

MICROENCAPSULAÇÃO DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS POR *Phaffia rhodozyma* E SUA ESTABILIDADE DURANTE O ARMAZENAMENTO

MICHELLE BARBOZA NOGUEIRA¹; CAROLINE FURTADO PRESTES²
JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT³

¹ Universidade Federal do Rio Grande – mimibnoqueira@gmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande – carolinepresteseng@hotmail.com

³ Universidade Federal do Rio Grande – jfmb@vetorial.net

1. INTRODUÇÃO

Os carotenoides são pigmentos amplamente utilizados na indústria de alimentos, que conferem cores que variam do amarelo ao vermelho (MALDONADE et al., 2007). Embora sejam encontrados em fontes naturais como vegetais, animais e alguns micro-organismos, boa parte de sua produção, em escala industrial, ocorre sinteticamente através de processos químicos (VALDUGA et al., 2009b).

No entanto, devido à preocupação sobre o uso de aditivos químicos em alimentos, existe um interesse crescente em carotenóides obtidos naturalmente através de processos biotecnológicos (VALDUGA et al., 2009a). É o caso da levedura *Phaffia rhodozyma*, que apresenta a capacidade de produzir intracelularmente carotenoides através de seu cultivo (FRENGOVA; BESHKOVA, 2009), oferecendo vantagens frente a outros micro-organismos e outras fontes naturais, como a independência de sazonalidade para a obtenção dos bioprodutos, a possibilidade de utilização de meios alternativos e de baixo custo, haja vista que necessitam de fontes simples de carbono e nitrogênio para o seu crescimento, além de ser um micro-organismo certificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) (CIPOLATTI et al., 2015; VALDUGA et al., 2009b).

Independente da fonte de obtenção, o grande impasse que envolve a aplicação dos carotenoides em alimentos, se deve à sua instabilidade a altas temperaturas e presença de luz e de oxigênio, demonstrando dificuldade em manter suas características ao serem submetidos a determinadas condições intrínsecas de alguns produtos (BAGETTI, 2009). O emprego de métodos de microencapsulação representa um alternativa para aumentar a estabilidade na estocagem e processamento, através do aprisionamento dos pigmentos, ampliando a sua aplicação em alimentos (FAVARO-TRINTADE et al., 2008).

Diante disso, o estudo objetiva microencapsular carotenoides produzidos pela levedura *Phaffia rhodozyma* pelo método de liofilização, utilizando alginato de sódio, proteína de soja e goma xantana como materiais de parede, avaliando sua estabilidade durante o armazenamento.

2. METODOLOGIA

2.1 Produção e Recuperação dos Carotenoides

O micro-organismo utilizado neste estudo foi a levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268 mantida em ágar inclinado em meio extrato de malte e levedura (YM) a 4°C. O inóculo foi realizado em erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL do caldo YM, e adicionado de 10 mL do cultivo reativado, sendo incubado a 25°C, 150 rpm por 48 h ou tempo necessário para atingir 1×10^8 cél.mL⁻¹. A bioprodução de carotenoides foi realizada em erlenmeyers de 500 mL com 153 mL de YM a pH inicial de 6,0, com 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 (48 h a 35°C), maceradas em gral e pistilo e os tamanhos das partículas foram padronizados com tamanho de partícula > 125 µm (CIPOLATTI, 2012).

A ruptura celular foi realizada com ondas ultrassônicas, utilizando 0,1 g de biomassa seca para 6 mL de acetona seguido da aplicação de 4 ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 min, 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 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 (BONFIM, 1999). Para a obtenção do volume total dos extratos a serem encapsulados foram realizadas 5 extrações para cada tratamento.

2.2 Microencapsulação dos Carotenoides e Estabilidade

Para a elaboração das partículas foi realizada a rotaevaporação do solvente dos extratos carotenogênicos a 35°C, seguida da dissolução em solução aquosa contendo os materiais de cobertura, sendo eles alginato de sódio (AS), proteína de soja (PS) e goma xantana (GX), nas proporções (carotenoides:material de parede) 1:1 e 1:2 em relação ao teor de sólidos. A mistura foi agitada por 3 h e posteriormente submetida ao congelamento a -80°C, seguido pelo processo de liofilização durante 48 h (PRALHAD; RAJENDRAKUMAR, 2004; LAINE, 2008). As microcápsulas foram armazenadas em frascos de vidro a 4°C e avaliadas quanto à estabilidade, na ausência de luz e expostas à lâmpada de 100 W a cada 7 dias pelo 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). O extrato livre também foi armazenado nas mesmas condições e avaliado diariamente.

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

O extrato carotenogênico em sua forma livre armazenado na presença de luz apresentou percentual dos compostos inferior quando comparado ao armazenado na ausência e luz ($p < 0,05$), observando-se uma queda de 77% após o 1º dia e total degradação dos compostos ao 2º dia de armazenamento. Na ausência de luz, o percentual de carotenoides no extrato livre não diferiu após o 1º dia de armazenamento, apresentando uma queda de 24% após o 2º dia e de 76% após o 4º dia de armazenamento, observando-se total degradação somente após o 6º dia, constatando a instabilidade do extrato livre e a influência negativa exercida pela presença de luz na concentração dos compostos de interesse.

A Tabela 1 demonstra que independente do material de parede e da presença ou ausência de luz em todos os tratamentos estudados foi possível quantificar os compostos de interesse após 7 dias de armazenamento, indicando que a microencapsulação aumenta a estabilidade dos pigmentos.

