

Área: Tecnologia de Alimentos

ESTABILIDADE DE CAROTENOIDES MICROBIANOS MICROENCAPSULADOS POR ATOMIZAÇÃO

Michelle Barboza Nogueira^{1*}, Janaina Fernandes de Medeiros Burkert².

¹ Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, RS.

² Docente do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, RS.

*E-mail: mimibnogueira@gmail.com

RESUMO – Técnicas de microencapsulação representam uma alternativa para aumentar a estabilidade de carotenoides, que são pigmentos sensíveis à luz, presença de oxigênio e temperatura elevada, possibilitando sua aplicação em alimentos. Este estudo objetivou microencapsular carotenoides produzidos por *Phaffia rhodozyma*, através da técnica de atomização utilizando alginato de sódio (AS) e goma xantana (GX) como materiais de revestimento, avaliando sua estabilidade à luz e à temperatura, durante 28 dias de armazenamento. Haja vista que o extrato carotenogênico livre foi totalmente degradado em 6 dias, independente das condições de armazenamento, a microencapsulação com AS e GX possibilitou o aumento da estabilidade dos compostos de interesse, sendo GX o material de cobertura que promoveu maior proteção dos pigmentos, quando armazenados a 4°C na ausência de luz. Através das microcápsulas produzidas torna-se possível aplicar carotenoides microbianos em alimentos, mantendo suas características e propriedades bioativas.

Palavras-chave: bioprodutos; levedura; microcápsulas; pigmentos; *Phaffia rhodozyma*.

1 INTRODUÇÃO

A indústria de alimentos se utiliza de carotenoides para a aplicação em seus produtos, tanto com a função de pigmentação quanto por sua bioatividade. Tais compostos podem ser encontrados em inúmeras fontes naturais como vegetais, animais e alguns micro-organismos, conferindo cores que variam do amarelo ao vermelho e apresentando elevada atividade antioxidante, devido à sua capacidade que receber elétrons de espécies reativas, neutralizando radicais livres (GONNET, 2010; VALDUGA et al., 2009a). Apesar de estar presentes em fontes naturais, a maior parte de sua produção, em escala industrial, ocorre sinteticamente por processos químicos (VALDUGA et al., 2009b).

Diante da preocupação sobre o uso de aditivos químicos em alimentos, nota-se o interesse em processos biotecnológicos para obtenção de pigmentos (VALDUGA et al., 2009a), podendo-se citar a levedura *Phaffia rhodozyma*, que apresenta a capacidade de produzir carotenoides no interior de suas células através de cultivos microbianos. Este micro-organismo oferece vantagens frente a outras fontes naturais como o fato de ser certificado como GRAS (Generally Recognized as Safe), independência de sazonalidade, baixo custo de

produção, visto que necessita de fontes simples de carbono e nitrogênio, o que possibilita seu cultivo em meios alternativos de cultivo (CIPOLATTI et al., 2015) e por produzir como composto majoritário a astaxantina, que é um carotenoide de elevada bioatividade e alto valor comercial (NOGUEIRA; PRESTES; BURKERT, 2016).

A grande dificuldade de aplicação de carotenoides em alimentos se deve à sua elevada instabilidade à presença de luz, oxigênio e exposição a altas temperaturas, envolvidos em processos de produção, o que dificulta a manutenção de suas características e propriedades bioativas (BAGETTI, 2009). Desta maneira, o emprego de métodos de microencapsulação torna-se uma alternativa para aumentar a estabilidade destes compostos, através do aprisionamento dos pigmentos em partículas micrométricas, possibilitando e ampliando sua aplicação em produtos alimentícios (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Diante disso, este estudo objetiva microencapsular carotenoides produzidos pela levedura *Phaffia rhodozyma* pelo método de atomização, utilizando alginato de sódio (AS) e goma xantana (GX) como materiais de parede, avaliando sua estabilidade durante o armazenamento.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Produção e Recuperação dos Carotenoides

