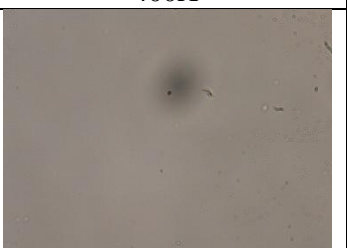
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|  |  |                                   |                          |
|--|--|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código</b>  | Cat_005  | <b>Data de realização</b>         | 1_03_2013                |
| <b>Ensaio</b>  |  |                                   |                          |
| <b>Formulação e atomização</b>   |  |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>   |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)   | Catequina  | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio        |
| Material de encapsulação   | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação  | 4%<br>(s.a = 4 g+100 mL<br>água)   | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                   |
| Concentração princípio ativo   | 2.5 mg/mL<br>(50 mg+20 mL s.a)   |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada  | 10 mL  |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>  |  |                                   |                          |
| Tempo de coagulação  | Atomização (am1) + 4 h (am2) + noite (am3)   |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem  | Filtração da solução de coagulação (am4)<br>Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 100 mL – am5)<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas  | 5.6388 g   |                                   |                          |
| Secagem  | Processo utilizado: Liofilização (am 3)<br>Condições utilizadas (se aplicável): n.a.<br>Tempo utilizado: 2 dias  |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas   | 369.2 mg (7 % sólidos)   |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am4+am5)</b>   |  |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração   | 14,05 µg/mL  |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a.i, mg)  | 25mg   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a.ne, mg)   | 7.025 mg   |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a.i - Mp.a.ne) / Mp.a.i) * 100$ )  | 71.9%  |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>  |  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida   | Processo de reidratação – 50 mg MIC colocadas em H <sub>2</sub> O destilada durante 24h (am3)  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida   | Adição de tampão fosfato pH 7.4 (am 3)   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida   | Catequina na primeira solução de lavagem (am5) – 0.0000 mg   |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>   |  |                                   |                          |
| As microesferas finais apresentaram forma esférica. A eficiência de encapsulação determinada com base na amostragem am4,5 foi de 72%. Numa tentativa de determinação direta da quantidade de catequina no interior das microcápsulas foi adicionado tampão fosfato. O teste parece não ser válido, |  |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2 e am3

| MIC após atomização (am1)   |   |   |
|---|---|---|
| 40X   | 100X  | 400X  |
|    |    |    |
| MIC após consolidação (am2)   |   |   |
| 40X   | 100X  | 400X  |
|    |    |    |
| MIC após liofilização (am3 - liofilizada)   |   |   |
| 40X   | 100X  | 400X  |
|  |  |  |
| MIC após liofilização (am3 – na presença de água)                                   |   |   |
| 40X   | 100X  | 400X  |
|  |  |  |
| MIC após liofilização (am3– Adição de tampão fosfato pH 7.4)                        |   |   |
| 40X   | 100X  | 400X  |
|  |  |  |

