



---

**ValorNatural** – Valorização de Recursos Naturais através da Extração de Ingredientes de Elevado Valor Acrescentado para Aplicações na Indústria Alimentar.

---

## **Entregável nº 5.3.1.**

**Versão do Documento:** 1

**Data de Submissão:** 31/10/2020

**Responsável:** IPB

**Nome do Documento:** Relatório de procedimentos de funcionalização de produtos lácteos com ingredientes bioativos, na forma livre ou estabilizada

### **Histórico de Revisão**

<b>Revisão</b>	<b>Data</b>	<b>Parceiros Envolvidos</b>	<b>Descrição</b>

**Lista de Autores**

Sandrina Heleno

## Sumário

Este entregável resume as condições de funcionalização de queijo maturado e requeijão com agentes hipocolesterolémicos. Mais precisamente, relata as condições ideais de incorporação de extratos de *Agaricus bisporus* ricos em micosteróis e, ainda, a incorporação de ergosterol puro, ambos na forma livre.

## Índice

<b>1. Identificação .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Informação.....</b>	<b>6</b>

## 1. Identificação

<b><i>Deliverable</i></b>	5.3.1. Relatório de procedimentos de funcionalização de produtos lácteos com ingredientes bioativos, na forma livre ou estabilizada
<b><i>Tipo de deliverable</i></b>	Relatório
<b><i>Nível de disseminação</i></b>	Confidencial
<b><i>PPS</i></b>	5. Bioativos naturais

## 2. Informação

Após os ensaios preliminares, onde foram estabelecidas as condições ideais de extração de forma a obter extratos ricos em micosteróis a partir de *A. bisporus*, estes foram analisados quanto à sua estabilidade a fatores físicos como temperatura e exposição à luz, entre outros, e ainda quanto às suas propriedades de solubilidade. De seguida, foram avaliados quanto à sua capacidade hipocolesterolémica em linhas celulares CaCo2 de forma a verificar a quantidade de colesterol absorvida pelas células na presença e ausência de extratos ricos em micosteróis. Foi ainda avaliada a estabilidade e a atividade hipocolesterolémica de ergosterol puro (comercial) de forma a poder comparar os resultados obtidos e analisar a possibilidade de utilizar o extrato em vez de um micosterol isolado, numa tentativa de minimizar custos para a indústria.

As quantidades incorporadas foram baseadas em dados referentes às incorporações de fitoesteróis (moléculas similares provenientes de plantas e com atividade hipocolesterolémica reconhecida) em outras matrizes lipídicas alimentares, em que se adicionaram 2 g de fitoesteróis por 25 g de margarina. Estes trabalhos de incorporação dos ingredientes foram realizados na Queijaria Vaz, parceira deste projeto.

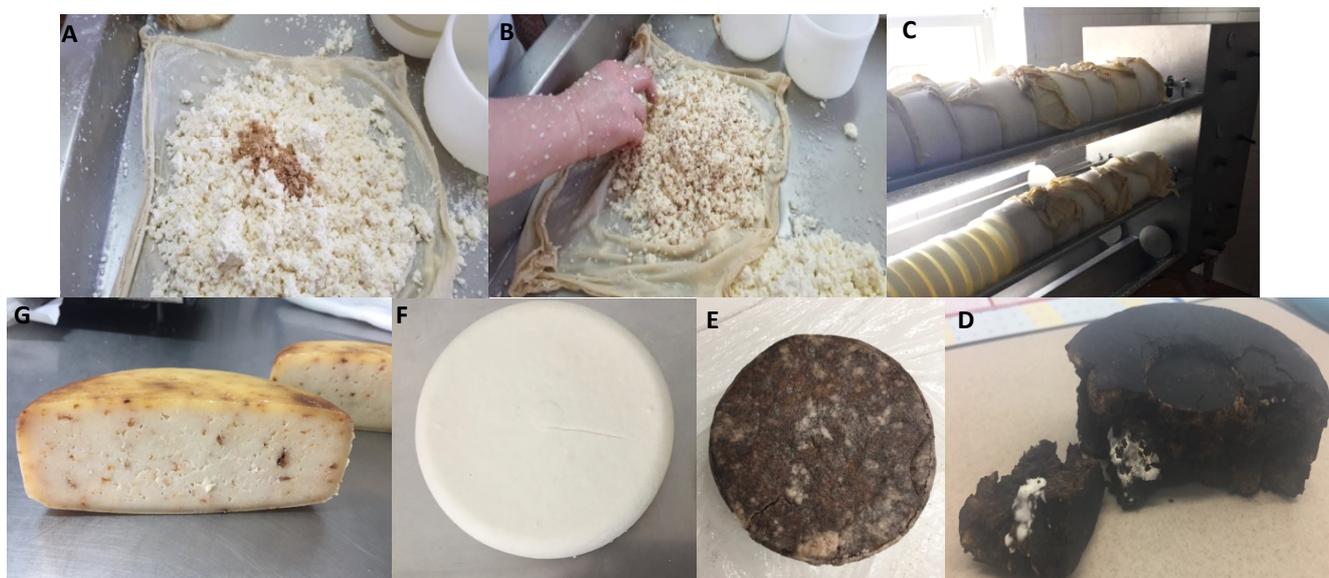
### Queijo maturado:

Queijos de ovelha com peso de 500 g após a maturação foram incorporados com três formulações diferentes para analisar qual delas seria mais viável economicamente para a empresa, traduzindo-se na maior estabilidade do ergosterol e menor tempo de processamento. A primeira formulação consistiu na incorporação de 40 g de extrato de *A. bisporus* em 500 g de queijo, mas essa quantidade de extrato não foi viável, pois esse conteúdo afetou as propriedades reológicas do queijo, fazendo com que perdesse integridade e se fragmentasse em pequenos pedaços, exigindo uma redução para 20 g de extrato por queijo. A segunda formulação consistiu na incorporação de 1,5 g de ergosterol puro nos queijos, o que representa a mesma quantidade de ergosterol presente em 40 g de extrato.

Por fim, na tentativa de reduzir os custos e o tempo de extração, foi tentada uma terceira formulação, que consistiu na incorporação de pó de cogumelo liofilizado no queijo. A quantidade de pó de cogumelo foi estabelecida com base no teor máximo de extrato que seria possível incorporar de forma a garantir a presença de ergosterol numa concentração ativa, sendo por isso fixada em 35 g de pó de cogumelo por 500 g de queijo. Para esta última formulação, o pó de cogumelo foi descontaminado por irradiação germicida ultravioleta imediatamente antes da sua utilização.

As diferentes formulações foram incorporadas durante o procedimento de prensagem manual da preparação do queijo (Figura 12). Esta etapa foi escolhida devido às etapas anteriores possuírem altos teores de soro de leite, o que poderia causar perdas significativas do extrato/ergosterol em procedimentos posteriores de remoção de soro.

O extrato de *A. bisporus*, o ergosterol puro e o pó de cogumelo foram adicionados diretamente ao coalho e bem homogeneizados manualmente. Em seguida, o queijo foi colocado em recipiente cilíndrico, submetido a um tratamento automatizado sob pressão. Por fim, antes de colocar as amostras nas salas de maturação, foi adicionado sal às faces superior e inferior do queijo, para ajudar a melhorar a maturação e reduzir a contaminação microbiana. Todos os ensaios foram também efetuados e comparados com um queijo controlo (queijo sem qualquer incorporação).



**Figura 1.** Processo de incorporação: A- Adição de extrato de *A. bisporus*/ergosterol puro/pó de cogumelo; B- Homogeneização; C- Prensagem automática; D, E- Queijo maturado com cogumelo em pó; F- Queijo maturado com ergosterol puro; G- Queijo maturado com extrato de cogumelo.

O tempo de prateleira estabelecido para o queijo de ovelha maturado é de 2 anos, sendo os estudos referentes aos queijos incorporados planeados para que o tempo de prateleira pudesse ser avaliado durante os 2 anos. Os queijos foram analisados antes da maturação (tempo 0), imediatamente após a maturação (tempo 1, de forma a avaliar o comportamento da maturação na presença dos agentes hipocolesterolémicos) e trimestralmente após a maturação (tempos 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 e 24). Ao longo deste tempo, foram avaliados os seguintes parâmetros: caracterização química e nutricional, monitorização do ergosterol, atividade hipocolesterolémica, carga microbiana, e parâmetros físicos.

De acordo com os resultados obtidos, quase de imediato após o processo de incorporação excluiu-se o queijo incorporado com o pó de cogumelo, pois esta incorporação afetou significativamente as propriedades reológicas do queijo. Verificou-se que os queijos incorporados com o extrato de *A. bisporus* e ergosterol puro mantiveram as suas propriedades durante 9 meses, pois no mês 12 apresentavam-se desintegrados devido à degradação dos agentes hipocolesterolémicos. Assim, o tempo de vida do queijo maturado de ovelha com extrato de *A. bisporus* foi considerado de 9 meses. A incorporação de ergosterol puro e extrato de *A. bisporus* no queijo foi bem-sucedida, não provocando alterações significativas nos perfis nutricionais nem em termos de análise física. Além disso, o processo de maturação microbiológica normal também não foi alterado.

### Requeijão:

Similarmente ao procedimento utilizado para o queijo maturado, foi também efetuada a incorporação do extrato de *A. bisporus* e de ergosterol puro no requeijão, de forma a avaliar a estabilidade e a bioatividade destes agentes numa matriz láctea mais hidrofílica do que o queijo maturado, uma vez que o ergosterol apresenta menor solubilidade neste

tipo de matriz.. Uma vez que o tempo de prateleira normal do requeijão é de 6 dias, os requeijões desenvolvidos foram analisados durante um período de 9 dias: imediatamente após a preparação (tempo 0) e após 3, 6 e 9 dias (tempos 3, 6 e 9), sendo este último tempo necessário para garantir o tempo de vida de 6 dias em termos microbiológicos).