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268, proveniente do Laboratório de Pesquisa da Região Norte (Peoria, USA) certificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*), que foi mantido em ágar inclinado em meio extrato de malte e levedura (YM) com (g.L⁻¹): 3 de extrato de levedura, 3 de extrato de malte, 5 de peptona, 10 de glicose, adicionados de 0,2 g.L⁻¹ de KNO₃ a 4°C (PARAJÓ; SANTOS; VÁZQUEZ, 1998). Para a reativação, a partir das culturas estoques foram realizados repiques para tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48 h a 25°C. O inóculo foi realizado em erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do caldo YM, e adicionado de 10 mL do cultivo oriundo da reativação, sendo incubado a 25°C, 150 rpm por 48 h ou tempo necessário para atingir 1x10⁸ cél.mL⁻¹ (RIOS et al., 2015). A bioprodução de carotenoides foi realizada em erlenmeyers de 500 mL com 153 mL do meio de produção YM a pH inicial de 6,0, acrescidos de 10% de inóculo, sendo as condições operacionais do processo 25°C, 180 rpm por 168 h (RIOS et al., 2015). As biomassas obtidas foram secas em estufa a 35°C por 48 h, após, foram maceradas em gral e pistilo e os tamanhos das partículas foram padronizados através de peneira de Tyler 115, com tamanho de partícula > 125 µm (CIPOLATTI, 2012). A ruptura celular foi realizada pelo método de ondas ultrassônicas, utilizando 0,1 g de biomassa seca (48 h a 35°C), adicionando-se 6 mL de acetona seguido da aplicação de 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 min, sendo a água do banho trocada a cada ciclo, segundo o método adaptado de Medeiros e colaboradores (2008). Cada amostra foi centrifugada a 1745xg por 10 min, o solvente foi separado e o procedimento de ruptura foi repetido até o branqueamento total da célula. Nas fases solventes foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (p/v) e 10 mL de éter de petróleo. Após agitação e separação de fases o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na₂SO₄), dando origem aos extratos carotenogênicos. Para a obtenção do volume total dos extratos carotenogênicos a serem encapsulados foram realizadas 20 extrações para cada tratamento.

2.2 Microencapsulação dos Carotenoides e Estudo da Estabilidade

A microencapsulação dos carotenoides foi realizada pelo método de atomização, utilizando AS e GX como materiais de revestimento, de acordo com o método proposto por Racón et al. (2011), com adaptações. Para a elaboração das micropartículas foi realizada a rotaevaporação do solvente dos extratos carotenogênicos a 35°C, seguida de dissolução em solução aquosa contendo os agentes encapsulantes, nas proporções 1:1 e 1:2 (carotenoides:material de parede) em relação ao teor de sólidos. As dispersões foram agitadas por 3 h e logo submetidas à secagem através de aspersão por atomização em mini *spray dryer*, utilizando vazão da bomba de 0,15 L.h⁻¹, temperatura de entrada de 100°C e vazão de ar comprimido de 1,65 m³.min⁻¹.