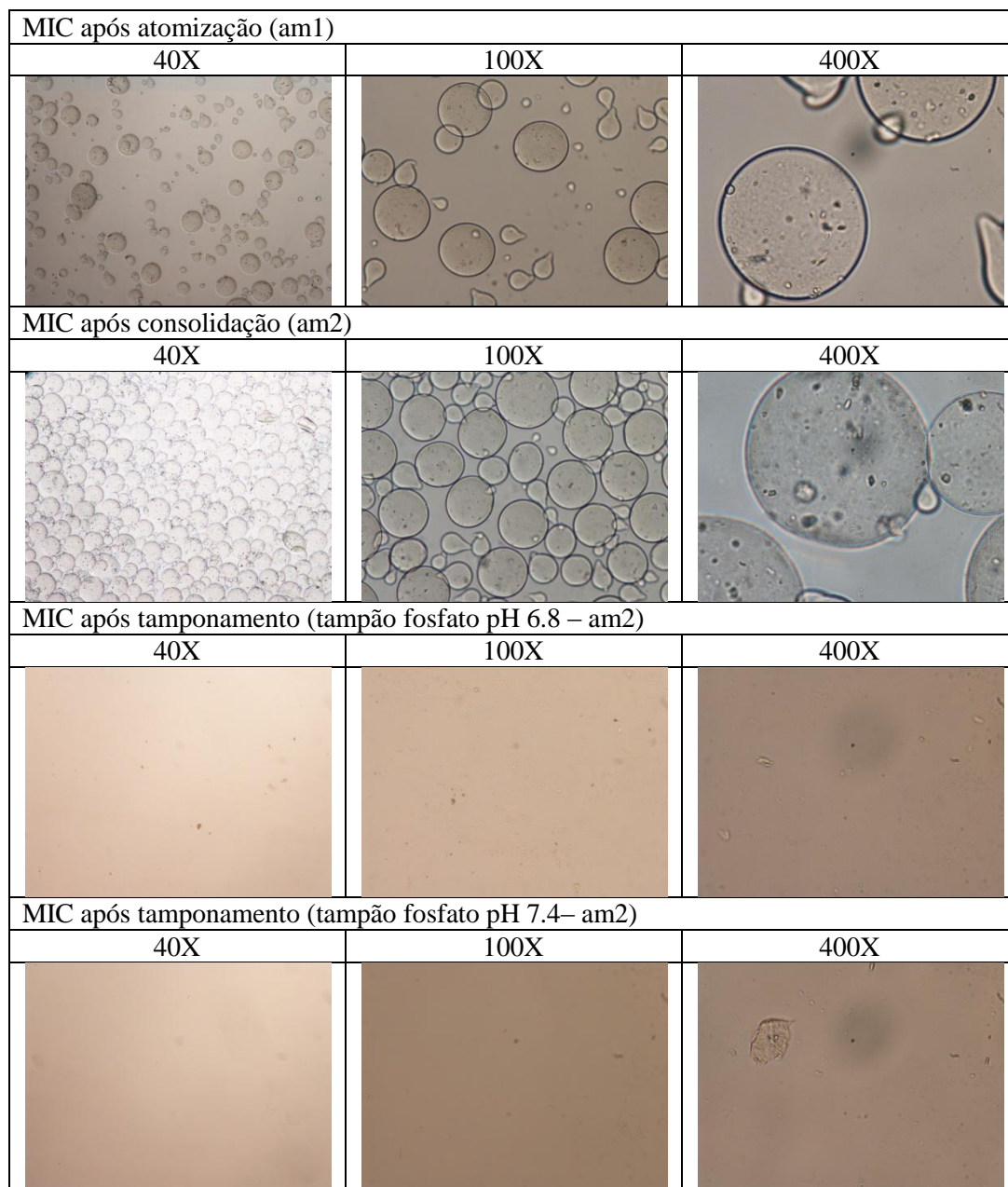
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|   |  |                                   |                          |
|---|--|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | Cat_006  | <b>Data de realização</b>         | 14_03_2013               |
| <b>Formulação e atomização</b>  |  |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)  | Catequina  | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio        |
| Material de encapsulação  | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4g+100 mL água)   | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                   |
| Concentração princípio ativo  | 2.5 mg/mL<br>(25 mg+10mL s.a)  |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada   | 7 mL   |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>   |  |                                   |                          |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 4 h (am2)   |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação (am3)<br>Nº de ciclos efetuados: 2X [lavagem da tina, 100 mL-am4+50 mL-am5]<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 3.065 g  |                                   |                          |
| Secagem   | n.a  |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas  | n.a  |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3+am4+am5)</b>  |  |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração  | 9.7 µg/mL  |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. <sub>i</sub> , mg)  | 17.5   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. <sub>ne</sub> , mg)   | 4.875 mg+0.415 mg (am4)  |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a._i - Mp.a._ne) / Mp.a._i) * 100$ )  | 69.77%   |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Adição sol. Tampão fosfato (pH 6.8 -am 2)  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Adição sol. Tampão fosfato (pH 7.4 -am 2)  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Catequina na primeira e segunda solução de lavagem – 0.415 mg (am4) e 0.000 mg respetivamente  |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>  |  |                                   |                          |
| A eficiência de encapsulação determinada (com base na amostragem am3, 4 e 5) foi de 69,8%. As microesferas apresentaram morfologia desejada. A solução de segunda lavagem (am5) não continha catequina, por isso é desconsiderada para quantificação do princípio ativo. Foi preparada uma solução de microesferas húmidas e tampão fosfato (a diferentes pH's) para determinar quantidade de Princípio ativo existente no interior destas. Após análise da solução através de HPLC não foi detetada catequina. |  |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1 e am2



