

Área: Tecnologia de Alimentos

MICROENCAPSULAÇÃO DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR *Phaffia rhodozyma* PELO MÉTODO DE ATOMIZAÇÃO UTILIZANDO GOMA XANTANA COMO MATERIAL DE PAREDE

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 – Carotenoides são pigmentos instáveis à luz, temperatura elevada e presença de oxigênio, o que dificulta sua aplicação de alimentos. Sua microencapsulação representa uma alternativa para aumentar sua estabilidade. Este estudo objetivou produzir carotenoides através de cultivos de *Phaffia rhodozyma*, e promover sua microencapsulação pela técnica de atomização utilizando goma xantana como material de parede, em diferentes proporções. A encapsulação dos compostos de interesse foi confirmada por calorimetria diferencial de varredura através do não aparecimento de evento endotérmico característico do extrato livre após a encapsulação. Ocorreu à formação de partículas micrométricas bem definidas, separadas de morfologia arredondada. Para ambas as proporções estudadas, observou-se eficiência de encapsulação superior a 90%, indicando elevada proteção dos compostos de interesse, aumentando sua estabilidade e possibilitando sua aplicação em alimentos.

Palavras-chave: bioprodutos; pigmentos; cultivos microbianos; microcápsulas.

1 INTRODUÇÃO

Carotenoides são pigmentos naturalmente encontrados em animais, vegetais e alguns micro-organismos, considerados compostos bioativos devido à sua elevada capacidade antioxidante, decorrente de sua estrutura com ligações duplas conjugadas, que apresentam a capacidade de receber elétrons de espécies reativas, neutralizando radicais livres (GONNET, et al., 2010). Embora estes pigmentos sejam encontrados em fontes naturais, a maior parte dos carotenoides destinados à indústria de alimentos são obtidos sinteticamente por processos químicos (VALDUGA, et al., 2009a), fato que sugere um crescente interesse em estudos relacionados à sua produção natural através de processos biotecnológicos, em função da preocupação dos consumidores sobre o uso de aditivos químicos em alimentos (VALDUGA, et al., 2009b).

A levedura *Phaffia rhodozyma* é um micro-organismo certificado como GRAS (Generally Recognized as Safe), capaz de produzir intracelularmente carotenoides naturais por cultivos microbianos (MICHELON et al,

2012), que oferece vantagens frente a outras fontes naturais e microbianas, visto que independe de sazonalidade para a obtenção dos bioprodutos, não requer muito espaço físico para o seu cultivo e permite a utilização de meios alternativos para o seu crescimento, haja vista que necessitam de fontes simples de carbono e nitrogênio, acarretando em baixo custo de produção (VALDUGA et al, 2009a; CIPOLATTI et al, 2015), além do fato de ser a astaxantina o composto majoritário produzido pela levedura, carotenoide este de elevada bioatividade e valor comercial (NOGUEIRA; PRESTES; BURKERT, 2016).

No entanto, independente da fonte de obtenção, o grande empecilho que envolve a aplicação destes compostos em alimentos, se deve à sua elevada instabilidade à presença de luz, temperatura elevada e suscetibilidade à oxidação, envolvidas em etapas de processamento e estocagem de alguns produtos (BAGETTI, 2009). Desta maneira, tecnologias como a microencapsulação representam uma alternativa para aumentar a estabilidade dos carotenoides, através do aprisionamento desses compostos dentro de partículas em escala micrométrica, que acarretam o aumento de sua estabilidade e ampliam sua possibilidade de aplicação em alimentos (FAVARO-TRINTADE, et al., 2008).

Diante disso, este estudo objetiva promover a microencapsulação de carotenoides produzidos pela levedura *P. rhodozyma*, pelo método de atomização, utilizando goma xantana (GX) como agente encapsulante, visando sua aplicação em alimentos.

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 (Na_2SO_4), 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 Caracterização das Microcápsulas