Os estudos da estabilidade à luz e à temperatura foram realizados conjuntamente, avaliando-se o total de carotenoides das partículas armazenadas sob refrigeração (4°C) e à temperatura ambiente (25°C), na presença e ausência de luz. Os materiais encapsulados foram acondicionados em frascos de vidro, sendo uma parte destinada para armazenamento em ausência de luz e outra parte exposta a uma lâmpada de 100 W como fonte de luz artificial, disposta perpendicularmente e suspensa a 50 cm das amostras. O teste de estabilidade a luz foi realizado a cada 7 dias por um período de 28 dias, quantificando-se os carotenoides totais por método espectrofotométrico, com leitura a 474 nm, sendo os resultados expressos em percentual de carotenoides (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002). Para a realização do estudo da estabilidade à temperatura, utilizou-se o método adaptado de Sansone et al. (2011), QV, Zeng e Jiang (2011), no qual o mesmo material encapsulado foi armazenado em refrigerador a 4°C, e em estufa com temperatura controlada de 25°C, assumindo essa temperatura como ambiente, avaliando-se nos mesmos períodos descritos para a estabilidade à luz. Com a finalidade de verificar se a encapsulação aumenta a estabilidade dos extratos carotenogênicos, avaliou-se, nas mesmas condições, a estabilidade do extrato não encapsulado diariamente, até a total degradação dos compostos de interesse, correspondendo a 6 dias de avaliação. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados avaliados estatisticamente através da análise de variância, e quando detectadas diferenças ao nível de significância 5% ($p < 0,05$), foram seguidos por teste de Tukey ou teste t, de acordo com as variáveis avaliadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A estabilidade do extrato carotenogênico não encapsulado armazenado a 4°C e 25°C (Tabela 1), em presença de luz apresentou percentual dos compostos inferior quando comparado ao armazenado na ausência de luz ($p < 0,05$) em todos os tempos avaliados, observando-se uma queda significativa de 73,8% a 4°C e 51,7% a 25°C após o 1º dia. Apesar da diferença significativa observada após o primeiro dia de armazenamento, a total degradação dos compostos foi constatada ao 2º dia para ambas as temperaturas avaliadas, tornando perceptível a sensibilidade dos compostos de interesse à exposição à luz.

Na ausência de luz, o percentual de carotenoides não diferiu após o 1º dia de armazenamento em nenhuma das temperaturas avaliadas em comparação ao tempo 0. Após o 2º dia de avaliação, uma queda significativa foi observada a cada período de armazenamento avaliado, verificando-se total degradação ao 6º dia, demonstrando a instabilidade do extrato carotenogênico, ainda que seja protegido da incidência da luz, indicando a dificuldade de aplicação destes pigmentos em alimentos, sem que estejam encapsulados.

Tabela 1- Percentual de carotenoides no extrato carotenogênico não encapsulado armazenado sob refrigeração (4°C) e à temperatura ambiente (25°C) na presença e ausência de luz, pelo período de 6 dias.

Dia	Presença de luz		Ausência de luz	
	4°C	25°C	4°C	25°C
0	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a
1	26,2 bB ^b	48,3 bB ^a	97,8 aA ^a	98,1 aA ^a
2	0,0 cB ^a	0,0 cB ^a	73,1 bA ^a	74,0 bA ^a
3	0,0 cB ^a	0,0 cB ^a	45,6 cA ^a	46,3 cA ^a
4	0,0 cB ^a	0,0 cB ^a	20,7 dA ^b	28,2 dA ^a
5	0,0 cB ^a	0,0 cB ^a	5,0 eA ^b	10,5 eA ^a
6	0,0 cA ^a	0,0 cB ^a	0,0 fA ^a	0,0 fA ^a

*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) avaliando o percentual de carotenoides durante o armazenamento em cada temperatura avaliada. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na linha diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$) comparando a presença ou ausência de luz no armazenamento para cada temperatura avaliada, em cada tempo. Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferentes na linha diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$) comparando a influência da temperatura em cada tempo, na presença e ausência de luz. (n=3).

Na Tabela 2 observa-se que em todos os tratamentos estudados foi possível determinar os compostos de interesse após 7 dias de armazenamento, independente do material de parede e da presença ou ausência de luz, indicando que a microencapsulação é uma técnica que propicia o aumento da estabilidade dos pigmentos, uma vez que no extrato carotenogênico sem materiais de cobertura (Tabela 1), a total degradação dos compostos é observada em período inferior.

Tabela 2- Percentual de carotenoides retidos em micropartículas (MP) obtidas por atomização, armazenadas sob refrigeração (4°C) e à temperatura ambiente (25°C) na presença e ausência de luz, pelo período de 28 dias, utilizando alginato de sódio (AS) e goma xantana (GX) como materiais de revestimento.