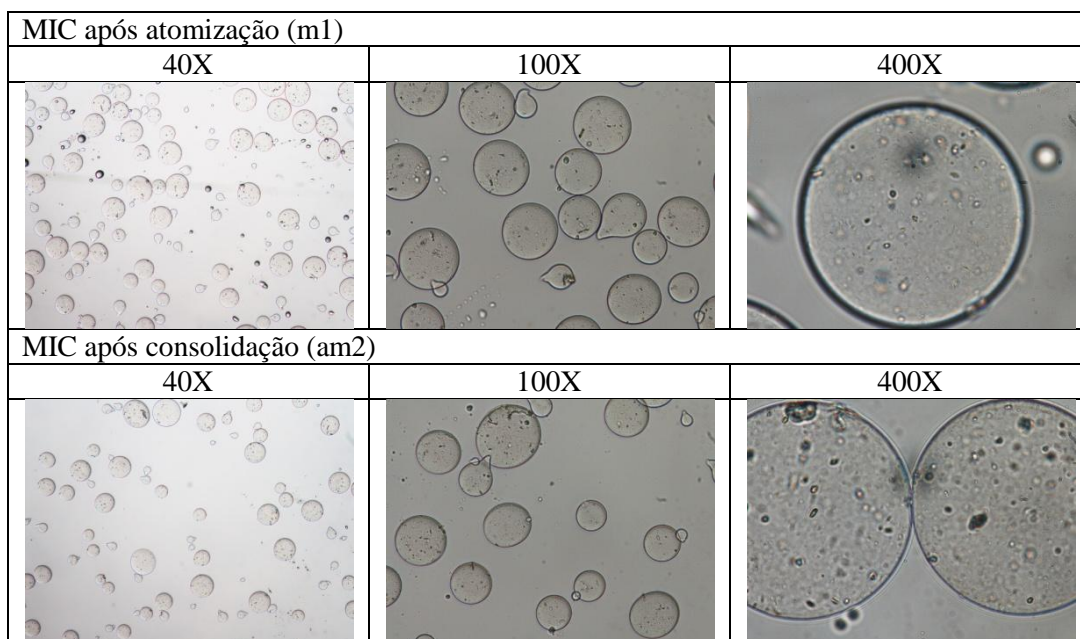
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|   |   |                                   |                          |
|---|---|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | Cat_007   | <b>Data de realização</b>         | 06_06_2013               |
| <b>Formulação e atomização</b>  |   |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |   | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)  | Catequina   | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio        |
| Material de encapsulação  | Alginato  | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4 g+100 mL<br>água)  | Volume da solução de coagulação   | 250 mL                   |
| Concentração princípio ativo  | 5 mg/mL<br>(50 mg+10mL s.a)   |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada   | 7 mL  |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>   |   |                                   |                          |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 4 h (am2)  |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação (am3)<br>Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 50 mL – am4)<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 2.182 g   |                                   |                          |
| Secagem   | Processo utilizado: Liofilização<br>Condições utilizadas (se aplicável): n.a.<br>Tempo utilizado: 2 dias  |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas  | 140 mg (7 % sólidos)  |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3+am4)</b>  |   |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração  | 114,52 µg/ml  |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a.i, mg)   | 35 mg   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a.ne, mg)  | 31,988 mg   |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a.i - Mp.a.ne) / Mp.a.i) * 100$ )   | 8,61%   |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | Catequina na primeira solução de lavagem (am4) – 3,358 mg   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.  |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>  |   |                                   |                          |
| A eficiência de encapsulação determinada no final do processo (com base na amostragem am3 e 4) foi de 8,61%. Apesar da baixa eficiência registada o registo fotográfico não revelou presença visível de catequina no exterior das microesferas. |   |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2



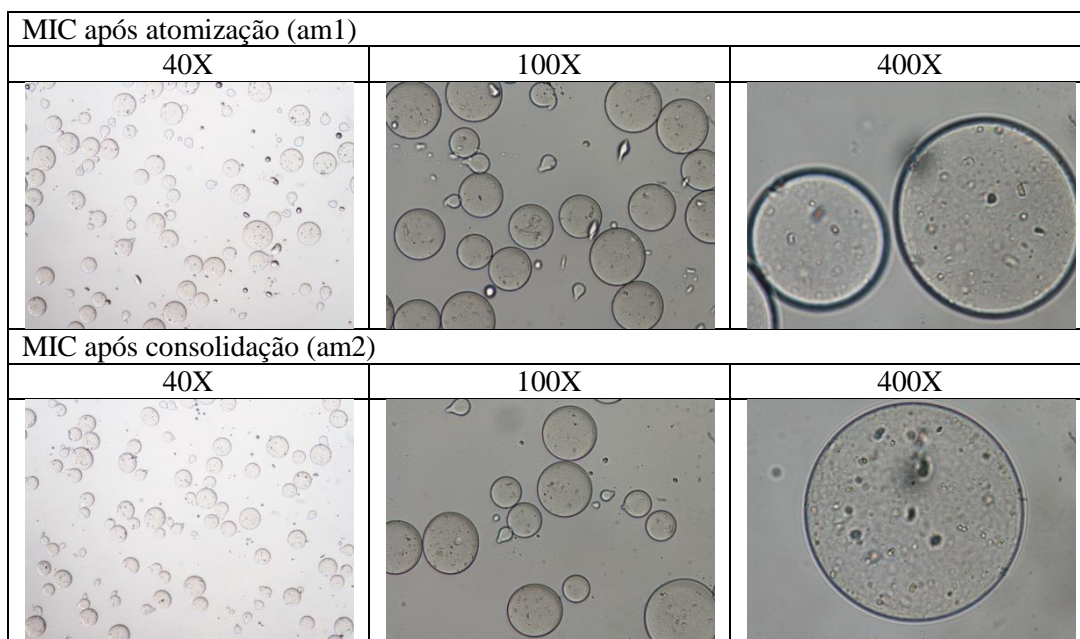
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|   |  |                                   |                         |
|---|--|-----------------------------------|-------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | Cat_008  | <b>Data de realização</b>         | 25_06_2013              |
| <b>Formulação e atomização</b>  |  |                                   |                         |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                         |
| Princípio ativo (p.a.)  | Catequina  | Agente de coagulação              | Cloreto de cálcio       |
| Material de encapsulação  | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4g+100 mL água)   | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                  |
| Concentração princípio ativo  | 5 mg/mL<br>(100 mg+20 mL s.a)  |                                   |                         |
| Volume de solução atomizada   | 18 mL  |                                   |                         |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>   |  |                                   |                         |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 4 h (am2)   |                                   |                         |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação (am3)<br>Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 100 mL – am4)<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                         |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 5,969 g  |                                   |                         |
| Secagem   | Processo utilizado: Liofilização<br>Condições utilizadas (se aplicável): n.a.<br>Tempo utilizado: 2 dias   |                                   |                         |
| Massa final das microesferas secas  | 399 mg ( 7% sólidos)   |                                   |                         |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3+am4)</b>  |  |                                   |                         |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração  | 83.98 µg/mL  |                                   |                         |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. <sub>i</sub> , mg)  | 90 mg  |                                   |                         |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. <sub>ne</sub> , mg)   | 41.99  |                                   |                         |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a._i - Mp.a._ne) / Mp.a._i) * 100$ )  | 53.3%  |                                   |                         |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |  |                                   |                         |
| Tipo de controlo/variável medida  | Catequina na primeira solução de lavagem (am4) – 0.0000 mg   |                                   |                         |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                         |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                         |
| <b>Comentários</b>  |  |                                   |                         |
| A eficiência de encapsulação determinada no final do processo (com base na amostragem am3,4) foi de aproximadamente 53.3%. As microesferas obtidas após consolidação apresentavam forma esférica e individualizada. |  |                                   |                         |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2



