



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS PRODUZIDOS  
POR *Sporidiobolus pararoseus* E *Rhodotorula mucilaginosa*  
LILIANNE TASSINARI BRAGA

JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT

Orientadora

CAROLINE COSTA MORAES

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE  
ESCOLA DE QUÍMICA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE  
ALIMENTOS

MICROENCAPSULAÇÃO DE EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS PRODUZIDOS  
POR *Sporidiobolus pararoseus* E *Rhodotorula mucilaginosa*  
LILIANNE TASSINARI BRAGA

Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de mestre em Engenharia e  
ciência de alimentos.

JANAINA FERNANDES DE MEDEIROS BURKERT

Orientadora

CAROLINE COSTA MORAES

Co-orientadora

RIO GRANDE, RS

2016

Ficha catalográfica

B813m Braga, Lilianne Tassinari.  
Microencapsulação de extratos carotenogênicos produzidos por  
*Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* / Lilianne Tassinari  
Braga. – 2016.  
60 p.

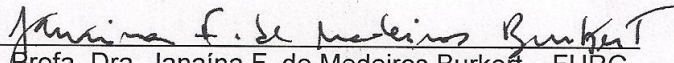
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande – FURG,  
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, Rio  
Grande/RS, 2016.  
Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Janaina Fernandes de Medeiros Burkert.  
Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Caroline Costa Moraes.

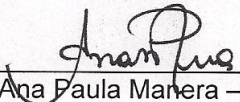
1. Carotenoides 2. Estabilidade 3. Leveduras 4. Encapsulação  
I. Burkert, Janaina Fernandes de Medeiros II. Moraes, Caroline Costa  
II. Título.


CDU 664

## APROVAÇÃO

Dissertação defendida por Lilliane Tassinari Braga e aprovada em 31 de agosto de 2016, pela Comissão Examinadora constituída pelos professores:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Janaina F. de Medeiros Burkert – FURG

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Paula Manera – UNIPAMPA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luiz Antonio de Almeida Pinto – FURG

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar meu caminho e nunca me deixar na mão mesmo em minhas horas mais escuras.

A minha mãe, que me ensinou a seguir em frente e nunca desistir não importa qual seja o tamanho do obstáculo, pois ele nunca será tão grande que eu não possa atravessar se tiver fé.

Ao meu padrasto Leandro que mesmo sem nenhuma responsabilidade sempre me apoiou incondicionalmente e cuidou das pessoas mais importantes na minha ausência.

Aos meus irmãos, por aguentarem minhas queixas e por me fazerem rir mesmo naqueles dias que eu só queria chorar e desaparecer.

Ao meu pai, que mesmo com todos os problemas nunca deixou de acreditar em mim, me incentivar e agora tem ideia do quanto é importante pra mim.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janaína Burkert que foi muito além da função de orientadora, obrigada por me dar suporte e não perder a fé que esse trabalho seria concluído.

A minha paciente co-orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Caroline Moraes.

Aos demais integrantes da equipe do LASCQ e Eng. Bio. por sempre estarem dispostos a ajudar, às vezes um abraço ou um convite para um café são tudo o que precisamos para melhorar nosso dia.

A Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Manera por estar mais uma vez me acompanhando em uma etapa muito importante ao participar da Banca Examinadora.

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio de Almeida Pinto pelas conversas nos corredores e por aceitar participar da Banca Examinadora.

Aos demais professores do PPGECA, os quais contribuíram com parte do que sou hoje.

Às minhas irmãs/mães do coração que estiveram lá por mim quando a minha família de sangue estava longe. Kely Noetzold e Juliana Leal, dinheiro nenhum no mundo pagaria tudo o que eu devo a vocês.

Aos meus amores, Carina Borba e Cleber Klasener, que mais uma vez são os maiores responsáveis por me manterem até o final.

E a tantos outros que Deus colocou em meu caminho e que de alguma forma foram de grande importância nesta longa trajetória.

## RESUMO

Carotenoides são pigmentos naturais responsáveis pelas cores de amarelo ao vermelho em muitos alimentos como frutas, hortaliças, gema de ovo, entre outros. São compostos bioativos amplamente distribuídos na natureza e alguns apresentam atividade pró-vitamina A, atuando na redução de riscos de doenças cardiovasculares e degenerativas como câncer e catarata. Além disso, possuem comprovada ação antioxidante na prevenção de danos causados nas células vivas por radicais livres. Os carotenoides podem ser obtidos a partir de fontes naturais como vegetais, por via sintética, ou produzidos por micro-organismos. Porém, um dos desafios em sua obtenção está no fato de serem muito sensíveis as condições às quais são expostos como luz, temperatura e oxigênio. Dessa forma, a microencapsulação apresenta-se como alternativa interessante para a proteção destes compostos, atuando sobre sua estabilidade. A técnica consiste genericamente, no empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas (0,2 a 5000  $\mu\text{m}$ ), que têm por objetivo proteger o material encapsulado de condições adversas de acondicionamento. No entanto, apesar do desenvolvimento desta e de outras formas de proteção, ainda existe um vasto campo a ser abordado quanto à estabilidade do biocomposto. Assim, este trabalho tem por objetivo estudar técnicas que permitam microencapsular extratos carotenogênicos produzidos pelas leveduras silvestres *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa*, bem como avaliar a estabilidade dos extratos livres e as principais características das microcápsulas. Os cultivos de cada levedura foram realizados em frascos agitados com 225 mL de meio composto por extrato de malte e levedura, a 25°C, 180 rpm e o tempo de duração ampliado de 168 h para 192 h para *S. pararoseus* e 216 h para *R. mucilaginosa*. Os extratos carotenogênicos foram recuperados através da técnica de ruptura da parede celular assistida em banho ultrassônico, onde um estudo permitiu a redução o número de ciclos de 4 para 3. A estabilidade nos extratos livres foi avaliada ao se controlar condições de temperatura e luminosidade durante 28 dias de armazenamento, constatando-se que a 25°C e em ausência de luz ocorreram menores perdas no conteúdo carotenogênicos dos extratos. Na busca por alternativas para aumentar a estabilidade destes extratos, foram avaliadas as técnicas de microencapsulação por liofilização e atomização, utilizando como material de revestimento goma xantana, goma arábica, alginato de sódio e proteína de soja. O tamanho das partículas formadas foi determinado através da análise das imagens geradas por um microscópio de varredura eletrônica. Ambas as técnicas resultaram em estruturas com dimensões na ordem de  $\mu\text{m}$ , porém apenas os materiais atomizados demonstraram formas esperadas para microcápsulas, deixando evidente a necessidade de se utilizar um agente crioprotetor nas emulsões a serem liofilizadas.

Palavras-chave: Carotenoides. Estabilidade. Leveduras. Encapsulação.

## ABSTRACT

### **Microencapsulation of carotenogenic extracts produced by *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa***

Carotenoids are natural pigments responsible for the colors of yellow to red in many foods such as fruits, vegetables, egg yolks, among others. Bioactive compounds are widely diffused in nature and some of them have pro-vitamin A activity, acting in reduce the risks of cardiovascular and degenerative diseases such as cancer and cataract. Besides, have proven antioxidant action to prevent damage in living cells by free radicals. Carotenoids may be synthetically obtained from natural sources such as plants or produced by microorganisms. But one of the challenges in obtaining is the fact that they are very sensitive to the conditions to which they are exposed to light, temperature and oxygen. Therefore, the microencapsulation is shown as an interesting alternative for protecting these compounds, acting on its stability. The technique is generally in the packaging of solid, liquid or gaseous in extremely small capsules (0.2 to 5000  $\mu\text{m}$ ), which aim to protect the encapsulated material from the adverse conditions packaging. However, despite the development of this and other forms of protection, there is still a vast field to be addressed regarding the stability of biocompound. This work aims to study microencapsulation techniques of carotenogenic extracts produced by wild yeasts *Sporidiobolus pararoseus* and *Rhodotorula mucilaginosa*, and evaluate the stability of the free extracts and the main characteristics of the microcapsules. The yeast culture each were performed in 500 mL shake flasks with 225 mL medium malt extract and yeast at 25°C, 180 rpm and the extended duration time from 168 h to 192 h for *S. pararoseus* and 216 h for *R. mucilaginosa*. The carotenogenic extracts were recovered through the cell wall rupture technique assisted in ultrasonic bath where a study possible to reduce the number of cycles from 4 to 3. The stability was evaluated in free extracts by controlling temperature and light during 28 days of storage, evidencing that in 25°C and in the absence of light there were fewer losses in the carotenoid content in the extract. For alternatives to increase the stability of these extracts were evaluated microencapsulation techniques by lyophilization and spray-dryer, using as coating material xanthan gum, arabic gum, sodium alginate and soy protein. The size of the particles formed was determined by analyzing the images generated by scanning electron microscopy. Both techniques have resulted in structures with dimensions in the  $\mu\text{m}$  order, but only the atomized material showed forms expected to microcapsules, making evident the need to use a cryoprotective agent in the emulsions to be lyophilized.

Keywords: Carotenoids. Stability. Yeasts. Encapsulation.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Influência do número de ciclos ultrassônicos na recuperação de carotenoides totais nos extratos de <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> . .....	35
<b>Tabela 2</b> – Carotenoides totais (média $\pm$ desvio padrão) durante armazenamento do extrato livre de <i>S. pararoseus</i> (28 dias a 25°C) na ausência e presença de luz.....	36
<b>Tabela 3</b> – Carotenoides totais (média $\pm$ desvio padrão) durante armazenamento do extrato livre de <i>R. mucilaginosa</i> (28 dias a 25°C) na ausência e presença de luz.....	37
<b>Tabela 4</b> – Carotenoides totais (média $\pm$ desvio padrão) durante armazenamento do extrato livre de <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> (28 dias a 4°C) na ausência de luz.....	39
<b>Tabela 5</b> - Eficiência da encapsulação (%) pelo método de liofilização.....	40



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Estrutura molecular de carotenoides cíclicos e acíclicos..... 16
- Figura 2** - Esquema simplificado da rota biossintética de carotenoides..... 17
- Figura 3** - Cinética para produção de carotenoides totais da *S. pararoseus* (a) e *R. mucilaginosa* (b) em frascos agitados, meio YM, a 25°C e 180 rpm..... 33
- Figura 4** - Micrografias de MEV (x 600) das microcápsulas liofilizadas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura (proporção 1:1): a - *S. pararoseus* com goma arábica; b - *S. pararoseus* com proteína de soja; c - *S. pararoseus* com goma xantana; d - *S. pararoseus* com alginato de sódio; e - *R. mucilaginosa* com goma arábica; f - *R. mucilaginosa* com proteína de soja; g - *R. mucilaginosa* com alginato de sódio..... 41
- Figura 5** - Termogramas de DSC das microcápsulas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura (proporção 1:1): a - *S. pararoseus* com goma arábica, b - *S. pararoseus* proteína de soja, c - *S. pararoseus* e alginato de sódio, d - *S. pararoseus* e goma xantana, e - *R. mucilaginosa* com goma arábica, f - *R. mucilaginosa* com proteína de soja, g - *R. mucilaginosa* com alginato de sódio. .... 44
- Figura 6** - Micrografias de MEV das microcápsulas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura: a (x 10000) – *S. pararoseus* com Alginato de sódio 1:1; b (x 10000) *S. pararoseus* com goma arábica 1:1; c (x 10000) *S. pararoseus* com proteína de soja 1:1; d (x 10000) *R. mucilaginosa* com alginato de sódio 1:1; e (x 10000) *R. mucilaginosa* com goma arábica 1:1; f (x 1000) *R. mucilaginosa* com proteína de soja 1:1. .... 47
- Figura 7** - Termogramas de DSC das microcápsulas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura: a - *S. pararoseus* com alginato de sódio 1:1, b - *S. pararoseus* goma arábica 1:1, c - *S. pararoseus* proteína de soja 1:1, d - *R. mucilaginosa* com alginato de sódio 1:1, e - *R. mucilaginosa* com goma arábica 1:1, f - *R. mucilaginosa* com proteína de soja 1:1. .... 49