MP	Dias de armazenamento									
	0		7		14		21		28	
	Armazenamento na presença de luz									
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
AS 1:1	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	35,5 bB ^a	34,6 bB ^a	12,3 bB ^a	12,8 bB ^a	0,0 bB ^a	0,0 bB ^a	0,0 aA ^a	0,0 aA ^a
AS 1:2	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	34,1 bB ^a	34,4 bB ^a	10,6 bB ^a	10,0 bB ^a	0,0 bB ^a	0,0 bB ^a	0,0 aA ^a	0,0 aA ^a
GX 1:1	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	61,3 aB ^a	59,2 aB ^a	38,5 aB ^a	38,8 aB ^a	12,2 aB ^a	9,4 aB ^b	0,0 aB ^a	0,0 aB ^a
GX 1:2	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	60,6 aB ^a	59,0 aB ^a	41,0 aB ^a	40,5 aB ^a	13,5 aB ^a	9,6 aB ^b	0,0 aB ^a	0,0 aB ^a
	Armazenamento na ausência de luz									
	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C	4°C	25°C
AS 1:1	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	96,0 bA ^a	94,2 bA ^a	65,3 bA ^a	46,2 bA ^b	52,8 bA ^a	26,7 bA ^b	42,6 bA ^a	6,0 bA ^b
AS 1:2	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	95,4 bA ^a	94,3 bA ^a	64,5 bA ^a	45,0 bA ^b	50,5 bA ^a	25,2 bA ^b	40,9 bA ^a	4,2 bA ^b
GX 1:1	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	98,6 aA ^a	96,8 aA ^a	85,2 aA ^b	76,1 aA ^b	70,9 aA ^b	50,8 aA ^b	58,4 aA ^a	32,5 aA ^b
GX 1:2	100,0 aA ^a	100,0 aA ^a	98,5 aA ^a	97,1 aA ^a	85,0 aA ^b	76,4 aA ^b	71,0 aA ^b	52,1 aA ^b	57,8 aA ^a	34,1 aA ^b

*Médias seguidas por letras minúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) avaliando revestimentos, dentro de cada condição e tempo de armazenamento. Médias seguidas por letras maiúsculas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$) comparando a influência da presença e ausência de luz, em cada tempo, para cada revestimento. Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferentes na linha diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$) avaliando a retenção para cada revestimento comparando as temperaturas de armazenamento em cada tempo de avaliação. (n=3).

A incidência da luz, em todos os casos estudados, influenciou negativamente o percentual de retenção de carotenoides, demonstrando em todos os tempos, valores inferiores quando comparados às micropartículas armazenadas na ausência de luz ($p < 0,05$). Na presença de luz a degradação total dos carotenoides foi observada para AS (1:1 e 1:2) aos 21 dias para ambas as temperaturas testadas, enquanto para GX (1:1 e 1:2) aos 28 dias, demonstrando diferença significativa entre as temperaturas testadas apenas no 21º dia de armazenamento, sendo que a temperatura de refrigeração propiciou maior recuperação dos carotenoides quando comparada à temperatura ambiente. Nos demais tempos analisados, as micropartículas produzidas com GX não apresentaram diferença significativa de estabilidade entre as temperaturas de armazenamento, quando na presença de luz.

Na ausência de luz para todos os tratamentos observou-se retenção dos carotenoides até o período final de avaliação, demonstrando que o processo de microencapsulação propicia a formação de partículas que protegem os compostos de interesse. Apesar disso, a partir do 14º dia é possível observar diferenças significativas entre os materiais de cobertura avaliados, bem como entre as temperaturas de armazenamento, podendo-se inferir que GX entre os materiais de parede estudados, é o que apresenta maior capacidade de proteção dos carotenoides, e que seu armazenamento sob refrigeração (4°C) é mais adequado para aumentar a estabilidade das micropartículas produzidas. Tanto para AS quanto para GX, observa-se a influência positiva que o armazenamento sob refrigeração exerce, quando comparado ao armazenamento à 25°C, independente da proporção estudada.