Anexo B. Fichas de registo – Ensaio com extrato de *Rosa micrantha*

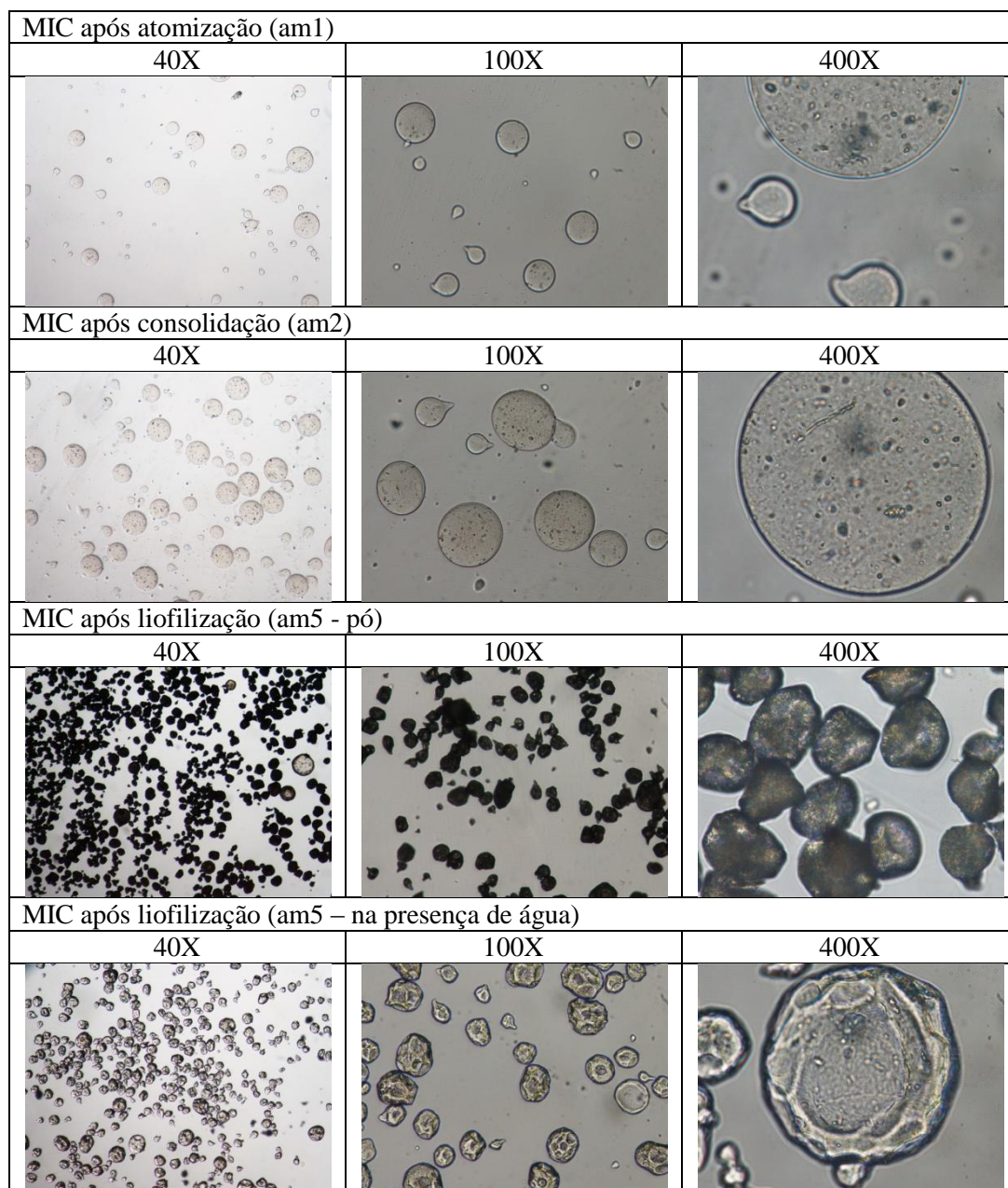
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