## SUMÁRIO

RESUMO.....	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
SUMÁRIO.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 CAROTENOIDES.....	16
3.2 LEVEDURAS PRODUTORAS DE CAROTENOIDES.....	18
3.2.1 Rompimento da parede celular e extração.....	21
3.3 ESTABILIDADE DE CAROTENOIDES.....	22
3.4 MICROENCAPSULAÇÃO.....	23
3.4.1 Microencapsulação por liofilização.....	25
3.4.2 Microencapsulação por atomização.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 MICRO-ORGANISMOS.....	27
4.2 PREPARO DO INÓCULO.....	27
4.3 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS.....	27
4.4 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS CAROTENOIDES.....	28
4.4.1 Extração de carotenoides ao longo do cultivo.....	28
4.4.2 Extração de carotenoides para obtenção de cápsulas.....	28
4.4.3 Recuperação dos carotenoides para acompanhamento do cultivo e para obtenção de capsulas.....	28
4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS.....	29
4.5.1 Determinação de pH.....	29
4.5.2 Determinação da concentração de biomassa.....	29
4.6 TESTES DE ESTABILIDADE.....	29
4.6.1 Estabilidade à luz.....	29

4.6.2 Estabilidade à temperatura .....	30
4.7 MICROENCAPSULAÇÃO DOS CAROTENOIDES .....	30
4.7.1 Método de liofilização .....	30
4.7.2 Atomização.....	30
4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS .....	31
4.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	31
4.8.2 Eficiência da encapsulação.....	31
4.8.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	31
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1 CULTIVOS SUBMERSOS PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES .....	33
5.2 INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CICLOS ULTRASSÔNICOS NA RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS .....	35
5.3 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS NÃO ENCAPSULADOS .....	36
5.3.1 Estabilidade do extrato não encapsulado a 25°C na ausência e presença de luz para <i>S. pararoseus</i> .....	36
5.3.2 Estabilidade do extrato não encapsulado a 25°C na ausência e presença de luz para <i>R. mucilaginosa</i> .....	37
5.3.3 Estabilidade do extrato não encapsulado a 4°C na ausência de luz para <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> .....	38
5.4 MICROENCAPSULAÇÃO DOS EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS DE <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> UTILIZANDO O MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO .....	39
5.4.1. Eficiência de encapsulação dos extratos carotenogênicos de <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> .....	39
5.4.2. Micrografias eletrônicas de varredura das cápsulas contendo extratos carotenogênicos de <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> .....	40
5.4.3. Termogramas de DSC .....	43
5.5 MICROENCAPSULAÇÃO DOS EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS DE <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> UTILIZANDO O MÉTODO DE ATOMIZAÇÃO .....	45
5.5.1. Micrografias eletrônicas de varredura das cápsulas contendo extratos carotenogênicos de <i>S. pararoseus</i> e <i>R. mucilaginosa</i> .....	45
5.5.2. Termogramas de DSC .....	48
6 CONCLUSÃO .....	50
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	52
APÊNDICE A- Curva padrão de biomassa da levedura <i>Sporidiobolus pararoseus</i> .....	59

APÊNDICE B- Curva padrão de biomassa da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*. ..... 60

## 1 INTRODUÇÃO

Os carotenoides são compostos de grande importância para os alimentos. São corantes naturais, que variam de tonalidades do amarelo, passando pelo laranja, até o vermelho. Essa característica contribui para que influenciem diretamente na aceitabilidade de alguns alimentos. Além disso, muitos carotenoides são precursores da vitamina A, o que lhes confere ação como compostos bioativos, atuando na redução de riscos de doenças degenerativas como câncer, catarata e doenças cardiovasculares. Carotenoides são pigmentos terpenóides, de caráter lipofílico, formados por 40 átomos de carbono, derivados biossinteticamente de unidades pentacarbonadas denominadas de isoprenos e são solúveis principalmente em solventes apolares (AKSU; EREN, 2005; MATA-GÓMES et al., 2014).

Quanto ao mercado mundial de carotenoides, em 2014 foi estimado em cerca de 1,5 bilhões de dólares, e a expectativa é de aumento considerável para 2019, podendo atingir 1,8 bilhões de dólares com taxa de crescimento anual composta de 3,9% (MATA-GÓMES et al., 2014).

As indústrias e consumidores vêm aumentando a demanda por produtos naturais, levando a um aumento da pesquisa na área da bioprodução de carotenoides. O motivo principal do uso de micro-organismos na produção destes compostos, que também podem ser isolados de plantas e animais, ou ainda sintetizados quimicamente, se deve ao maior controle que se pode obter sobre a manipulação ambiental e genética (YOO; ALNAEELI; PARK, 2016).

Além disso, alguns compostos produzidos por síntese química possuem configuração diferente do obtido por fontes natural, possibilitando uma perda na atividade biológica. Os corantes derivados de fontes naturais são bioativos, e por esse motivo há um grande interesse no uso dos mesmos, como é o caso dos carotenoides astaxantina, licopeno e  $\beta$ -caroteno.

Os carotenoides são sintetizados por todos os organismos fotossintéticos, por fungos filamentosos e leveduras, e por algumas espécies de bactérias, microalgas e líquens, que podem ser utilizados como suplemento alimentar para humanos e animais. Entre as fontes microbianas de carotenoides, além das microalgas, como a *Haematococcus pluvialis*, as leveduras tais como *Phafia rhodozyma* e *Rhodotorula glutinis* apresentam interesse comercial (NAGHAVI et al., 2013; REYES; GOMEZ; KAO, 2013; SU et al. 2014).

A obtenção de carotenoides microbianos pode se tornar industrialmente viável, no caso do custo de produção ser minimizado, por exemplo, pela utilização de coprodutos como fonte de nutrientes (AKSU; EREN, 2007; MATA-GÓMES et al., 2014).

A produção e recuperação de carotenoides microbianos com ênfase no aproveitamento de resíduos e coprodutos agroindustriais vêm sendo investigada abordando a produção destes biocompostos por diferentes cepas de *Phaffia rhodozyma* aproveitando água de parboilização de arroz no meio de cultivo (RIOS et al., 2015) e água de parboilização de arroz e glicerol bruto (SILVA et al., 2012). A recuperação destes pigmentos produzidos pela *P. rhodozyma* através de diferentes métodos físicos, químicos, mecânicos e enzimáticos foram estudados por Fonseca et al. (2011) e Michelin et al. (2012).

Em continuidade, leveduras silvestres produtoras de carotenoides provenientes de ecossistemas do estado do Rio Grande do Sul, foram isoladas por Otero (2011), onde três foram selecionadas e identificadas como *Sporidiobolus pararoseus*, *Pichia fermentans* e *Rhodotorula mucilaginosa*, que se destacaram como produtoras de astaxantina, toruleno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína e  $\beta$ -caroteno, apresentando um expressivo potencial de produção de carotenoides com atividade antioxidante, em diferentes coprodutos agroindustriais (água de parboilização do arroz, glicerol bruto, água de maceração de milho e melão) utilizados como substratos alternativos (CIPOLATI, 2012; MACHADO; BURKERT, 2015; OTERO, 2011). Ainda foram estudados por Reis (2012) e Machado Jr. (2014) a produção e recuperação de carotenoides utilizando a microalga *Haematococcus pluvialis*.

Por outro lado, estudos verificaram que durante as aplicações de carotenoides ocorrem perdas por degradação que afetam suas propriedades estruturais, fato que está ligado à sensibilidade das moléculas à temperatura, luminosidade e oxigênio. Portanto, técnicas de proteção, como, por exemplo, a microencapsulação, podem ser utilizadas visando melhorar a estabilidade e estender a durabilidade desses compostos (RUTZ, 2013; TISCH; SCHMOLL, 2010).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar técnicas que permitam microencapsular extratos carotenogênicos produzidos por *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa* silvestres.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o tempo de cultivo para obtenção de carotenoides microbianos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*;
- Avaliar a influência do número de ciclos de extração assistidos por ultrassom na recuperação de carotenoides nos extratos carotenogênicos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*;
- Determinar a estabilidade em condições de armazenamento (luz e temperatura) do extrato livre;
- Avaliar metodologias de microencapsulação dos extratos de carotenoides por liofilização e atomização, utilizando como material de revestimento goma arábica, goma xantana, alginato de sódio e proteína de soja.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

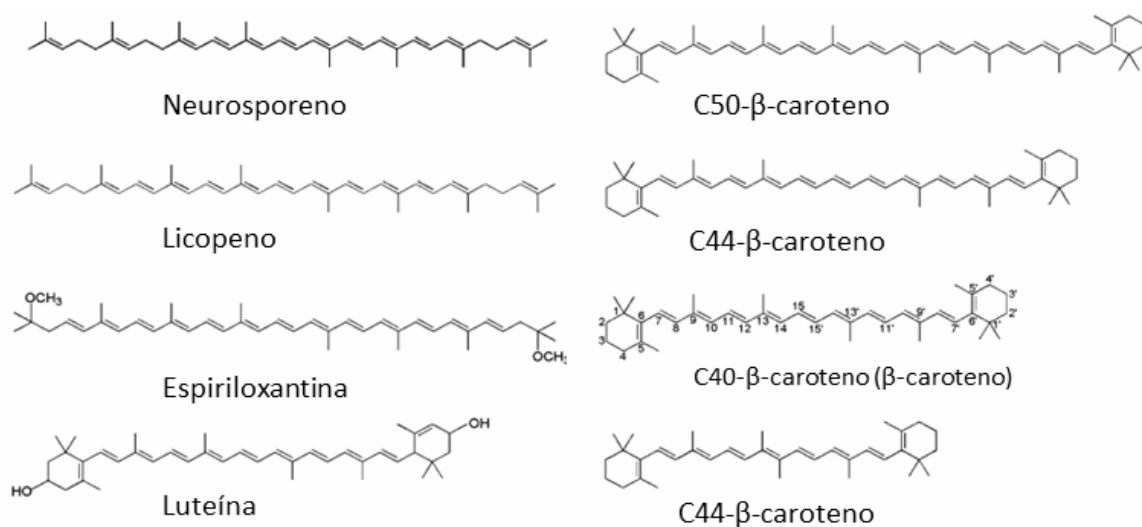
#### 3.1 CAROTENOIDES

Os carotenoides são pigmentos lipossolúveis encontrados em plantas fotossintéticas, algas, bactérias fototróficas e tecidos animais, sendo a maioria tetraterpenoides de quarenta carbonos (C40). Sua estrutura molecular é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. O sistema de duplas ligações conjugadas confere habilidade de absorver luz na região do visível, refletindo cores nas bandas do amarelo ao vermelho, responsável pela pigmentação de um grande número de frutos, folhas e flores (MATA-GÓMES et al., 2014; RUTZ et al.; 2013)

O mesmo sistema de duplas ligações também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados. Nos organismos que não realizam fotossíntese, os carotenoides são importantes agentes antioxidantes, assim, diversas bactérias e fungos não fototróficos tem os carotenoides como barreira de proteção quando em exposição ao ar e a luz (MATA-GÓMES et al., 2014; OLIVIER; PALOU, 2000; RUTZ et al.; 2013; YEUM; RUSSELL, 2002).

Carotenoides naturais apresentam diferenças estruturais significativas. O esqueleto de carbono pode ser de cadeia totalmente linear ou incluir anéis cíclicos, como o  $\beta$ -caroteno, onde a cadeia linear se estende entre dois anéis cíclicos como pode ser observado na Figura 1 que ilustra estruturas de alguns carotenoides (MENDES-PINTO et al., 2013).