A microencapsulação dos carotenoides foi realizada pelo método de atomização, utilizando goma xantana como material 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 o material de parede, 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 $0,15 \text{ L.h}^{-1}$, temperatura de entrada de 100°C e vazão de ar comprimido de $1,65 \text{ m}^3.\text{min}^{-1}$. A verificação da formação das microcápsulas, bem como a análise morfológica e o tamanho das partículas formadas foram observados através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com Castro (2002) e o tamanho médio das partículas foi determinado através de pelo menos 100 medidas realizadas utilizando o software Sigma Scan Pro 5. A eficiência de encapsulação (%EE) dos carotenoides foi realizada segundo o método espectrofotométrico descrito por Sutter, et al. (2007), baseado na estimativa dos carotenoides totais presentes dentro e fora das micropartículas. Para realizar a quantificação dos carotenoides presentes na superfície das micropartículas, 0,1g de amostra e 5mL de hexano foram misturados e levados a um agitador vortex por 10 segundos, seguidos de centrifugação a $3420 \times g$ por 10 minutos, recolhendo o sobrenadante. Para a quantificação do total de carotenoides presentes dentro e fora das micropartículas, foi realizada a dispersão das micropartículas em 5mL de hexano, agitou-se vigorosamente para a remoção do total de carotenoides, filtrou-se com algodão para um balão de 10mL e lavou-se o resíduo com hexano. Ambas as frações recolhidas foram avaliadas espectrofotometricamente em 470 nm quanto ao teor total de carotenoides. Os resultados foram expressos em percentual de carotenoides encapsulados através da equação 1.

$$\%EE = \frac{\text{Total de Carotenoides} - \text{Carotenoides da Superfície}}{\text{Total de carotenoides}} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

O rendimento do processo de encapsulação foi calculado com base na massa dos sólidos iniciais e finais, seguido de sua conversão em percentual. A confirmação da encapsulação foi realizada através da análise de calorimetria diferencial de varredura (DSC) de acordo com Rutz (2013) utilizando uma taxa de $10^\circ\text{C min}^{-1}$ entre 25 e 280°C , com fluxo de nitrogênio de 40 mL min^{-1} . 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 T.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi possível promover a microencapsulação dos carotenoides microbianos, observando-se elevada eficiência da encapsulação (Tabela 1), que considera o percentual de carotenoides protegidos pelo agente

encapsulante, apresentando valores superiores a 91%, para ambos os tratamentos. Tais resultados indicam que o método permite a preservação dos compostos de interesse e que a goma xantana promove o aprisionamento dos carotenoides nas microcápsulas formadas, concordando com estudos realizados por Wandrey et al. (2010), que sugerem que a principal vantagem desta técnica é a possibilidade de trabalhar com materiais termosensíveis, visto que o período de exposição das partículas ao calor é curto.

Tabela 1. Rendimento de processo e eficiência de encapsulação dos carotenoides microencapsulados pelo método de atomização utilizando goma xantana (GX) como agente encapsulante.

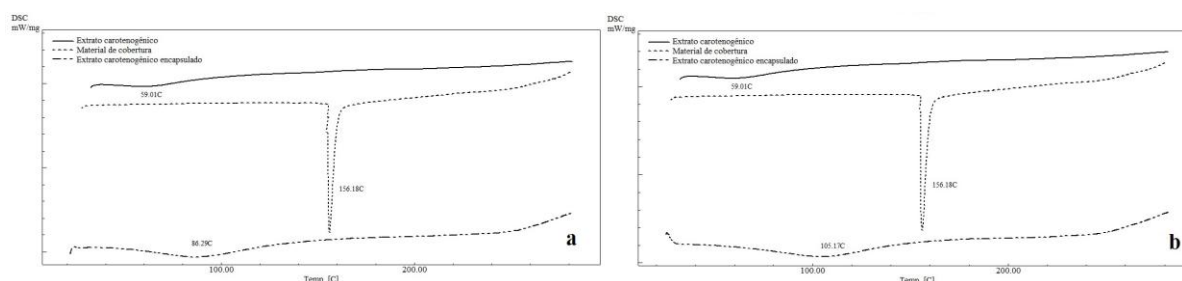
Agente encapsulante	Rendimento de processo (%)	Eficiência de encapsulação (%)
Goma Xantana 1:1	19,9 a	92,4 ± 1,5 a
Goma Xantana 1:2	20,2 a	91,6 ± 1,7 a

Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa pelo Teste T ($p < 0,05$). (n=3).

O mesmo não é observado rendimento do processo (Tabela 1), baseado na massa de sólidos para cada tratamento, apresentando valores em torno de 20% para ambos os tratamentos, não havendo diferença significativa ($p > 0,05$) entre eles. Tais resultados apontam que, nas condições deste estudo, as perdas durante o encapsulamento, se devem ao elevado teor de sólidos retidos nas paredes tubulares do interior do atomizador, de difícil acesso para sua retirada. De acordo com Jafari et al. (2008), existe uma concentração ótima de material a ser encapsulado como forma de garantir maior rendimento. A taxa de alimentação do líquido a ser atomizado deve ser ajustada como forma de garantir que cada gotícula aspergida atinja o nível desejado de secagem antes de entrar em contato com a superfície da câmara do atomizador. Desta maneira, a concentração do material a ser encapsulado, bem como a taxa de alimentação do atomizador são variáveis importantes a serem estudadas com a finalidade de aumentar o rendimento do processo.