## 1. Síntese das microesferas

|  |  |                                   |                          |
|--|--|-----------------------------------|--------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>   | RM_001   | <b>Data de realização</b>         | 11_06_2013               |
| <b>Formulação e atomização</b>   |  |                                   |                          |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>   |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                          |
| Princípio ativo (p.a.)   | Extrato <i>Rosa micrantha</i>  | Agente de coagulação              | Cloreto de calico        |
| Material de encapsulação   | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18 g+1L) |
| Concentração material de encapsulação  | 4%<br>(s.a = 4g+100 mL água)   | Volume da solução de coagulação   | 250 mL                   |
| Concentração princípio ativo   | 5 mg/mL<br>(50 mg+10mL s.a)  |                                   |                          |
| Volume de solução atomizada  | 6 mL   |                                   |                          |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>  |  |                                   |                          |
| Tempo de coagulação  | Atomização (am1) + 4 h (am2)   |                                   |                          |
| Procedimento de separação/lavagem  | Filtração da solução de coagulação (am3)<br>Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 50mL – am4)<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                          |
| Massa final das microesferas hidratadas  | 2,361 g  |                                   |                          |
| Secagem  | Processo utilizado: Liofilização (am5)<br>Condições utilizadas (se aplicável): n.a.<br>Tempo utilizado: 2 dias   |                                   |                          |
| Massa final das microesferas secas   | 158 mg ( 7% sólidos)   |                                   |                          |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3)</b>   |  |                                   |                          |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração   | Residual   |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a.i, mg)  | 30 mg  |                                   |                          |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a.ne, mg)   | Residual   |                                   |                          |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a.i - Mp.a.ne) / Mp.a.i) * 100$ )  | 100%   |                                   |                          |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>  |  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida   | Extrato na primeira solução de lavagem (am4) – 0.0000 mg   |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida   | Processo de reidratação – 50 mg MIC colocadas em H <sub>2</sub> O destilada durante 24h (am5)  |                                   |                          |
| Tipo de controlo/variável medida   | n.a.   |                                   |                          |
| <b>Comentários</b>   |  |                                   |                          |
| A eficiência de encapsulação (am3,4) foi próxima de 100%. A análise por MO não revelou vestígios do extrato no exterior das microesferas. O processo de reidratação revelou uma capacidade de hidratação das MIC de 80.4%. |  |                                   |                          |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2 e am5



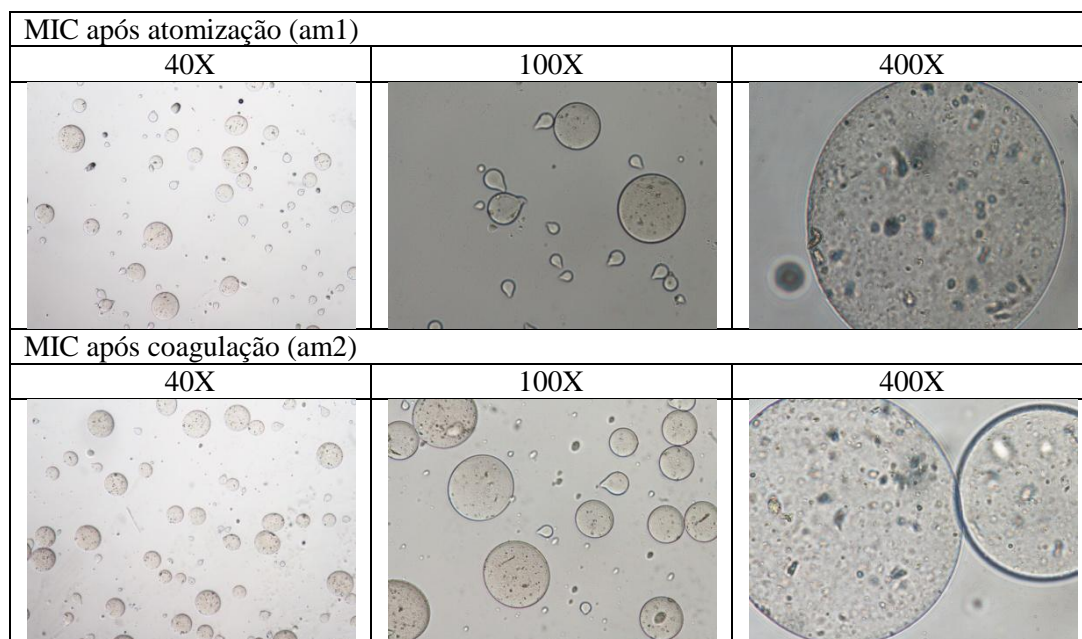
## ENSAIOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