**Figura 1** - Estrutura molecular de carotenoides cíclicos e acíclicos

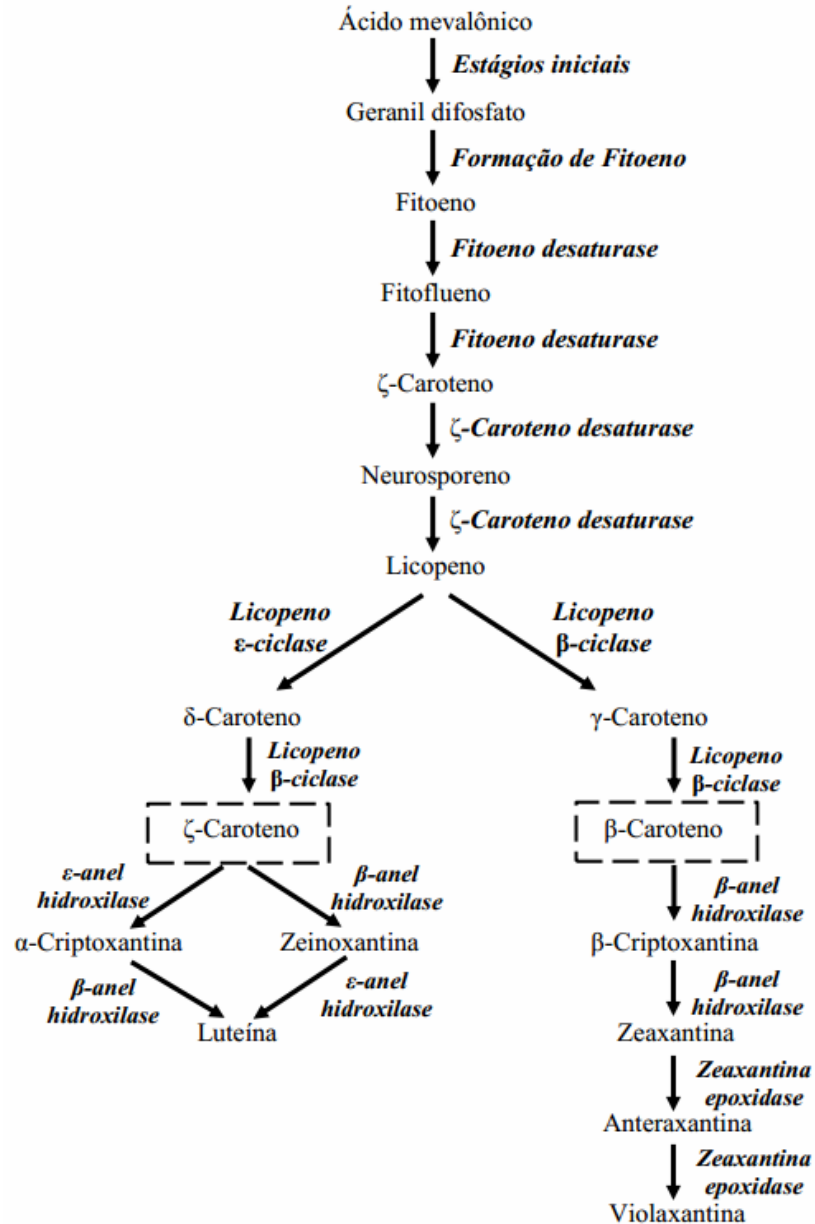


Fonte: Adaptado de Mendes-Pinto et al. (2013).



A rota biossintética dos carotenoides pode ser dividida em cinco etapas: estágios iniciais, formação de fitoeno, dessaturação, ciclização e formação de xantofilas, como pode ser observado na Figura 2 (SILVA, 2004).

**Figura 2** - Esquema simplificado da rota biossintética de carotenoides.



Fonte: Adaptado de Silva (2004).

Muitos carotenoides são precursores da vitamina A e sua ingestão representa um papel de grande importância para a saúde humana, uma vez que está ligada a redução do risco de doenças, como câncer, problemas cardiovasculares e de visão (AZMACH et al., 2013).

Tanto os carotenoides pró-vitamina A, tais como  $\alpha$ -caroteno e  $\beta$ -caroteno, e os não promotores da vitamina, como a luteína e o licopeno, estão presentes no sangue e nos tecidos dos seres humanos onde são responsáveis por diversas funções, que incluem a eliminação de radicais livres e reforço do sistema imunológico. Cada tipo de carotenoide pode possuir ação específica, como o licopeno, que é abundante em frutas e vegetais de coloração próxima ao amarelo, está relacionado à redução no risco de certos tipos de câncer e doenças cardíacas (TANG et al., 2014; YEUM; RUSSELL, 2002).

A maior parte dos carotenoides empregados industrialmente é obtida por síntese química, como por exemplo, enantiômeros de astaxantina sintetizados a partir de  $\alpha$ -isoforona e vinilbutinol (HEIDER et al., 2014).

Em termos estruturais da molécula, os carotenoides sintéticos são muito parecidos, a maior diferença é encontrada no fato dos carotenoides naturais proporcionarem maiores benefícios à saúde (MATA-GÓMES et al., 2014).

Uma alternativa bastante comum à síntese química é a extração a partir de algumas plantas e vegetais, o inconveniente é que este processo é dependente de condições sazonais. Estes fatos impulsionam os estudos sobre a obtenção por via biotecnológica, ou seja, por micro-organismos capazes de sintetizar carotenoides permitindo a produção em espaços reduzidos, em condições controladas, e ainda a possibilidade de se utilizar como substrato coprodutos de baixo valor agregado podendo resultar em diminuição do custo de produção (AKSU; EREN, 2005, 2007; BOTELLA-PAÍVA; RODRÍGUES-CONCEPCIÓN, 2006; MATA-GÓMES et al., 2014).

Mesmo existindo diversos tipos de micro-organismos produtores de carotenoides, as leveduras se destacam por crescerem em diferentes fontes de carbono e nitrogênio para a biossíntese do pigmento, o que permite a inserção de substratos alternativos como coprodutos agroindustriais (MACHADO, 2013).

### 3.2 LEVEDURAS PRODUTORAS DE CAROTENOIDES

Carotenoides podem ser obtidos por via biotecnológica utilizando-se bactérias (GU et al., 2008; ÚBEDA, 2008), microalgas (REIS et al., 2011; YOO et al. 2012) e diversos gêneros de leveduras também já foram reportados como sendo produtoras de carotenoides, dentre elas *Cryptococcus*, *Phaffia*, *Rhodospiridium*, *Rhodotorula*, *Sporidiobolus* e *Sporobolomyces* (EL-BANNA et al., 2012).

Maldonade, Scamparini e Rodriguez-Amaya (2007) selecionaram e identificaram leveduras produtoras de carotenoides encontradas no ecossistema brasileiro. Utilizaram como

meio o caldo extrato de malte e levedura (YM), e o cultivo apresentou duração de 5 dias a 25°C com agitação de 200 rpm, sem iluminação. Dos 242 micro-organismos isolados, apenas 5 foram selecionadas por apresentar coloração intensa entre os tons amarelo e vermelho. Após identificação através de características morfológicas e de reprodução, juntamente com os testes fisiológicos e bioquímicos, foi possível classificar quatro dos micro-organismos como cepas de *Rhodotorula mucilaginosa* e uma como sendo de *Rhodotorula graminis*. As concentrações de carotenoides totais não apresentaram diferença significativa entre as cepas identificadas, enquanto *R. mucilaginosa*-135 apresentou o maior valor 61,4  $\mu\text{g g}^{-1}$ , *R. mucilaginosa*-137 apresentou o menor valor (54,7  $\mu\text{g g}^{-1}$ ).

El-Banna et al. (2012) isolaram leveduras a partir de flores, árvores, frutas e queijo. Foram isoladas e selecionadas 46 amostras, das quais se identificou e classificou a mais promissora para a produção de carotenoides como *Rhodotorula glutinis*, que demonstrou ser produtora moderada de carotenoides. Alcançando produções que variaram de 90,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  a 380,9  $\mu\text{g L}^{-1}$ .

Silva (2009) estudou diferentes meios de cultura empregando água de parboilização do arroz como substrato para o cultivo de 3 cepas de *Phaffia rhodozyma* para a produção do carotenoide astaxantina. Uma delas foi selecionada como sendo a mais promissora, alcançando 350,2  $\mu\text{g g}^{-1}$  de produção de astaxantina específica e 2,4  $\mu\text{g L}^{-1}$  de astaxantina volumétrica. Após a otimização obteve uma maximização da produção do carotenoide, chegando a 628,8  $\mu\text{g g}^{-1}$  de astaxantina específica.

Ainda na busca por fontes alternativas para a bioprodução de astaxantina, Silva (2010) avaliou diferentes técnicas de ruptura celular para recuperação de astaxantina produzida por *P. rhodozyma* NRRL Y-17268 testando métodos químicos e diferentes solventes. Também foi avaliada a temperatura e a utilização do coproduto glicerol bruto na produção de carotenoides. O estudo do meio de produção foi realizado através da metodologia de planejamento experimental e análise de superfície de resposta, onde foi verificada a possibilidade do aproveitamento concomitante do coproduto glicerol bruto e do efluente de parboilização do arroz, obtendo como condições ótimas do meio de cultura de bioprodução de carotenoides em ( $\text{g L}^{-1}$ ): 35 glicerol, 7,5 peptona, 6,4 glicose, 90 efluente, 20 extrato de malte, 1 extrato de levedura e pH inicial 4,0, alcançando concentração de biomassa de 13,5  $\text{g L}^{-1}$ , produção volumétrica e específica de carotenoides de 2,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 176,0  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente em 168 h.

Otero (2011) isolou cepas de leveduras silvestres produtoras de carotenoides na região do Escudo Sul-Rio-Grandense e Litoral Médio no estado do Rio Grande do Sul, onde

três leveduras se destacaram, sendo selecionadas e identificadas como *Pichia fermentans*, *Sporidiobolus pararoseus* e *Rhodotorula mucilaginosa*, cultivadas por 168 h, 180 rpm a 25°C. Dentre estas, *S. pararoseus* apresentou produção máxima de carotenoides específicos e volumétricos de 123,64  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 905,30  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, com 7,32  $\text{g L}^{-1}$  de biomassa no meio YM. Enquanto, *P. fermentans* alcançou um máximo de carotenoides específicos de e volumétricos de 54,07  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 610  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente, com 11,84  $\text{g L}^{-1}$  de biomassa em meio YM. Para *R. mucilaginosa*, foi observado uma produção menor de carotenoides, com 28,06  $\mu\text{g g}^{-1}$  e 310  $\mu\text{g L}^{-1}$ , alcançando 11,18  $\text{g L}^{-1}$  de biomassa, também cultivado em meio YM. A produção de carotenoides como luteína,  $\beta$ -criptoxantina e  $\beta$ -caroteno foi observada para as leveduras *S. pararoseus* e *P. fermentans*, enquanto *R. mucilaginosa* apresentou a produção da luteína.

Na sequência, Cipolatti (2012) estudou as leveduras *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, realizando cultivos submersos a 25°C, 180 rpm, por 168 h, avaliando a produção de carotenoides a partir de meios contendo água de maceração de milho e glicerol (M1), e água de maceração de milho e melão (M2), comparando com o meio YM, bem como a atividade antioxidante dos extratos carotenogênicos. *S. pararoseus* apresentou maior produção de carotenoides nos meios alternativos, com 634,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 87,3  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o meio M1 e 830,3  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 68,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o M2, respectivamente. Ainda se destacou em relação a produção de  $\beta$ -caroteno, com 89,2 e 94,4% dos carotenoides identificados nos meios M1 e M2, respectivamente. Alcançando 7,3, 9,8 e 12,2  $\text{g L}^{-1}$  de concentração de biomassa para M1, YM e M2, respectivamente. Foi quantificado para *R. mucilaginosa* uma produção de carotenoides totais de 1068,5  $\mu\text{g L}^{-1}$  em meio YM, sendo superior aos demais meios e leveduras estudados. O carotenoide  $\beta$ -caroteno foi produzido em maior quantidade pela *R. mucilaginosa* em meio YM. Nos meios alternativos, a produção de carotenoides para esta levedura foi de 820 e 750  $\mu\text{g L}^{-1}$  para M1 e M2, respectivamente.

Machado (2013) estudou a otimização do processo de produção de carotenoides por *S. pararoseus* e a influência de pré-tratamentos nos meios de cultivos utilizando coprodutos agroindustriais, como água de maceração de milho, glicerol bruto e melão de cana de açúcar, a 25°C, 180 rpm, por 168 h. Na otimização do meio agroindustrial formulado com 40  $\text{g L}^{-1}$  de melão de cana de açúcar e 6,5  $\text{g L}^{-1}$  de água de maceração de milho, obteve-se valores máximos para produção de carotenoides de volumétricos 520,94  $\mu\text{g L}^{-1}$  e 73,19  $\mu\text{g g}^{-1}$  de específicos, e 7,82  $\text{g L}^{-1}$  de biomassa, com pH inicial ajustado para 6,0. No meio de cultivo otimizado com melão e água de maceração de milho o pré-tratamento com ácido sulfúrico foi positivo, promovendo um incremento na produção de carotenoides, de

936,35  $\mu\text{g L}^{-1}$  (79,63  $\mu\text{g g}^{-1}$ ), proporcionando um ganho de aproximadamente 44% na produção volumétrica e 16% na específica comparado ao meio sem tratamento, além de um crescimento celular 34,69% superior. Para o meio formulado com glicerol bruto (30  $\text{g L}^{-1}$ ) e água de maceração de milho (52,9  $\text{g L}^{-1}$ ) pré-tratado com ácido sulfúrico, foi encontrada produção de 13,0  $\text{g L}^{-1}$  de biomassa. Porém, os pré-tratamentos no meio otimizado com glicerol bruto e água de maceração de milho não foram eficientes.

### 3.2.1 Rompimento da parede celular e extração

A parede celular das leveduras em geral é formada por polissacarídeos, proteínas e glicoproteínas, possibilitando assim, uma estrutura complexa. Os componentes básicos das camadas da parede são glucanas, mananas e proteínas que são responsáveis pela resistência mecânica que exige elevadas tensões de cisalhamento para serem rompidas. Devido ao seu maior tamanho e estrutura, a ruptura da parede celular das leveduras tende a ser mais fácil se comparado a de uma bactéria (AKSU; EREN, 2005; KILIKIAN; PESSOA, 2001; KLIS et al., 2002).