O comportamento térmico das micropartículas produzidas pode ser observado através dos termogramas de DSC (Figura 1), onde picos endotérmicos e exotérmicos encontram-se representados através de curvas para baixo e de curvas para cima, respectivamente.

Figura 1. Termogramas de DSC das microcápsulas utilizando goma xantana (GX) como agente encapsulante nas proporções: a- GX 1:1, b- GX 1:2.

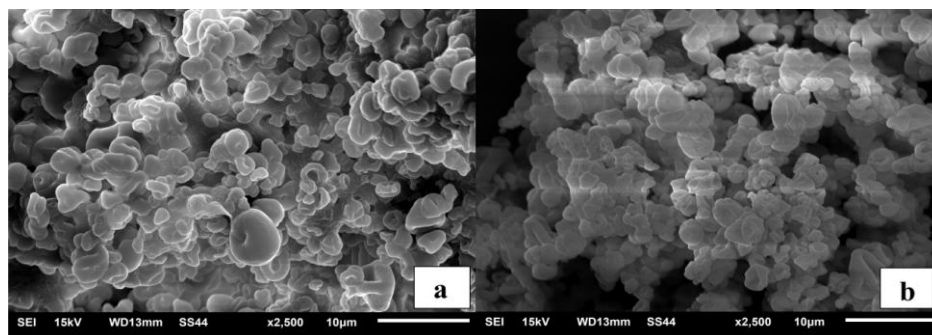


O extrato carotenogênico não encapsulado apresenta um pico endotérmico ao atingir 59°C, enquanto a GX apresenta um único pico endotérmico em 156,18°C. Já para os extratos carotenogênicos microencapsulados picos endotérmicos em 86,29°C (Figura 1a) e 105,17°C (Figura 1b) são observados, notando-se a ausência de pico característico do extrato carotenogênico não encapsulado, demonstrando a alteração do comportamento

térmico dos extratos encapsulados, sugerindo a proteção dos compostos de interesse e, conseqüentemente, sua encapsulação.

Através das micrografias de MEV (Figura 2) pode ser observada a formação de partículas de dimensão micrométrica, bem definidas e separadas, de morfologia arredondada, com superfícies desuniformes e aspecto enrugado, independente da proporção do material de parede.

Figura 2. Micrografias de MEV das micropartículas utilizando goma xantana (GX) como agente encapsulante nas proporções: a- GX 1:1, b- GX 1:2.



Os tamanhos médios de partículas foram de $2,8 \pm 3,1 \mu\text{m}$ para GX 1:1 e $2,2 \pm 2,4 \mu\text{m}$ para GX 1:2, variando de 0,6 a 6,7 μm e de 0,9 a 5,6 μm , respectivamente. De acordo com Fazaeli et al. (2012), a qualidade de produtos obtidos através da secagem por atomização é dependente das condições de operação do atomizador, que são consideradas adequadas quando se obtém, após a secagem, partículas que não tenham sofrido expansão e rachaduras em sua estrutura, o que pode ser observado no presente estudo.

4 CONCLUSÃO

A microencapsulação dos carotenoides produzidos por *P. rhodozyma* utilizando goma xantana como material de cobertura foi realizada pela técnica de atomização, obtendo-se partículas de morfologia arredondada, bem definidas e separadas, que acarretaram na proteção dos compostos de interesse, comprovada pela elevada eficiência de encapsulação (>90%). Desta maneira, as micropartículas produzidas neste estudo representam uma alternativa promissora para a aplicação de carotenoides naturais 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.
- CASTRO, L. A. S. Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2002, 37p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 93).
- 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.
- FAZAEI, M.; EMAM-DJOMEH, Z.; ASHTARI, A. K.; OMID, M. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food and Bioproducts Processing, Rugby**, v. 90, n. 4, p. 667-675, 2012.
- GONNET, M.; LETHUAUT, L.; BOURY, F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. **Journal of Controlled Release**, v. 146, p. 276–290, 2010.
- JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, Abingdon, UK, v. 26, n.7, p. 816-835, 2008.
- 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.
- MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. M. Extraction of Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A Comparison between Different Techniques of Cell Disruption. **Food Science Biotechnology**, n. 21, v.1, p. 1-8, 2012.
- 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.
- 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.
- SUTTER, S. C.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E. β -carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.332, p.45-54, 2007.
- 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.
- WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. Capítulo 3. Editora Springer Science Bussines Media, Lausanne, Suíça. p. 83-86, 2010.