### 1. Síntese das microesferas

|   |  |                                   |                         |
|---|--|-----------------------------------|-------------------------|
| <b>Código Ensaio</b>  | RM_002   | <b>Data de realização</b>         | 27_06_2013              |
| <b>Formulação e atomização</b>  |  |                                   |                         |
| <b>Fase contendo o princípio ativo</b>  |  | <b>Fase de coagulação</b>         |                         |
| Princípio ativo (p.a.)  | Extrato <i>Rosa micrantha</i>  | Agente de coagulação              | Cloreto de calico       |
| Material de encapsulação  | Alginato   | Concentração agente de coagulação | 4%<br>(s.c = 43,18g+1L) |
| Concentração material de encapsulação   | 4%<br>(s.a = 4g+100 mL água)   | Volume da solução de coagulação   | 500 mL                  |
| Concentração princípio ativo  | 5 mg/mL<br>(100 mg+20mL s.a)   |                                   |                         |
| Volume de solução atomizada   | 15 mL  |                                   |                         |
| <b>Processo de consolidação/separação/ secagem das microesferas</b>   |  |                                   |                         |
| Tempo de coagulação   | Atomização (am1) + 4 h (am2)   |                                   |                         |
| Procedimento de separação/lavagem   | Filtração da solução de coagulação (am3)<br>Nº de ciclos efetuados: 1X (lavagem da tina, 100 mL – am4)<br>Tipo de filtração utilizado: com vácuo (bomba) |                                   |                         |
| Massa final das microesferas hidratadas   | 4.879 g  |                                   |                         |
| Secagem   | Processo utilizado: Liofilização<br>Condições utilizadas (se aplicável): n.a.<br>Tempo utilizado: 2 dias   |                                   |                         |
| Massa final das microesferas secas  | 319 mg (7 % sólidos)   |                                   |                         |
| <b>Determinação da eficiência de encapsulação por HPLC (am3)</b>  |  |                                   |                         |
| Concentração do p.a. na solução de coagulação após filtração  | Residual   |                                   |                         |
| Massa de princípio ativo colocado no V atomizado (Mp.a. <sub>i</sub> , mg)  | 75 mg  |                                   |                         |
| Massa de princípio ativo não encapsulado (Mp.a. <sub>ne</sub> , mg)   | Residual   |                                   |                         |
| Eficiência de encapsulação ( $EE = ((Mp.a._i - Mp.a._ne) / Mp.a._i) * 100$ )  | 100%   |                                   |                         |
| <b>Controlos adicionais do processo</b>   |  |                                   |                         |
| Tipo de controlo/variável medida  | Extrato na primeira solução de lavagem (am4) – 0.00000 mg  |                                   |                         |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                         |
| Tipo de controlo/variável medida  | n.a.   |                                   |                         |
| <b>Comentários</b>  |  |                                   |                         |
| A eficiência de encapsulação determinada no final do processo (com base na amostragem am3 e am4) foi próxima de 100%. |  |                                   |                         |

## 2. Controlo do processo por MO

Amostras analisadas: am1, am2



## Anexo C. Abstract 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho

PC81

**Application of spray-coagulation method to microencapsulate catechin having in view cosmetic, pharmaceutical or nutraceutical areas**

Joana Viegas<sup>a,b</sup>, Lillian Barros<sup>a</sup>, Isabel Fernandes<sup>b</sup>, Isabel C.F.R. Ferreira<sup>a</sup>, Filomena Barreiro<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centro de Investigação de Montanha, ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, Ap. 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.

<sup>b</sup>Laboratório de Processos de Separação e Reação (LSRE), Laboratório Associado LSRE/LCM, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Apolónia Ap. 1134, 5301-857 Bragança, Portugal. [barreiro@ipb.pt](mailto:barreiro@ipb.pt)

Catechin is a polyphenolic compound of the flavonoid family and a product of the secondary metabolism of various plants [1]. Antioxidant and chelating properties are attributed to catechin, as well as to other flavonoids, due to their aromatic hydroxyl groups. The presence of these bioactive components in diets rich in vegetables offers a protective effect in human health, including prevention of cardiovascular disorders and certain cancers, and in the ageing process itself. When ingested, catechin undergoes a process of metabolism that changes its structure affecting the antioxidant properties [2]. Microencapsulation can be used to overcome this problem offering protection by means of a cover material and enabling its controlled release over time or selectively to an intended target [3].