Ao promover a encapsulação de carotenoides presentes em suco de pitanga roxa, por liofilização, e estudar sua estabilidade, Rutz (2013) apontou a goma xantana como o agente encapsulante que propiciou maior retenção dos pigmentos, entre os materiais de parede utilizados, mantendo a estabilidade dos pigmentos. Porém, sua a melhor condição de armazenamento foi observada a 25°C na ausência de luz, diferindo deste estudo. Tal diferença possivelmente decorre da técnica empregadas na encapsulação e do perfil carotenogênico dos compostos encapsulados. Já Sáiz-Abajo et al. (2013) realizaram o estudo do efeito protetor acarretado pela nanoencapsulação de β -caroteno utilizando caseína como agente encapsulante, verificando que quanto maior o período de exposição das partículas a temperaturas mais elevadas, menores são as taxas de retenção de carotenoides, indicando que o armazenamento em baixas temperaturas são mais adequadas para preservar os compostos de interesse, concordando com esta pesquisa.

4 CONCLUSÃO

A microencapsulação aumenta a estabilidade dos extratos carotenogênicos produzidos por *P. rhodozyma*, sendo a goma xantana o material de parede que promove maior proteção dos pigmentos, quando armazenados sob refrigeração na ausência de luz, promovendo a maior retenção dos compostos de interesse, possibilitando e ampliando sua aplicação em alimentos.

5 REFERÊNCIAS

BAGETTI, Milena. Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora L.*). 85f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

CIPOLATTI, E. ; BULSING, B. ; Sá, C.S. ; BURKERT, C. A. V. ; FURLONG, Eliana Badiale ; BURKERT, J. F. M. . Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 1982-1988, 2015.

CIPOLLATI, E. P. Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2012.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p.103-112, 2008.

GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 276–290, 2010.

MATIOLI, G.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Licopeno Encapsulado em Goma Arábica e Maltodextrina: Estudo da Estabilidade. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.5, p.197-203, 2002.

MEDEIROS, F. O.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D. S.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de b-galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, vol. 31, n. 2, p.336-339, 2008.

NOGUEIRA, M. B.; PRESTES, C. F.; BURKERT, J. F. M. Incremento na recuperação de carotenoides utilizando ondas ultrassônicas para a ruptura celular da levedura *Phaffia rhodozyma*. In: XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS, Gramado, 6 p., 2016.

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VÁZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochemistry**, v.33, n.2, p.181- 187, 1998.

QV, X.-Y.; ZENG, Z.-P.; JIANG, J.-G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1596-1603, 2010.

RASCÓN, M. P.; BERISTAIN, C. I.; GARCÍA, H. S.; SALGADO, M. A. Carotenoid retention and storage stability of spray-dried encapsulated paprika oleoresin using gum Arabic and Soy protein isolate as wall materials. **Food Science and Technology**, v.44, p.549-557, 2011.

RIOS, D. A. S.; BORBA, T. M.; KALIL, S. J.; BURKERT, J. F. M. Parboiling wastewater in the maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotécnica**, vol.39, n.4, pp.401-410, 2015.

RUTZ, J. K.; Caracterização e microencapsulação de suco de pitanga roxa. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, 2013.

SÁIZ-ABAJO, M. J.; GONZÁLEZ-FERRERO, C.; MORENO-RUIZ, A.; ROMOHUALDE, A.; GONZÁLEZ-NAVARRO, C. J. Thermal protection of β -carotene in reassembled casein micelles during different processing technologies applied in food industry. **Food Chemistry**, v. 138, p. 1581 – 1587, 2013.

SANSONE, F.; MENCHERINI, T.; PICERNO, P.; D'AMORE, M.; AQUINO, R. P. LAURO, M. R. Maltodextrin/pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **Journal of Food Engineering**, v.105, p.468-476, 2011.

VALDUGA E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.; FÚRIGO JÚNIOR, A. **Química Nova**, n. 32, p. 2429, 2009a.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TATSCH, P.O.; TREICHEL, H.; FURIGO JR, A.; LUCCIO, M. D. Optimization of the production of total carotenoids by *Sporidiobolus salmonicolor* (CBS 2636) using response surface technique. **Food Bioprocess Technology**, v. 2, p. 415-421, 2009b.