Técnicas mecânicas e não mecânicas como as físicas, químicas ou enzimáticas, ou ainda a combinação destas técnicas têm sido aplicada para recuperar carotenoides produzidos pelos micro-organismos (MICHELON et al., 2012; MONKS et al., 2013).

A bioprodução industrial de carotenoides vem se expandindo comercialmente, porém as operações de extração e recuperação do produto contribuem para o aumento dos custos do processo de produção. Assim, trabalhos que visem estudar a recuperação eficiente dos carotenoides intracelulares, podem contribuir para a redução dos custos de *downstream* (TATSCH, 2008).

Tradicionalmente, a extração de diversos biocompostos a partir de produtos naturais é realizada industrialmente usando diferentes solventes. Os métodos mais convencionais de extração, que são por maceração e soxhlet, apresentam alguns inconvenientes, tais como o grande volume de solvente utilizado, longo período de extração e baixo rendimento (ORDÓÑEZ-SANTOS; PINZÓN-ZARATE; GONZALEZ-SALCEDO, 2015).

Quando se pretende extrair compostos bioativos intracelulares, incluindo pigmentos como os carotenoides, é necessária a avaliação de alguns parâmetros, tais como resistência da parede celular, localização intracelular, estabilidade e tipo de aplicação que se espera do produto. Assim os métodos físico, químico, enzimático ou ainda uma combinação destes pode ser aplicada (MONKS et al., 2013).

Dentre as técnicas de ruptura celular estudadas para a levedura *S. pararoseus*, o banho ultrassônico e a abrasão com pérolas de vidro apresentaram os melhores resultados ( $84,79 \pm 2,34$  e  $76,87 \pm 2,06 \mu\text{g g}^{-1}$ ) para recuperação dos carotenoides, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre eles, onde o processo de congelamento da biomassa não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides. Para a levedura *R. mucilaginosa*, o maior valor de carotenoides recuperados foi obtido com assistência do banho ultrassônico ( $193,5 \pm 25,8 \mu\text{g g}^{-1}$ ), sendo que o processo de congelamento da biomassa também não influenciou positivamente no percentual de extratibilidade e na concentração específica dos carotenoides (LOPES, 2014).

A extração assistida por ultrassom ocorre pela a intensificação da transferência de massa, devida ao fenômeno de cavitação durante o colapso das bolhas produzidas pela sonicação que facilita o fluxo de solvente dentro das células, o que resulta em aumento na eficiência da extração (RASHED et al., 2016). A cavitação promove a liberação de compostos, pois ocorre um maior transporte de massa ao causar perturbações que rompem a parede celular, o que aumenta a superfície de contato entre a matriz sólida e a fase líquida (solvente). Com este método, pode-se realizar as extrações em curto período de tempo, com elevada reprodutibilidade e menor consumo de solvente, simplificando assim todo o processo, além da possibilidade de se obter maior rendimento (TOMŠIK et al., 2016).

### 3.3 ESTABILIDADE DE CAROTENOIDES

A principal via de degradação de carotenoides é a oxidação devido ao grande número de ligações conjugadas presentes na molécula e depende do contato com oxigênio, luz e calor (SACHINDRA; MAHENDRAKAR, 2010). A ruptura das células e extração do carotenoide retira a proteção e aumenta a suscetibilidade às condições ambientais e à presença de compostos com atividade pró-oxidante (MELÉNDEZ-MARTINEZ; VICARIO; HEREDIA, 2007; RIBEIRO E SERAVALLI, 2004).

Quanto ao parâmetro temperatura, historicamente, o caroteno foi considerado estável à temperatura, atualmente tem-se o conhecimento de que em temperaturas muito elevadas, como as de esterilização, ocorrem reações de isomerização e degradação térmica com geração de produtos de fragmentação que são voláteis (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010).

Cerón-Garcia et al. (2010) estudaram a estabilidade da luteína em diferentes condições de armazenamento tanto da biomassa, quanto de extratos carotenogênicos obtidos da microalga *Scenedesmus almeriensis*. Os extratos foram preparados em acetona e em uma

solução de azeite de oliva. Os resultados demonstraram ser a temperatura mais baixa, o fator de maior importância para a conservação do conteúdo de carotenoides. O conteúdo de luteína em azeite de oliva se manteve estável durante 5 meses nas temperaturas de 4 e -18°C, no entanto, foi registrada uma redução constante a 20°C. Em temperatura ambiente, a redução no conteúdo luteína após 16 meses foi de 25%. No que diz respeito aos extratos preparados em acetona, à temperatura ambiente foi observada redução constante no teor de luteína, resultando em uma perda de 40% após o período de 6 semanas. Na temperatura de -18°C resultado semelhante foi observado, mas com uma menor taxa de degradação do carotenoide, que resultou em uma perda final de 20%.

Lin e Chen (2005) estudaram a estabilidade dos carotenoides contidos em suco de tomate durante o armazenamento do produto. Os tomates passaram por processamento padrão para o preparo do suco e após amostras foram estocadas em presença e ausência de luz, nas temperaturas de 4, 25 e 35°C durante 12 semanas. Os testes realizados comprovaram que as maiores perdas e mudanças na configuração das moléculas dos carotenoides presentes no suco, ocorreram na maior temperatura de armazenamento quando em presença de luz.

### 3.4 MICROENCAPSULAÇÃO

Quando se pretende preservar as propriedades não só dos carotenoides, mas também de outros compostos bioativos, a técnica de encapsulação torna-se uma abordagem bem promissora. Os sistemas clássicos desenvolvidos em nano ou microencapsulação baseiam-se no reservatório ou partículas matriciais. Estes sistemas quando executados de maneira correta, formam uma espécie de barreira físico-química contra elementos de ação pró-oxidante, como os radicais livres, o oxigênio ou a luz (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; TISCH; SCHMOLL, 2010).

Microencapsulação pode ser definida como uma tecnologia de empacotamento de sólidos, líquidos ou gases, em cápsulas seladas com tamanho muito reduzido, que pode liberar o seu conteúdo a taxas controladas em condições específicas. Os materiais embalados podem ser materiais puros ou ainda uma mistura, que também são chamados de material revestido, material do núcleo, ativos, fase de preenchimento interno ou carga útil. Por outro lado, os materiais de embalagem são chamados de material de revestimento, material de parede, cápsula, membrana ou invólucro, o qual pode ser feito de diversos materiais tais como açúcares, gomas, proteínas, polissacarídeos naturais e modificados, lipídios e polímeros sintéticos. A escolha do conjunto a ser utilizado depende diretamente das propriedades físico-químicas do invólucro e do tipo de relação entre ele e o material a ser encapsulado, pois isso

determinará as características das partículas formadas (FANG; BHANDARI, 2010; GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010).

A técnica de encapsulação pode ser aplicada em diferentes segmentos, como por exemplo, em produtos farmacêuticos e cosméticos, assim como na indústria de alimentos. Podem ser aplicada em alimentos visando diversos fins, tais como aumentar a estabilidade do produto encapsulado contra os danos causados por condições externas de luz ou ao calor durante o processamento e armazenagem de alimentos na matriz, também no controle da libertação de aroma e sabores por um período prolongado, assim como a obtenção de uma cor homogênea do produto (SAUVANT et al., 2012).

No caso de microcápsulas a serem incorporadas a uma matriz alimentícia, deve-se levar em conta que mesmo o material encapsulado pode passar por alterações durante algum processo industrial (alta pressão, oscilações de temperatura, tensão de cisalhamento, entre outras). Por isso existe a necessidade de se testar a estabilidade do encapsulado (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010).

Os tipos de microencapsulação de compostos bioativos de natureza lipossolúvel podem ser divididos em dois grupos. Os físico-químicos (emulsificação, coacervação, lipossomas, encapsulação em polímeros, entre outros) onde alguns destes métodos requerem solventes orgânicos, o que pode levar a problemas de compatibilidade dependendo da função prevista para o composto. E existem também os métodos mecânicos (atomização, liofilização, extrusão, entre outros), os quais exibem como principais vantagens a possibilidade de grande quantidade produzida e partículas com vida útil estendidas (GONNET; LETHUAUT; BOURY, 2010; VOS et al., 2010).

Drusch (2007) estudou o processo de microencapsulação por atomização de óleo de peixe rico em ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa em matriz de pectina de beterraba e de xarope de glicose. Obtendo gotículas de óleo com dimensões inferiores a 2 µm com o atomizador de escala laboratorial. Os parâmetros físico-químicos analisados, como a morfologia das partículas, tamanho de partícula e gordura extraível acusaram uma boa eficiência da encapsulação e, portanto, uma boa estabilidade oxidativa do composto.

Trabalhando com a seleção de sistemas para microencapsular licopeno, Guo et al. (2014) estudaram diferentes tipos de solventes como acetato de etila, acetona e éter de petróleo, tensoativos como Tween-80, alginato de sódio, álcool polivinílico, lecitina, gelatina e goma arábica e materiais veiculares como ácido esteárico, monoestearato de glicerina e ácido palmítico. O estudo apresentou uma nova forma de preparação de microcápsulas de licopeno com emulsificação ultrassônica, obtendo nano e microcápsulas estáveis.



Conforme a natureza do processo de microencapsulação os métodos podem ser divididos em 3 grupos: métodos físicos, métodos químicos e métodos físico-químicos. A técnica de atomização ou spray drying e liofilização está descrita dentro dos métodos físicos. Para os métodos químicos destacam-se as técnicas mais comumente utilizadas são a de emulsão ou polimerização interfacial, inclusão molecular e co-cristalização. As técnicas de coacervação, gelificação iônica, extrusão e inclusão em lipossomas fazem parte do grupo de métodos físico-químicos (BRINQUES, 2009; HUERTAS, 2010; RUIZ-MARTINEZ et al., 2009).

#### **3.4.1 Microencapsulação por liofilização**

A liofilização é uma técnica que visa à secagem de um material de interesse, através da evaporação da água livre do estado sólido, sem passar pelo estado líquido, através de sublimação de produtos previamente congelados. O processo pode ser dividido nas etapas de congelamento do alimento/composto, a remoção da água e a secagem do alimento (COSTA, 2007; FELLOWS, 2006).

Uma etapa adicional para a microencapsulação que antecede o congelamento é necessária, a qual consiste na homogeneização do composto a ser encapsulado com a solução contendo o agente encapsulante. A liofilização destaca-se entre as demais técnicas pela aplicação de baixas temperaturas, o que propicia a preservação do núcleo, assim como confere menores riscos de alterações de compostos instáveis à ação de temperaturas mais elevadas (AZEREDO, 2005; RUTZ, 2013).

#### **3.4.2 Microencapsulação por atomização**

O processo de microencapsulação por atomização ou secagem por aspersão é um dos métodos mais antigos de encapsulação, envolvendo as etapas de preparação da dispersão ou solução, homogeneização e atomização propriamente dita. Esta técnica consiste em atomizar o material que se encontra em estado líquido, seja como dispersão ou solução, formando pequenas gotas sobre uma corrente de ar quente. Ao ocorrer o contato das gotas com o ar aquecido, a elevada temperatura promove uma rápida evaporação do solvente, formando uma fina película do material de recobrimento em torno do material a ser encapsulado. O produto resultante encontra-se na forma de um pó fino, com partículas geralmente menores que 100  $\mu\text{m}$  (HUERTAS, 2010; PARIZE et al., 2008; RUIZ-MARTINEZ et al., 2009).

Este método é o mais utilizado na indústria de alimentos para a encapsulação de aditivos e ingredientes como vitaminas (C e E), ácido fólico, aromas, orégano, citronela, bactérias probióticas, lipídeos, ácido linoléico, óleos vegetais; minerais como o ferro; pigmentos como antocianinas e leite, entre outros, e apresenta um custo relativamente baixo. 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 (WANDREY et al., 2010).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MICRO-ORGANISMOS

Para este trabalho foram utilizadas duas cepas distintas de leveduras: *Sporidiobolus pararoseus* isolada de cascas de árvores, coletadas na cidade de Caçapava do Sul, e *Rhodotorula mucilaginosa*, isolada de amostras de flores obtidas na cidade de Encruzilhada do Sul, ambas isoladas por Otero (2011). As leveduras foram mantidas em ágar inclinado extrato de malte e levedura (YM) com modificações composto (m/v) por glicose 1,0%, extrato de malte 0,3%, extrato de levedura 0,3%, peptona 0,5% e ágar 2,0% adicionado de KNO<sub>3</sub> 0,02% (PARAJÓ; SANTOS; VÁZQUEZ, 1998), sendo armazenadas a 4°C e repicadas a cada três meses para a manutenção das cepas.