In this study catechin was microencapsulated in an alginate matrix by using a spray-coagulation technique. Briefly, a sodium alginate solution (4%, w/v) containing catechin was prepared under stirring at ambient temperature by using a ratio catechin:alginate of 25:400 (w/w). The solution was atomized in a Nisco Var J30 unit and microspheres consolidated upon contact with a solution of CaCl<sub>2</sub> (4%, w/v), recovered by decantation and washed with deionized water. In order to control the process, microspheres formation was followed by optical microscopy (OM), and catechin loss evaluated after consolidation/washing steps.

In conclusion, alginate-based microspheres loaded with catechin were efficiently produced. The obtained microspheres have a medium particle size comprised between 73 and 341 µm and encapsulation efficiency was estimated as 87%. Overall, catechin was microencapsulated with success, and can be incorporated in different formulations in order to apply its antioxidant properties in cosmetic, pharmaceutical or nutraceutical areas. The work will proceed by evaluating the protective effect of the used microencapsulation process on catechin antioxidant properties.

Acknowledgments:

The authors are grateful to FCT for financial support to CIMO (strategic project PEst-OE/AGR/UI0690/2011) and to LSRE (strategic project PEst-C/EQB/LA0020/2011). L. Barros also thanks to FCT, POPH-QREN and FSE for her grant (SFRH/BPD/4609/2008).

References:

- [1] K. Heim, A. Tagliaferro, D. Bobilya, *J. Nutr. Biochem.* **2002**, *13*, 572-584.  
 [2] D. Montserrat *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2010**, *51*, 443-449.  
 [3] S. Bansode *et al.*, *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* **2010**, *1*, 38-43.

## Anexo D. Poster 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho

**Application of spray-coagulation method to microencapsulate catechin having in view cosmetic, pharmaceutical or nutraceutical areas**

Joana Viegas<sup>1,2</sup>, Lillian Barros<sup>2</sup>, Isabel Fernandes<sup>2</sup>, Isabel C.F.R. Ferreira<sup>2</sup>, Filomena Barreiro<sup>2,\*</sup>

<sup>1)</sup> Centro de Investigação de Medicinas, CIMA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Acaçória, Apartado 1170, 5301-835 Bragança, Portugal;  
<sup>2)</sup> Laboratório de Processos de Secção e Reação (LSRC), Laboratório Associado LSRC/CIMA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus Santa Acaçória, Av. 1124, 5301-857 Bragança, Portugal

\*Corresponding author: barreiro@ipb.pt

**Introduction**

- ✓ Catechin is a polyphenolic compound of the flavonoid family and a product of the secondary metabolism of various plants [1].
- ✓ Antioxidant and chelating properties are attributed to catechin, as well as to other flavonoids, due to their aromatic hydroxyl groups. The presence of these bioactive components in diets rich in vegetables offers a protective effect in human health, including prevention of cardiovascular disorders and certain cancers, and in the ageing process itself.
- ✓ When ingested, catechin undergoes a process of metabolism that changes its structure affecting the antioxidant properties [2].
- ✓ Microencapsulation can be used to overcome this problem offering protection by means of a cover material and enabling its controlled release over time or selectively to an intended target [3].



Figure 1. Catechin structure and catechin-rich wild plants.

**Microencapsulation procedure**

- ✓ Catechin was microencapsulated in an alginate matrix by using a spray-coagulation technique. Briefly, a sodium alginate solution (4%, w/v) containing catechin was prepared under stirring at ambient temperature by using a ratio catechin:alginate of 25:400 (w/w).
- ✓ The solution was atomized in a Nisco Var J30 unit and microspheres consolidated upon contact with a solution of CaCl<sub>2</sub> (4%, w/v), recovered by vacuum filtration and washed with deionized water.

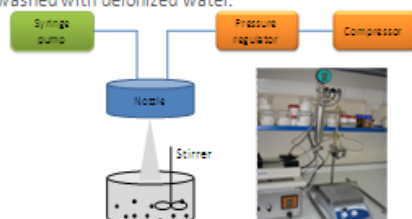


Figure 2. Nisco Var J30 microencapsulation unit.

**Process monitoring**

- ✓ Microspheres formation was followed by optical microscopy (OM) by checking several key points of the process:
  - After atomization;
  - After the consolidation period;
  - After filtration/washing steps.
- ✓ Catechin loss was evaluated after consolidation and after washing steps by using High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

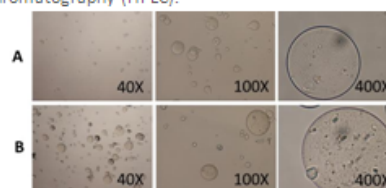


Figure 3. Morphology and size of catechin-loaded alginate microspheres under different magnifications (40, 100 and 400X) after atomization (A) and after consolidation (B).

**Encapsulation efficiency and storage form**

- ✓ Microspheres characterization was performed in what concerns:
  - Size** (estimated based on OM analysis);
  - Microencapsulation efficiency** (based on the determined catechin losses during the process);
  - Solid content of the hydrated form** (a known amount of hydrated microspheres has been dried until a constant weight was achieved).
- ✓ Microspheres storage was considered:
  - In powder form (lyophilization);
  - In solution (water).