Assim, foram preparados três requeijões diferentes: i) 40 mg de extrato de *A. bisporus* por g de requeijão, pois à semelhança do que aconteceu para o queijo maturado, a quantidade semelhante à das incorporações de fitoesteróis causou alterações reológicas significativas no requeijão, diminuindo-se as doses para metade; ii) 3 mg de ergosterol puro por g de requeijão, correspondendo ao teor de ergosterol de 80 mg de extrato de *A. bisporus*, a quantidade inicial de incorporação planeada; e iii) requeijão controlo sem incorporações. As diferentes formulações foram incorporadas manualmente da seguinte forma: após a normal preparação dos requeijões e após a sua colocação nas formas furadas para perderem o excesso de soro, os requeijões foram retirados das formas, homogeneizados com o respetivo ingrediente, e posteriormente inseridos nas formas correspondentes, obtendo-se as formulações finais. Esta etapa foi a escolhida para efetuar as incorporações de forma a evitar que os ingredientes fossem removidos juntamente com o excesso de soro.

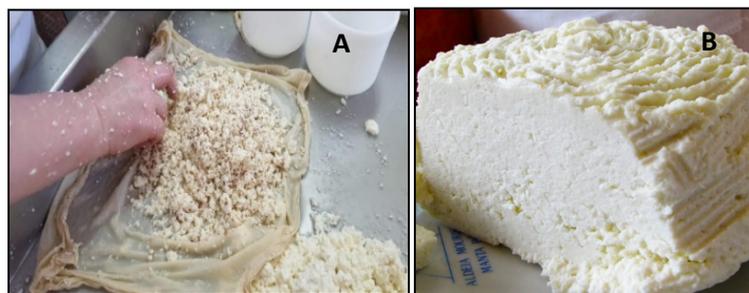


Figura 2: Processo de Incorporação: A- homogeneização, B- requeijão.

Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que a incorporação do extrato de *A. bisporus* e ergosterol puro não causou diferenças significativas no queijo requeijão. Em relação aos parâmetros físico-químicos, a cor do queijo incorporado com extrato foi a mais acastanhada em relação às outras duas amostras (requeijão com ergosterol e requeijão controlo). Em termos de crescimento microbiano, as incorporações não causaram alterações significativas nos microrganismos normais, pelo que os queijos incorporados com os ingredientes desenvolvidos apresentam também um tempo de vida de 6 dias.

### Resultados referentes à atividade hipocolesterolémica:

Para ambos os queijos, maturado e requeijão, foi possível verificar que na presença dos agentes hipocolesterolémicos, a absorção de colesterol é significativamente reduzida.

Relativamente ao queijo de ovelha maturado, foi possível determinar que as células Caco2 absorveram 30% do colesterol do queijo. Por outro lado, o queijo com ergosterol puro reduziu a absorção de colesterol em cerca de 12%, enquanto o queijo com extrato de *A. bisporus* reduziu a absorção em cerca de 15%.

Nos requeijões controlo verificou-se uma absorção de 43,89% do colesterol total presente no queijo, pelas células Caco2. Já na presença de ergosterol puro, a absorção de colesterol

foi reduzida em aproximadamente 21,1%, enquanto o queijo com *A. bisporus* reduziu a absorção em aproximadamente 30,24%.

Estes resultados destacam a capacidade do ergosterol em reduzir a absorção do colesterol, sendo um candidato interessante para o desenvolvimento de alimentos funcionais para efeitos hipocolesterolémicos.

Além disso, foi também possível verificar que a aplicação do extrato é mais eficiente do que a incorporação do ergosterol puro. Esta capacidade superior do extrato pode dever-se a interações do ergosterol com outras moléculas que facilitem a sua absorção nas células, em detrimento do colesterol. Esta formulação foi também a que obteve a mais alta aceitabilidade pela empresa devido ao seu aspeto, além de se apresentar como uma formulação de baixo custo, não necessitando de passos de purificação.

De maneira geral, foi possível produzir um produto diferenciado com efeito hipocolesterolémico pela incorporação de agentes bioativos obtidos a partir de um bio-resíduo sem valor económico, sendo este transformado num material de alto valor económico para a obtenção de moléculas hipocolesterolémicas.

**Limitações:** Pelos resultados obtidos, foi possível verificar que cerca de 30% da quantidade de extrato/ ergosterol incorporado nos queijos e nos requeijões, é perdida no processo, pois é removida juntamente com o excesso de soro que sai no caso dos requeijões ou então no processo de prensagem no caso do queijo maturado. Apesar de ser uma situação facilmente resolvível pela adição de uma maior quantidade de extrato, neste momento estão em curso estudos de encapsulação do extrato e do ergosterol puro, de forma a aumentar a sua solubilidade nas matrizes e diminuir a sua perda.