### 4.2 PREPARO DO INÓCULO

Para ambas as leveduras antes do preparo do inóculo foi realizada a reativação do micro-organismo também em meio ágar YM modificado, sendo incubados em estufa bacteriológica por 48 h a 25°C. Após foi realizada a ressuspensão celular em 1 mL de água peptonada (0,1%) e adicionada em 9 mL de meio YM, incubando-se nas mesmas condições descritas anteriormente.

O inóculo foi obtido utilizando frascos agitados de 500 mL contendo 90 mL de caldo YM modificado, adicionado de 10 mL do cultivo oriundo da reativação, sendo incubado a 150 rpm, 25°C por 48 h, até a concentração celular atingir  $1 \times 10^8$  células mL<sup>-1</sup>, contadas através de câmara de Neubauer (SILVA, 2010).

### 4.3 CULTIVOS EM FRASCOS AGITADOS

O cultivo de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa* foi realizado em frascos Erlenmeyers de 500 mL com 225 mL do meio YM, com pH inicial ajustado para 6,0; acrescidos de 10% de inóculo (v/v), e as condições operacionais do processo utilizadas foram 25°C, 180 rpm, 168 h (SILVA, 2009). Ao término do cultivo foram determinados pH, teor de carotenoides totais, açúcares e concentração de biomassa.

As biomassas obtidas ao final do cultivo passaram por secagem em estufa a 35°C durante 48 h, após, foram maceradas em gral e pistilo e os tamanhos das partículas padronizados através de peneira de Tyler 115 mesh, onde o tamanho de fração passante corresponde a 125 µm (CIPOLATTI, 2012).

#### 4.4 EXTRAÇÃO E RECUPERAÇÃO DOS CAROTENOIDES

##### 4.4.1 Extração de carotenoides ao longo do cultivo

A produção de carotenoides ao longo do cultivo foi acompanhada através da recuperação (extração) dos pigmentos com ruptura celular química usando dimetilsulfóxido (DMSO). Para a ruptura celular utilizou 0,05 g de biomassa seca (48 h a 35°C) e congelada (-18°C por 48 h), com 2 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) previamente aquecido a 55°C, homogeneizadas em vórtex com intervalos de 15 min, durante 1 h (FONSECA et al., 2011).

##### 4.4.2 Extração de carotenoides para obtenção de cápsulas

A recuperação dos pigmentos para o processo de encapsulamento ocorreu pelo método de ondas ultrassônicas, selecionado por Lopes (2014), com modificações para os dois micro-organismos. Em tubos de ensaio com proteção contra luz, foram adicionados 6 mL de acetona juntamente com 0,05 g de biomassa submetidos a ciclos ultrassônicos de 40 kHz por 10 min, sendo a água do banho trocada a cada ciclo (MEDEIROS et al., 2008). Ao procedimento foi adicionada uma etapa extra onde os frascos foram agitados em vórtex por 1 min antes do início do próximo ciclo. A influência do número de ciclos no ultrassom (1 a 6 ciclos) na recuperação dos carotenoides foi realizada para cada extrato microbiano, visando aumentar a recuperação de carotenoides totais.

##### 4.4.3 Recuperação dos carotenoides para acompanhamento do cultivo e para obtenção de capsulas

Após o procedimento de ruptura, as amostras contendo acetona foram centrifugadas ( $1745 \times g$  por 10 min) e o sobrenadante reservado em frascos âmbar até o momento da extração dos carotenoides. Nas fases solventes, obtidas da centrifugação, foram adicionados 10 mL de solução de NaCl 20% (m/v) e 10 mL de éter de petróleo, ocorrendo a formação de duas fases, onde somente a fase polar foi coletada e o excesso de água retirado por filtração com sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), originando os extratos carotenogênicos (MICHELON et al., 2012).

Para a determinação da concentração específica de carotenoides totais (CT) foi realizada a leitura dos extratos em espectrofotômetro no valor médio da máxima absorvância a 448 nm (CABRAL et al., 2011; CIPOLATTI, 2012), empregando a Equação 1 (DAVIES,

1976), expresso por  $\beta$ -caroteno (carotenoide majoritário) em éter de petróleo (absortividade específica  $Ae = 2592$ ).

$$CT = \frac{A \cdot V \cdot 10^6}{Ae \cdot 100 \cdot m_{am}} \quad (1)$$

Onde  $CT$  é concentração específica de carotenoides de totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ),  $A$  é a absorvância,  $V$  é volume de filtrado (mL),  $m_{am}$  é a massa celular seca (g) e  $Ae$  é absortividade específica. Para o cálculo da produção volumétrica de carotenoides totais ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) foi feita a conversão de unidades utilizando o resultado de concentração de carotenoides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) e da concentração da biomassa ( $\text{g L}^{-1}$ ).

#### 4.5 DETERMINAÇÕES ANALÍTICAS

##### 4.5.1 Determinação de pH

A determinação do pH foi realizada através da leitura da amostra em potenciômetro, segundo AOAC (2000).

##### 4.5.2 Determinação da concentração de biomassa

A concentração celular foi estimada por leitura da absorvância a 600 nm, utilizando curvas padrão de biomassa, previamente construída para cada levedura (KUSDIYANTINI et al., 1998).

#### 4.6 TESTES DE ESTABILIDADE

##### 4.6.1 Estabilidade à luz

Os extratos não encapsulados obtidos dos cultivos submersos, foram acondicionados em frascos de vidro em triplicata, 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. Realizou-se o teste de estabilidade à luz por um período de 28 dias, na temperatura de 25°C, onde foram efetuados testes no tempo inicial e a cada período de 24 h (durante 7 dias), após foram realizados a cada 168 h, sendo avaliado o total de carotenoides por espectrofotometria a 448 nm (MATIOLI; RODRIGUEZ-AMAYA, 2002).

#### 4.6.2 Estabilidade à temperatura

Para o acompanhamento da estabilidade à temperatura, os extratos não encapsulados em triplicata, foram acondicionados em frascos de vidro na ausência de luz, em estufa refrigerada a 4°C com umidade relativa de aproximadamente 50%. O teste de estabilidade foi realizado durante 28 dias, foram realizados testes no tempo inicial e a cada período de 24 h (durante 7 dias), após foram realizados a cada 168 h, onde foi avaliado o total de carotenoides (QV; ZENG; JIANG, 2011; SANSONE et al., 2011).

### 4.7 MICROENCAPSULAÇÃO DOS CAROTENOIDES

#### 4.7.1 Método de liofilização

A microencapsulação dos extratos contendo os carotenoides foi realizada utilizando como material de parede goma xantana, goma arábica, alginato de sódio e proteína de soja, de acordo com o método descrito por Laine et al. (2008) e Pralhad e Rajendrakumar (2004). O extrato passou por uma etapa de rotaevaporação onde ocorreu a retirada do solvente éter de petróleo. Para a elaboração das micropartículas, primeiramente, foi realizada a dissolução em água destilada com o auxílio de agitador magnético durante 1 min, seguidos da adição dos carotenoides na proporção 1:1 (carotenoides: revestimento) dos materiais de parede, seguidos pelos carotenoides, na proporção 1:1 em relação ao teor de sólidos. A mistura foi homogeneizada por 1 h com auxílio de agitador magnético, sendo, posteriormente submetida a congelamento em ultrafreezer (-80°C por 48 h), seguido pelo processo de liofilização por mais 48 h.

#### 4.7.2 Atomização

Neste método, os carotenoides foram encapsulados utilizando os mesmos materiais de revestimento descritos no Item 4.6.1. Os materiais de parede foram dissolvidos em água destilada com o auxílio de agitador magnético durante 1 min, seguidos da adição dos carotenoides na proporção 1:1 (carotenoides: revestimento). A emulsão foi então submetida à secagem por atomização *mini-spray dryer* MDS 0.5, com temperatura de entrada de 100°C, vazão máxima da bomba peristáltica de 0,15 L h<sup>-1</sup> e vazão de ar comprimido de 1,65 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>, seguindo a metodologia proposta por Rascón et al. (2011).

## 4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCAPSULAS

### 4.8.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A verificação da formação das microcápsulas, bem como a análise morfológica e o tamanho das partículas formadas foram realizadas através de um microscópio eletrônico de varredura (MEV). As amostras foram fixadas em um suporte metálico com auxílio de uma fita dupla-face de carbono previamente recobertas com uma fina camada de ouro. A visualização foi realizada em aumentos de 50, 200 e 600 vezes (CASTRO, 2002). Para o cálculo do tamanho das partículas foi utilizado o programa *SigmaScan Pro 5.0*.

### 4.8.2 Eficiência da encapsulação

Para a quantificação dos carotenoides presentes na superfície das micropartículas, 0,1 g de amostra e 5 mL de hexano foram misturados e levados a um agitador vortex por 10 s, seguidos de centrifugação a  $3420 \times g$  durante 10 min, coletando-se o sobrenadante. Para a quantificação do total de carotenoides presentes, dentro e fora das micropartículas, foi realizada a dispersão das micropartículas em 5 mL de hexano, agitando-se vigorosamente para a remoção do total de carotenoides e filtrando-se com algodão para um balão de 10 mL, lavando-se o resíduo com hexano. Ambas as frações recolhidas foram então avaliadas por espectrofotometria quanto ao teor total de carotenoides. O resultado sendo expresso em percentual de carotenoides encapsulados (%EE), com o cálculo realizado através da Equação 2 (SUTTER; BUERA; ELIZALDE, 2007).

$$\%EE = \frac{\text{total de carotenoides} - \text{carotenoides da superfície}}{\text{total de carotenoides}} \times 100 \quad (2)$$

### 4.8.3 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

A análise de calorimetria diferencial de varredura das microcápsulas foi realizada em equipamento SHIMADZU modelo DSC-60. Aproximadamente 3 mg de cada amostra foram aquecidos em recipientes de alumínio a uma taxa de  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  entre 25 e  $280^{\circ}\text{C}$ , com um fluxo de nitrogênio de  $40 \text{ mL min}^{-1}$ .

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos realizados com no mínimo três tratamentos distintos, foram feitos em triplicata e os resultados avaliados estatisticamente através da análise de variância e quando detectadas diferenças ao nível de 10% ( $p < 0,10$ ) ou 5% ( $p < 0,05$ ) de significância, foram seguidos por teste de Tukey. O *software Statistica 5.0* foi utilizado para as análises estatísticas.