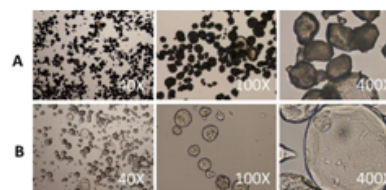


Figure 4. OM analysis of microspheres under different magnifications (40, 100 and 400X) after lyophilization (A) and after being rehydrated (B).

**Conclusion and future work**

- ✓ Alginate-based microspheres loaded with catechin were produced. The obtained microspheres have a medium particle size comprised between 73 and 341 µm. Encapsulation efficiency was estimated as 87% (w/w) and solid content of the hydrated forms was around 7% (w/w);
- ✓ Lyophilized microspheres swell in water (rehydrate) recovering its original shape and size. Microspheres conditioned in water present a high swelling, favoring catechin loss during storage;
- ✓ Bioavailability of microencapsulated catechin will be evaluated, as well as catechin complex formation.
- ✓ Alternative methods, such as internal gelation, instead of the used external gelation, will be tested;
- ✓ Applications on cosmetic, pharmaceutical and nutraceutical areas will be envisaged.



**Acknowledgements**  
To FCT (LSRC strategic project PEst-C/QUI/UI40020/2011 and CIMO strategic project PEst-C61/AGR/UI4009/2011).  
L. Barros thanks to FCT (PDR-2006) and PSE former grant (SFRH/BPD/4009/2006).



**References**  
[1] K. Heim, A. Tagliarini, C. Babilio, J. Nutr. Biochem. 2002, 12, 570-584.  
[2] C. Wortschagger et al., J. Pharm. Biomed. Anal. 2010, 50, 51-59.  
[3] S. Barroso et al., Int. J. Pharm. Sci. Res. 2010, 1, 28-32.

## Anexo E. Resumo I Encontro Jovens Investigadores 2013

### MICROENCAPSULAÇÃO DE UM EXTRATO DE *ROSA MICRANTHA* PARA UTILIZAÇÃO NA ÁREA ALIMENTAR

Joana Viegas<sup>1,2</sup>, Lillian Barros<sup>1</sup>, Isabel Fernandes<sup>2</sup>, Isabel C.F.R. Ferreira<sup>1</sup>, Filomena Barreiro<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal.

<sup>2</sup>Laboratório de Processos de Separação e Reação (LSRE), Laboratório associado LSRE/LCM, Instituto Politécnico de Bragança, Portugal. barreiro@ipb.pt

#### RESUMO

Os extratos de plantas são fontes abundantes de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes reconhecidas. Dados os benefícios que aportam para a saúde humana, estes assumem grande relevância na indústria alimentar, nomeadamente no desenvolvimento de alimentos funcionais. No entanto, estes compostos de reconhecida instabilidade, podem sofrer alterações durante o processamento dos alimentos onde são incorporados e processos metabólicos. Neste contexto, a microencapsulação possibilita a proteção destes antioxidantes naturais, permitindo ainda a sua libertação controlada<sup>1</sup>. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidantes do extrato hidroalcoólico de *Rosa micrantha* Borrer ex Sm e do seu flavonoide maioritário, a catequina, na sua forma livre e microencapsulada quando incorporados num iogurte natural. Para o efeito foram preparadas microesferas de alginato utilizando uma técnica de microencapsulação por *spray* seguida de coagulação. O processo foi otimizado numa primeira fase utilizando a catequina como composto modelo, sendo posteriormente aplicada ao extrato de *R. micrantha*. Quando comparada com o seu homólogo microencapsulado, a incorporação direta do extrato de *R. micrantha* conduziu a produtos com atividade antioxidante inicial superior (avaliação para t=0). No entanto, os iogurtes aditivados com o microencapsulado apresentaram uma capacidade de manutenção da atividade antioxidante superior (avaliação para t=3 dias). No que respeita à catequina, esta apresentou uma grande instabilidade, sendo que a sua microencapsulação pelo processo utilizado não conduziu a melhorias significativas da preservação da sua atividade antioxidante com o tempo e quando incorporada no iogurte.

**Palavras-chave:** *Rosa micrantha*; catequina; atividade antioxidante; microencapsulação; indústria alimentar.

**AGRADECIMENTOS:** Os autores agradecem à FCT pelo apoio financeiro ao CIMO (projeto estratégico PEstOE/AGR/UI0690/2011), LSRE (projeto estratégico PEst-C/EQB/LA0020/2011) e Lillian Barros (contrato Compromisso para a Ciência 2008); agradecem também à Professora Doutora Ana Maria Carvalho (CIMO-ESA/IPB) pela colheita e identificação de *R. micrantha*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fang, Z.; Bhandari, B., 2010. Encapsulation of polyphenols - a review. Trends in Food Science & Technology, Volume/n.º 21, Páginas 510-523