A presença de luz em todos os casos estudados afeta negativamente o percentual de retenção de carotenoides, demonstrando em todos os tempos valores inferiores quando comparados às microcápsulas 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 14 dias e para PS (1:1 e 1:2) e GX (1:1 e 1:2) aos 21 dias. Já na ausência de luz para todos os tratamentos observou-se retenção dos carotenoides até 21 dias, sendo GX o único material de parede a reter os compostos de interesse até o período final de análises e apresentar um percentual de retenção maior em todos os períodos avaliados, podendo-se inferir que entre os materiais de parede estudados, é o que apresenta maior capacidade de proteção dos carotenoides, e consequentemente aumenta sua estabilidade. Rutz (2013) ao estudar a estabilidade de carotenoides presentes em suco de pitanga roxa encapsulados pelo método de liofilização, também apontou a goma xantana como o material de parede que propiciou maior retenção dos pigmentos, quando armazenados a 25°C na ausência de luz, indicando ser um bom agente encapsulante para manter a estabilidade dos compostos de interesse.

Tabela 1. Percentual de carotenoides retidos em microcápsulas armazenadas sob refrigeração (4°C) na presença e ausência de luz, pelo período de 28 dias.

Microcápsulas	Dias de armazenamento				
	0	7	14	21	28
Armazenamento na presença de luz					
AS 1:1	100 aA ^a	17,01 cB ^a	0,00 cB ^a	0,00 aB ^a	0,00 aA ^a
AS 1:2	100 aA ^a	16,17 cB ^a	0,00 cB ^a	0,00 aB ^a	0,00 aA ^a
PS 1:1	100 aA ^a	34,31 bB ^a	16,51 bB ^a	0,00 aB ^a	0,00 aA ^a
PS 1:2	100 aA ^a	32,02 bB ^a	15,69 bB ^a	0,00 aB ^a	0,00 aA ^a
GX 1:1	100 aA ^a	53,37 aB ^a	33,13 aB ^a	0,00 aB ^a	0,00 aB ^a
GX 1:2	100 aA ^a	55,84 aB ^a	36,34 aB ^a	0,00 aB ^a	0,00 aB ^a
Armazenamento na ausência de luz					
AS 1:1	100 aA ^a	66,20 bA ^a	34,56 bA ^a	6,10 bA ^a	0,00 bA ^a
AS 1:2	100 aA ^a	64,27 bA ^a	35,12 bA ^a	5,65 bA ^a	0,00 bA ^a
PS 1:1	100 aA ^a	64,98 bA ^a	31,76 bA ^a	9,48 bA ^a	0,00 bA ^a
PS 1:2	100 aA ^a	64,13 bA ^a	30,53 bA ^a	8,72 bA ^a	0,00 bA ^a
GX 1:1	100 aA ^a	74,88 aA ^a	56,90 aA ^a	43,07 aA ^a	18,70 aA ^a
GX 1:2	100 aA ^a	76,71 aA ^a	56,33 aA ^a	43,63 aA ^a	17,83 aA ^a

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 ($p < 0,05$) avaliando a condição de armazenamento, em cada tempo, dentro de cada revestimento. Médias seguidas por letras minúsculas sobrescritas diferentes na coluna diferem entre si pelo teste t ($p < 0,05$) avaliando a concentração de cada revestimento dentro de cada condição e tempo de armazenamento.

AS e PS apresentam comportamentos iguais quanto à retenção dos pigmentos quando armazenados na ausência de luz ($p < 0,05$). É possível afirmar que o aumento da concentração do material de parede utilizado no processo de microencapsulação (1:1 para 1:2) não promove maior retenção dos pigmentos.

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que a microencapsulação aumenta a estabilidade dos carotenoides, sendo a goma xantana o material de parede que promove maior proteção dos pigmentos. O armazenamento das microcápsulas na ausência de luz proporciona maior retenção dos compostos de interesse.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAGETTI, Milena. **Caracterização físico-química e capacidade antioxidante de pitanga (*Eugenia uniflora* L.)**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) Universidade Federal de Santa Maria.
- BONFIM, T. M. B. **Produção de astaxantina pela levedura *Phaffia rhodozyma* a partir de meios de cultura de baixo custo**. 1999. 157f. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná.
- CIPOLLATI, E. P. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande.
- 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.
- 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.
- FRENGOVA, G. I.; BESHKOVA, D. M. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: Yeasts of biotechnological importance. **J. Ind. Microbiol. Biot.**, n. 36, p. 163-180, 2009.
- LAINE, P., KYLLI, P., HEINONEN, M., JOUPPILA, K. Storage stability of microencapsulated cloudberry (*Rubus chamaemorus*) phenolics. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.56, p.11251-11261, 2008.
- MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; BRAZ. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **J. Microbiology**, v. 38, n.1, p. 65-70, 2007.
- 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.; ALVES, F. G.; LISBOA, C. R.; MARTINS, D.; BURKERT, C. A. V.; KALIL, S. J. Ondas ultrassônicas e pérolas de vidro: um novo método de extração de β -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, fev. 2008.
- PRALHAD, T. RAJENDRAKUMAR, K. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary systems by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.34, p.333-339, 2004.
- 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**. 2013. 107 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade Federal de Pelotas.
- VALDUGA E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; LUCCIO, M.; FÚRIGO JÚNIOR, A. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **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.