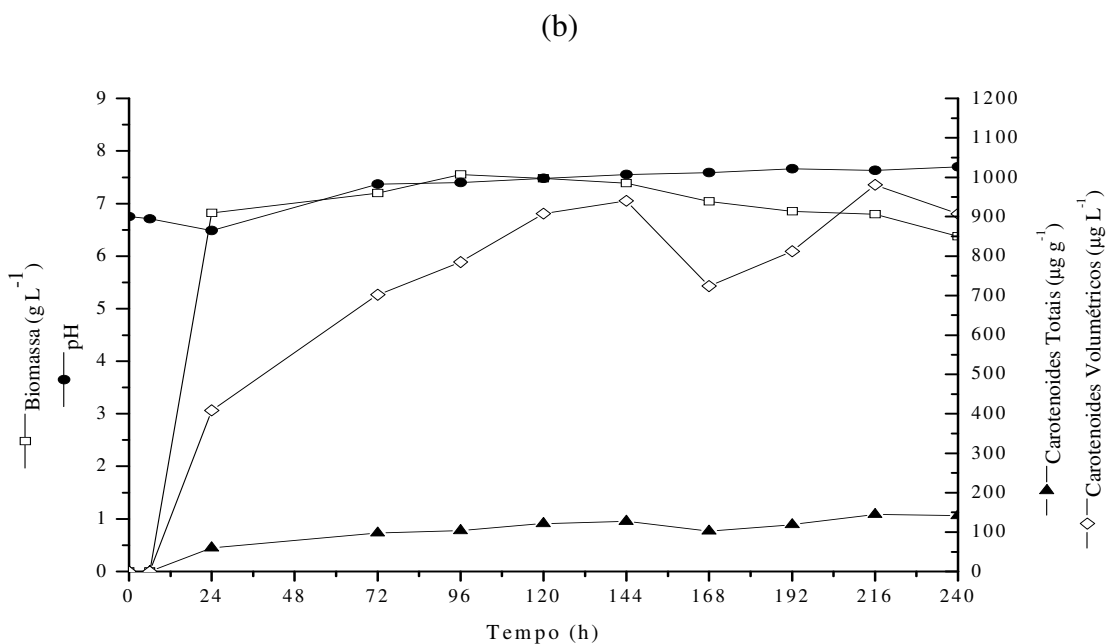
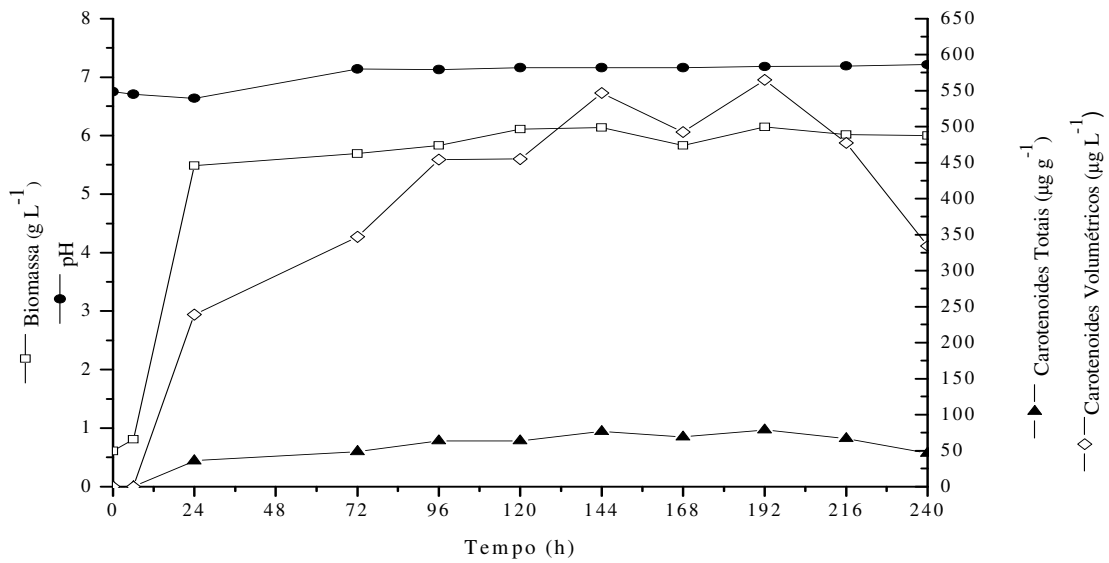


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CULTIVOS SUBMERSOS PARA A PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES

O acompanhamento cinético do crescimento celular, da produção específica e volumétrica de carotenoides totais e o pH nos cultivos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginoso* em meio YM a 25°C, 180 rpm, por 240 h pode ser verificado na Figura 3.

**Figura 3** - Cinética para produção de carotenoides totais da *S. pararoseus* (a) e *R. mucilaginoso* (b) em frascos agitados, meio YM, a 25°C e 180 rpm.



Para *S. pararoseus* (Figura 3a) a maior concentração de biomassa alcançada foi de 6,15 g L<sup>-1</sup> em 192 h, enquanto que o pH inicialmente de 6,8 apontou uma queda nas primeiras 24 h e chegou a 7,2 ao fim das 240 h. A produção de carotenoides também apresentou seu máximo em 192 h com 564,96 µg L<sup>-1</sup> (78,63 µg g<sup>-1</sup>). *R. mucilaginoso* (Figura 3b) demonstrou maior produção de células em 48 h com 7,32 g L<sup>-1</sup> e o pH que no início do cultivo foi de 6,8 também demonstrou queda até 24 h, chegando a 7,7 no final do processo. Quanto à produção de carotenoides foi obtido o máximo em 216 h com 981,12 µg L<sup>-1</sup> (144,5 µg g<sup>-1</sup>), alcançando neste tempo de processo 6,82 g L<sup>-1</sup> de crescimento celular.

Nas mesmas condições de cultivo com o meio YM a 25°C, 180 rpm em 168 h e utilizando também o método químico por DMSO para ruptura celular, resultados superiores foram obtidos por Otero (2011), para produção de biomassa (7,32 g L<sup>-1</sup>) e carotenoides pela mesma cepa de *S. pararoseus* com 905 µg L<sup>-1</sup> (123,64 µg g<sup>-1</sup>). A concentração celular obtida para a *R. mucilaginoso* foi de 11,18 g L<sup>-1</sup> e a produção de carotenoides de 310 µg L<sup>-1</sup> (28,06 µg g<sup>-1</sup>). Sendo o comportamento do pH similar ao deste trabalho para os dois microorganismos. Porém, apesar do menor crescimento celular alcançados neste trabalho, resultados superiores na produção carotenogênica foram observados para *R. mucilaginoso*.

No entanto, maiores produções de carotenoides foram alcançadas neste trabalho frente ao verificado por Lopes (2014), nas mesmas condições de produção e recuperação dos biocompostos. Este autor para *S. pararoseus* observou o máximo de crescimento celular em 144 h de cultivo alcançando 7,34 g L<sup>-1</sup> e ao final do cultivo (168 h) a produção de carotenoides totais resultou em um máximo de 458,5 µg L<sup>-1</sup> (75,4 µg g<sup>-1</sup>). Enquanto que para *R. mucilaginoso* após as 168 h de cultivo a produção de biomassa foi de 4,24 g L<sup>-1</sup>, e a produção máxima de carotenoides de 386,5 µg L<sup>-1</sup> (91,1 µg g<sup>-1</sup>).

Os extratos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginoso* obtidos no trabalho de Cipolatti (2012) apresentam perfis carotenogênicos diferentes, quando obtidos a partir do cultivo com o meio YM, a 25°C e 180 rpm por 168 h. O perfil de carotenoides de *R. mucilaginoso* apresentou β-caroteno, astaxantina e luteína, enquanto que *S. pararoseus* apenas β-caroteno e luteína. Resultados condizentes com as atividades antioxidantes demonstradas por estas leveduras, em que a *R. mucilaginoso*, em função da presença da astaxantina, mostrou-se ligeiramente superior. Porém, este comportamento de associação com a atividade antioxidante não foi observado neste trabalho, em virtude da alteração nos tempos dos cultivos de produção, o que provavelmente alterou o perfil de carotenoides de cada levedura.

Neste trabalho o tempo de produção carotenogênica foi ampliado para 240 h comparativamente a estudos anteriores (OTERO, 2011; LOPES, 2014), que tinham sido

acompanhados por apenas 168 h, em função de que havia indícios de que a produção do carotenoide poderia ser incrementada em um tempo maior de processo. Assim, após os cultivos de produção realizados (Figura 3a e Figura 3b), pode-se perceber que o tempo de cultivo foi aumentado de 168 h para 192 h e 216 h para *S. pararoseus* e *R. mucilaginoso*, respectivamente. Esta modificação no tempo de processo nos cultivos microbianos, levou a um incremento na produção de carotenoides de aproximadamente 14% para *S. pararoseus* e 30% para *R. mucilaginoso*.

## 5.2 INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CICLOS ULTRASSÔNICOS NA RECUPERAÇÃO DE CAROTENOIDES TOTAIS

O método mais simples e comumente utilizado, em escala laboratorial, para ruptura celular e estimativa da concentração de carotenoides microbianos é o método químico por DMSO (MICHELON, 2012). Porém, a toxicidade do composto limita a aplicação dos extratos em segmentos alimentícios. Assim, neste trabalho foi realizada a extração assistida por ondas ultrassônicas, visando a busca para melhorar o processo, a partir do estudo da variação do número de ciclos de extração assistida por ultrassom, que originalmente eram 4 ciclos de acordo com a técnica descrita por Lopes (2014) para *S. pararoseus* e *R. mucilaginoso*.

Na Tabela 1 está apresentado a recuperação de carotenoides para *S. pararoseus* e *R. mucilaginoso* para até 6 ciclos sequenciais de ondas ultrassônicas.

**Tabela 1** - Influência do número de ciclos ultrassônicos na recuperação de carotenoides totais nos extratos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginoso*.

Número de ciclos	Carotenoides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	
	<i>S. pararoseus</i>	<i>R. mucilaginoso</i>
1	$7,22 \pm 0,88^c$	$47,16 \pm 0,88^b$
2	$8,67 \pm 1,31^{bc}$	$50,41 \pm 1,31^b$
3	$9,57 \pm 1,29^{abc}$	$62,28 \pm 1,29^a$
4	$11,06 \pm 2,42^a$	$53,80 \pm 2,42^{ab}$
5	$9,43 \pm 1,25^{abc}$	$44,11 \pm 1,25^b$
6	$9,94 \pm 0,66^{ab}$	$40,21 \pm 0,66^b$

Valor médio  $\pm$ desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa entre os ciclos no banho ultrassônico pelo Teste de Tukey ( $p < 0,10$ ).

A máxima recuperação ocorreu com o emprego de 4 ciclos ultrassônicos para a *S. pararoseus*, utilizado por Lopes (2014). Porém, este valor é estatisticamente ( $p < 0,10$ ) similar ao obtido com a utilização de 3 ciclos de ondas de ultrassom. O mesmo comportamento ocorreu para a *R. mucilaginosa*, onde a máxima recuperação é observada com o emprego de 3 ciclos ultrassônicos. Portanto, para ambas as leveduras foi adotado 3 ciclos de ondas ultrassônicas para a recuperação dos carotenoides, uma vez que isso ocasionaria uma redução no tempo de processo de 1 ciclo (10 min), além de possibilitar uma economia de energia durante o mesmo.

### 5.3 ESTABILIDADE DOS EXTRATOS NÃO ENCAPSULADOS

#### 5.3.1 Estabilidade do extrato não encapsulado a 25°C na ausência e presença de luz para *S. pararoseus*

A Tabela 2 apresenta o acompanhamento da variação no conteúdo de carotenoides totais durante o armazenamento do extrato livre de *S. pararoseus* na ausência e presença de luz a 25°C.

**Tabela 2** – Carotenoides totais durante armazenamento do extrato livre proveniente de *S. pararoseus* (28 dias a 25°C) na ausência e presença de luz.

Dias de armazenamento	Carotenoides totais na ausência de luz ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Carotenoides totais na presença de luz ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
1	67,8 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	88,9 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
2	64,9 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	87,8 $\pm$ 11 <sup>a</sup>
3	67,5 $\pm$ 1,2 <sup>b</sup>	87,3 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>
4	70,2 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	87,2 $\pm$ 1,6 <sup>a</sup>
5	67,9 $\pm$ 4,5 <sup>b</sup>	87,1 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>
6	72 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	86,7 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>
7	67,4 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>	86,4 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
14	64,3 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>	69,8 $\pm$ 2,2 <sup>b</sup>
21	64,2 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	68,8 $\pm$ 2,0 <sup>b</sup>
28	64,7 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	64 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>

Média  $\pm$  desvio padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de carotenoides totais durante o período de armazenamento pelo Teste de Tukey ( $p < 0,10$ ).

O extrato obtido de *S. pararoseus* armazenado em ausência de iluminação apresentou, como pode ser observado na Tabela 2, uma perda média de 4,7% ao final dos 28

dias de armazenamento. Porém, quando em presença de luz, após o mesmo período, a perda média aumentou para 28,0%.

### 5.3.2 Estabilidade do extrato não encapsulado a 25°C na ausência e presença de luz para *R. mucilaginosa*

A mesma técnica foi empregada para avaliar o efeito da exposição à luz nos extratos carotenogênicos obtidos de *R. mucilaginosa*, conforme está apresentado na Tabela 3.

**Tabela 3** – Carotenoides totais durante armazenamento do extrato não encapsulado proveniente de *R. mucilaginosa* (28 dias a 25°C) na ausência e presença de luz.

Dias de armazenamento	Carotenoides totais na ausência de luz ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Carotenoides totais na presença de luz ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
1	143,2 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	145,2 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
2	141,2 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	143,4 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
3	139,9 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	143,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
4	142,2 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>	142,7 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
5	139,6 $\pm$ 1,7 <sup>a</sup>	142,2 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>
6	136,6 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	140,2 $\pm$ 3,1 <sup>a</sup>
7	135,0 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	140,2 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
14	121,0 $\pm$ 3,1 <sup>b</sup>	110,0 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>
21	121,3 $\pm$ 1,7 <sup>b</sup>	106,8 $\pm$ 1,9 <sup>b</sup>
28	103,4 $\pm$ 5,2 <sup>c</sup>	94 $\pm$ 2,8 <sup>c</sup>

Média  $\pm$  desvio padrão (n=3); Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de carotenoides totais durante o período de armazenamento pelo Teste de Tukey ( $p < 0,10$ ).

Ao final dos 28 dias de acompanhamento, o extrato não encapsulado livre de *R. mucilaginosa* armazenado em ausência de luz apresentou uma perda média de 28,0% no conteúdo de carotenoides totais. Já em presença de luz, o extrato sofreu redução média de 35,3% no conteúdo carotenogênico. Assim, os tratamentos com e sem exposição à luz, se mostraram diferentes, apontando que o armazenamento no escuro foi o mais eficiente para conservação dos extratos.

As perdas de carotenoides totais observadas durante os 28 dias de armazenagem, sob as mesmas condições foram superiores para os extratos de *R. mucilaginosa* se comparado aos extratos de *S. pararoseus*

Sachindra e Mahendrakar (2010) em seu trabalho averiguaram a estabilidade de carotenoides recuperados de resíduos de camarão, onde o contato com a luz foi um dos

principais fatores responsáveis pela degradação destes biocompostos. Comportamento similar foi observado neste trabalho para os extratos microbianos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, onde a presença da luz estimulou uma maior degradação.

De um modo generalizado, a degradação dos carotenoides segue a mesma rota pela qual ocorre a oxidação lipídica, assim sendo, sem o uso de antioxidantes ou de um material de proteção, o extrato fica suscetível a perdas consideráveis (CERÓN-GARCIA et al., 2010). Porém, os carotenoides apresentam capacidade antioxidante, indicando a tendência a serem degradados por radicais livres, e a susceptibilidade a degradação está ligada a alguns fatores principais como tipo de carotenoide presente no extrato e condições de armazenamento (CERÓN-GARCIA et al., 2010).

### **5.3.3 Estabilidade do extrato não encapsulado a 4°C na ausência de luz para *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa***

Para avaliar a estabilidade a 4°C, em virtude da degradação dos extratos na presença de luz ter sido superior, foi realizado o acompanhamento dos carotenoides totais apenas na ausência de luz. A Tabela 4 apresenta o acompanhamento da variação no conteúdo de carotenoides totais durante o armazenamento do extrato livre de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa* na ausência de luz a 4°C.

O extrato obtido de *S. pararoseus* armazenado em ausência de iluminação apresentou, como pode ser observado na Tabela 4, uma perda média de 29,8% ao final dos 28 dias de armazenamento. O extrato obtido da levedura *R. mucilaginosa*, na ausência de luz, após o mesmo período, apresentou uma perda média similar de 31,3%. Portanto, é possível afirmar que a refrigeração após o período estudado, acelerou o processo de degradação na ausência de luz para ambos os extratos microbianos.

Corroborando ao obtido neste estudo, Oliveira et al. (2011), através da quantificação de astaxantina e  $\beta$ -caroteno em amostras de salmão armazenados sob refrigeração (6°C), demonstraram que a aplicação do frio não representa uma alternativa favorável para a manutenção de carotenoides, uma vez que com apenas 3 dias de armazenamento foi verificado a perda de 19,8% de astaxantina e aproximadamente 17% de  $\beta$ -caroteno.

Portanto, uma das alternativas para o aumento da estabilidade destes biocompostos, é a encapsulação dos extratos utilizando diferentes materiais de revestimento, o que pode possibilitar futuramente a aplicação em diferentes produtos alimentícios ou de outras áreas.

**Tabela 4** – Carotenoides totais durante armazenamento do extrato livre proveniente de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa* (28 dias a 4°C) na ausência de luz.

Dias de armazenamento	<i>S. pararoseus</i>	<i>R. mucilaginosa</i>
	Carotenoides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	Carotenoides totais ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
1	68,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	116,9 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
2	67,0 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	114,1 $\pm$ 0,9 <sup>a</sup>
3	66,9 $\pm$ 1,0 <sup>a</sup>	113,1 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
4	66,6 $\pm$ 1,2 <sup>a</sup>	113,8 $\pm$ 2,0 <sup>a</sup>
5	65,6 $\pm$ 4,4 <sup>a</sup>	112,7 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>
14	61,8 $\pm$ 1,4 <sup>ab</sup>	97,2 $\pm$ 3,7 <sup>b</sup>
21	54,8 $\pm$ 2,9 <sup>bc</sup>	95,8 $\pm$ 2,3 <sup>b</sup>
28	47,7 $\pm$ 1,4 <sup>c</sup>	80,3 $\pm$ 1,1 <sup>c</sup>

Média  $\pm$  desvio padrão (n=3); Letras minúsculas diferentes na coluna indicam diferença significativa de carotenoides totais durante o período de armazenamento pelo Teste de Tukey (p<0,05).

#### 5.4 MICROENCAPSULAÇÃO DOS EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS DE *S. pararoseus* E *R. mucilaginosa* UTILIZANDO O MÉTODO DE LIOFILIZAÇÃO

##### 5.4.1. Eficiência de encapsulação dos extratos carotenogênicos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*

A eficiência da encapsulação a partir do processo de liofilização utilizando os materiais de cobertura, goma xantana, goma arábica, alginato de sódio e proteína de soja na proporção 1:1 (carotenoides: agente encapsulante) estão apresentados na Tabela 5, para ambos micro-organismos.

Os quatro materiais de parede avaliados foram capazes de solubilizar e encapsular o extrato carotenogênico obtido a partir da levedura *S. pararoseus*, com eficiência de encapsulação variando de 68, a 91%. Enquanto que para o extrato carotenogênico obtido da *R. mucilaginosa* essa eficiência de encapsulação foi ligeiramente superior, de 73, a 93%, porém a goma xantana não foi capaz de se solubilizar com este extrato livre.

As menores eficiências de encapsulamento foram encontrados para proteína de soja, para ambos os extratos. Provavelmente, isso se deve a quantidade de material carotenogênico que não se desprende da parede do balão volumétrico onde estavam os materiais sob agitação, indicando que o encapsulante não conseguiu se solubilizar totalmente, sendo necessários mais estudos e adaptações quanto a proporção utilizada (carotenoides: agente encapsulante), e a possibilidade de se adicionar um agente emulsificante à mistura.

Estas soluções também poderiam ser alternativas para o problema de insolubilidade da goma xantana com o extrato de *R. mucilaginosa*.

**Tabela 5** - Eficiência da encapsulação (%) pelo método de liofilização.

Levedura	Agente encapsulante	Eficiência de encapsulação (%)
<i>S. pararoseus</i>	Alginato de sódio (1:1)	87
	Goma Xantana (1:1)	88
	Goma Arábica (1:1)	91
	Proteína de soja (1:1)	68
<i>R. mucilaginosa</i>	Alginato de sódio (1:1)	93
	Goma Xantana (1:1)	ND
	Goma Arábica (1:1)	90
	Proteína de soja (1:1)	73

ND: não foi possível determinar.

Rutz et al. (2013) testaram a eficiência de encapsulação no teor de carotenoides após a microencapsulação por liofilização, do suco de pitanga roxa utilizando como materiais de parede goma xantana, goma tara e um hidrogel formado a partir destas duas gomas. Os melhores resultados foram obtidos com as gomas separadas, cerca de 92,60% para goma tara e 91,50% com a goma xantana, valores similares aos encontrados no presente trabalho quando utilizado goma arábica e xantana.

Ao tentar microencapsular ácido gálico, também pelo método de liofilização, com quitosana,  $\beta$ -ciclodextrina ou goma xantana, Rosa et al. (2013) obtiveram, respectivamente: 91%, 80% e 77% de eficiência na encapsulação. Assim sendo, comparado com estes resultados, o extrato de *S. pararoseus* estudado no presente trabalho foi mais compatível com a goma xantana do que o ácido gálico. O que reforça a afirmação de que a composição do material de revestimento é um dos principais fatores interferentes nas propriedades da cápsula, nesse caso, na capacidade de preservar os carotenoides em seu interior, mantendo a funcionalidade do biocomposto.

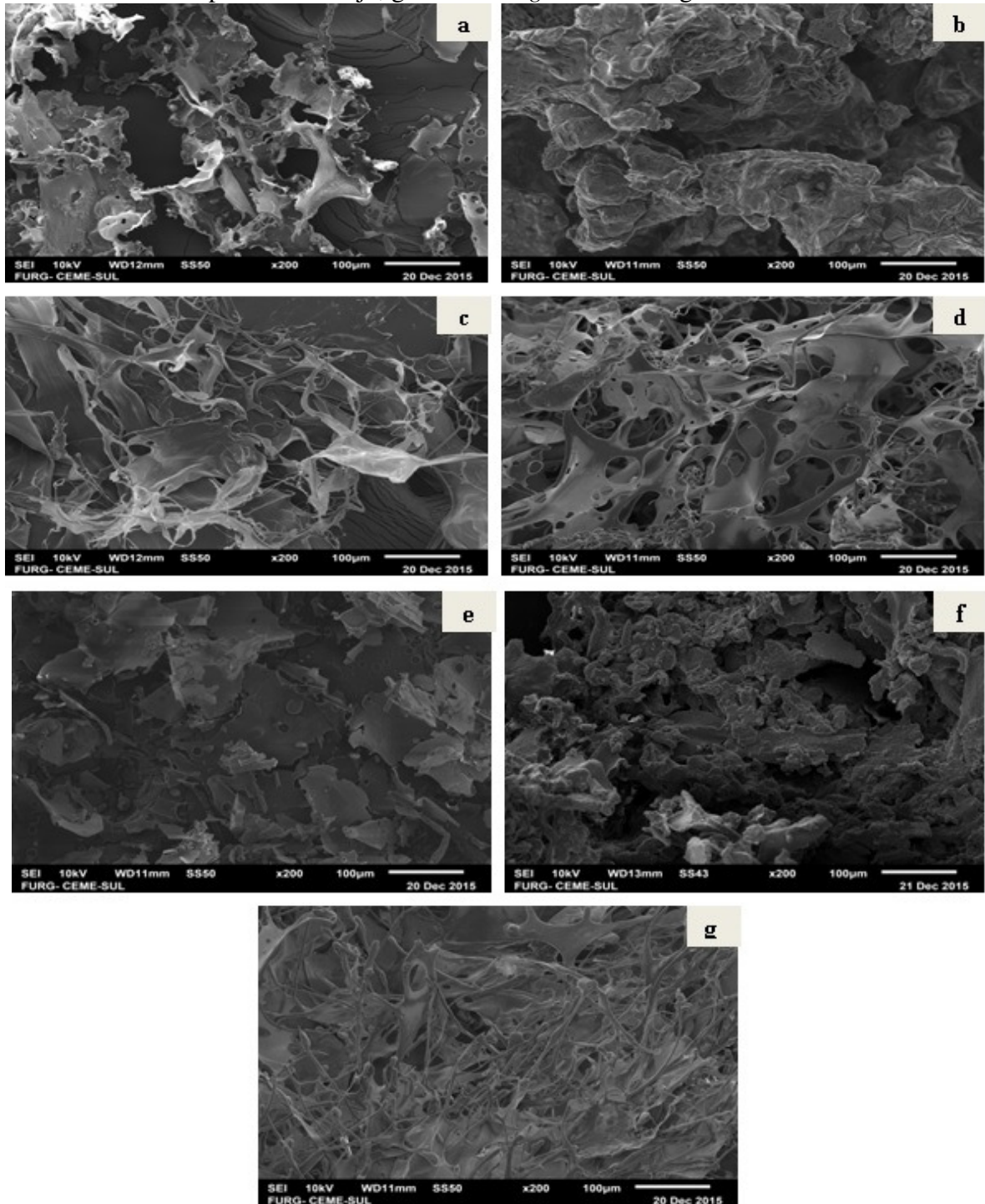
#### 5.4.2. Micrografias eletrônicas de varredura das cápsulas contendo extratos carotenogênicos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*

A caracterização das partículas obtidas com a encapsulação pode ser visualizada através das micrografias eletrônicas de varredura (MEV) para os extratos encapsulados pelo



método de liofilização, que estão apresentadas na Figura 4, onde é possível observar a morfologia externa do material obtido.

**Figura 4** - Micrografias de MEV (x 200) das microcápsulas liofilizadas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura (proporção 1:1): a - *S. pararoseus* com goma arábica; b - *S. pararoseus* com proteína de soja; c - *S. pararoseus* com goma xantana; d - *S. pararoseus* com alginato de sódio; e - *R. mucilaginosa* com goma arábica; f - *R. mucilaginosa* com proteína de soja; g - *R. mucilaginosa* com alginato de sódio.



De modo geral, as micrografias (Figura 4) revelam microestruturas amorfas, como relatadas em outros trabalhos que empregaram a mesma técnica de liofilização para encapsular carotenoides de origem vegetal, compostos fenólicos ou outros compostos sensíveis à altas temperaturas (FANG; BHANDARI, 2010; RUTZ et al.; 2013). Porém, cada material encapsulante apresentou características específicas que permitem analisar melhor o produto da encapsulação.

Na Figura 4 (a) pode-se observar uma estrutura folhosa portando poros com diâmetros entre 1,25 e 17,5  $\mu\text{m}$  para o encapsulado de goma arábica e extrato de *S. pararoseus*. As partes que não contém poros são estiradas, fator provavelmente devido ao processo de liofilização, onde não foi utilizado um componente crioprotetor, ocasionando o rompimento das microcápsulas (TOLEDO, 2015). O mesmo material encapsulante se comportou de forma um pouco diferenciada quando o extrato encapsulado foi de *R. mucilaginosa*, como pode ser visto na Figura 4 (e), onde a estrutura apresentou forma mais compacta, tipo flocos, contendo poros de 1 a 36  $\mu\text{m}$  de diâmetro. Estas foram semelhantes aos encontrados por Laine et al. (2008), que estudaram a microencapsulação de *Rubus chamaemorus* com maltodextrina. Os autores consideraram as estruturas formadas características para materiais obtidos por essa técnica de liofilização.

A Figura 4 (b) e 4 (f), onde o material de parede utilizado foi proteína de soja, fica evidente a menor eficiência do processo de encapsulação, já constatada anteriormente (Tabela 2), uma vez que houve apenas a formação de grumos. Comportamento esse possivelmente devido a baixa solubilidade e a alta capacidade da proteína de soja absorver umidade. Resultado que reforça a necessidade do uso de emulsificantes, assim como materiais crioprotetores. Um tipo semelhante de estrutura grumosa foi observado por Rutz (2013) ao encapsular, também por liofilização, suco de pitanga roxa com um polímero contendo gomas xantana e tara, o autor cita que a obtenção de micropartículas esféricas é dependente das condições do processo e do material de revestimento utilizado.

O extrato livre encapsulado de *S. pararoseus* com goma xantana demonstrou formação de estrutura folhosa, pouco porosa e largura das “folhas” entre 0,75 e 6  $\mu\text{m}$  (Figura 4 (c)). Este tipo de comportamento das partículas foi semelhante ao encontrado por Rosa et al. (2013) ao microencapsular ácido gálico também em goma xantana, que consideraram o comportamento de acordo com o descrito para a técnica.

Para o encapsulado por liofilização de alginato de sódio com extrato de *S. pararoseus*, a estrutura folhosa e tomada de poros pode ser observada na Figura 4 (d). Os diâmetros dos poros variaram de 1,25 a 39,25  $\mu\text{m}$ . Estas formas pouco alongadas e com poros

irregulares também foram descrita por Rutz (2013), mas utilizando como material encapsulante polímero de goma xantana e quitosana. No presente trabalho, o encapsulante alginato de sódio quando utilizado para o extrato de *R. mucilaginosa* se comportou de maneira um pouco diferente, com as estruturas folhosas mais estreitas e alongadas com diâmetros variando de 1,08 a 13,92  $\mu\text{m}$ .

Estudos realizados por Sousdaleff e colaboradores (2013), Zuanon, Malacrida e Telis (2013) e Rutz e colaboradores (2016), que utilizaram o método de liofilização para o encapsulamento de carotenoides, demonstraram a obtenção de partículas não características e a não formação de micropartículas esféricas, sugerindo que, dependendo do material de parede, tais condições não são adequadas para a obtenção de microcápsulas, embora o método seja comumente utilizado.

#### 5.4.3. Termogramas de DSC

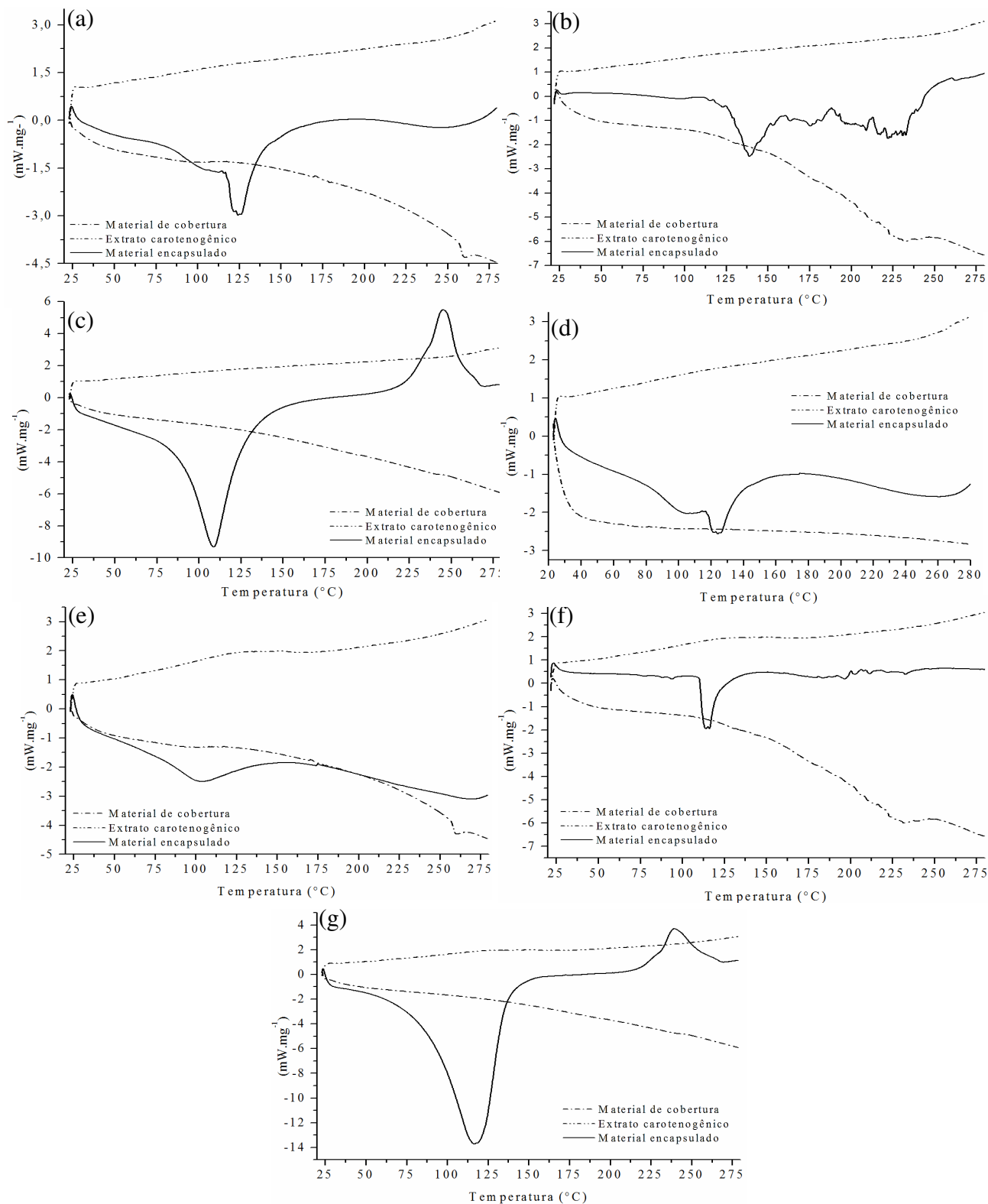
Os termogramas de DSC (Figura 5) demonstram eventos endotérmicos através da representação de curvas para baixo e eventos exotérmicos através de curvas para cima.

A curva para o extrato de *S. pararoseus* encapsulado com goma arábica, Figura 5 (a), apresentou dois picos endotérmicos. O primeiro na região próxima a 100°C, associado à perda de água (ROSA et al., 2013). Como o mesmo pico não foi observado nas outras duas curvas, provavelmente indicou que a amostra absorveu umidade após o processo de liofilização. O segundo pico presente no termograma se encontra na região entre 120,4 e 126,7°C e também não consta nas curvas do extrato livre ou goma arábica, indicando que houve interação entre os materiais quando encapsulados. Picos semelhantes foram encontrados para o mesmo extrato quando encapsulado com goma xantana, como mostra a Figura 5 (d).

Goma arábica também foi utilizada para encapsular extrato carotenogênicos de *R. mucilaginosa* e o termograma é apresentado na Figura 5 (e). Assim como para o extrato encapsulado de *S. pararoseus*, ocorreu um pico na região próxima a 100°C (perda de água) e a suave ondulação exotérmica que se inicia próxima aos 180°C e se estende até 270°C indica o ponto de fusão além de degradação do material (SOUSDALEFF et al., 2013).

O termograma para o extrato livre de *S. pararoseus* encapsulado com proteína de soja é apresentado na Figura 5 (b) e o material liofilizado mostrou apenas um pico endotérmico definido próximo a 138°C, seguido de uma sequência de pequenos picos caracterizados como “ruídos”, provavelmente causados pela alta umidade e baixa estabilidade do material, características já constatadas em análises anteriores.

**Figura 5** - Termogramas de DSC das microcápsulas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura (proporção 1:1): a - *S. pararoseus* com goma arábica, b - *S. pararoseus* proteína de soja, c - *S. pararoseus* e alginato de sódio, d - *S. pararoseus* e goma xantana, e - *R. mucilaginosa* com goma arábica, f - *R. mucilaginosa* com proteína de soja, g - *R. mucilaginosa* com alginato de sódio.



Para o extrato de *R. mucilaginosa* encapsulado também com proteína de soja, Figura 5 (f), o pico mais acentuado ocorreu próximo a 113°C (perda de água) e a suave ondulação (mudança da linha base e sem picos) que se inicia próxima aos 180°C e se estende até 270°C indica o ponto de fusão (BERNAL et al., 2002) além de degradação do material (SOUSDALEFF et al., 2013), semelhante ao observado para o mesmo extrato encapsulado com goma arábica.

Os termogramas do material de parede alginato de sódio para os extratos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, podem ser observados na Figura 5 (c) e (g), respectivamente. Ambos os materiais encapsulados demonstraram pico endotérmico característico de perda de água na região próxima a 100°C e um segundo, porém exotérmico, na faixa entre 240 e 245°C, o que segundo Sousedaleff et al. (2013), provavelmente registra a decomposição térmica dos materiais encapsulados.

## 5.5 MICROENCAPSULAÇÃO DOS EXTRATOS CAROTENOGÊNICOS DE *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa* UTILIZANDO O MÉTODO DE ATOMIZAÇÃO

### 5.5.1. Micrografias eletrônicas de varredura das cápsulas contendo extratos carotenogênicos de *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*

Dentre os métodos de encapsulação a atomização é um dos mais utilizados pela indústria de alimentos para ingredientes lipofílicos de caráter funcional, pois é muito versátil e, em geral, de menor custo. Também permite o uso de diversos tipos de materiais de parede, dependendo do que se deseja encapsular, sendo carboidratos e proteínas os mais comumente empregados (AZEREDO, 2005; DRUSCH, 2006; MONTERO et al., 2016).

Quando se pensa em partículas sólidas que em algum momento poderão vir a ser aplicadas em um produto, como as micropartículas estudadas nesse trabalho, a morfologia do material obtido é uma das propriedades físicas mais importantes. Isto, pois influencia diretamente no aspecto sensorial do produto final (SOUSDALEFF et al., 2012).

A caracterização das partículas obtidas com a encapsulação em atomizador pode ser visualizada através das micrografias eletrônicas de varredura (MEV) para os extratos encapsulados pelo método de atomização, que estão apresentadas na Figura 6, onde é possível observar a morfologia externa do material obtido.

Nesta etapa a goma xantana além de não se solubilizar com o extrato de *Rhodotorula mucilaginosa*, também apresentou falhas durante o processo de atomização devido a viscosidade do material não ser compatível com as condições operacionais

selecionadas do atomizador. Fato que evidencia a necessidade de se explorar a variação da concentração não só deste, mas também dos outros agentes encapsulantes aqui estudados. O que seria também uma alternativa para a dificuldade de solubilização da goma com o extrato de *R. mucilaginoso*, além dos já citados anteriormente.

Azeredo (2005), em sua revisão sobre os métodos de encapsulação aplicados à tecnologia de alimentos, cita que quanto maior for o teor de sólidos da solução a ser atomizada, menor será o intervalo de tempo para a formação das cápsulas. O autor também explica que fatores como viscosidade da emulsão, massa molecular, concentração dos compostos, velocidade e temperatura do ar de secagem, além do tamanho das gotículas atomizadas, afetam diretamente na capacidade de retenção do conteúdo a ser encapsulado.

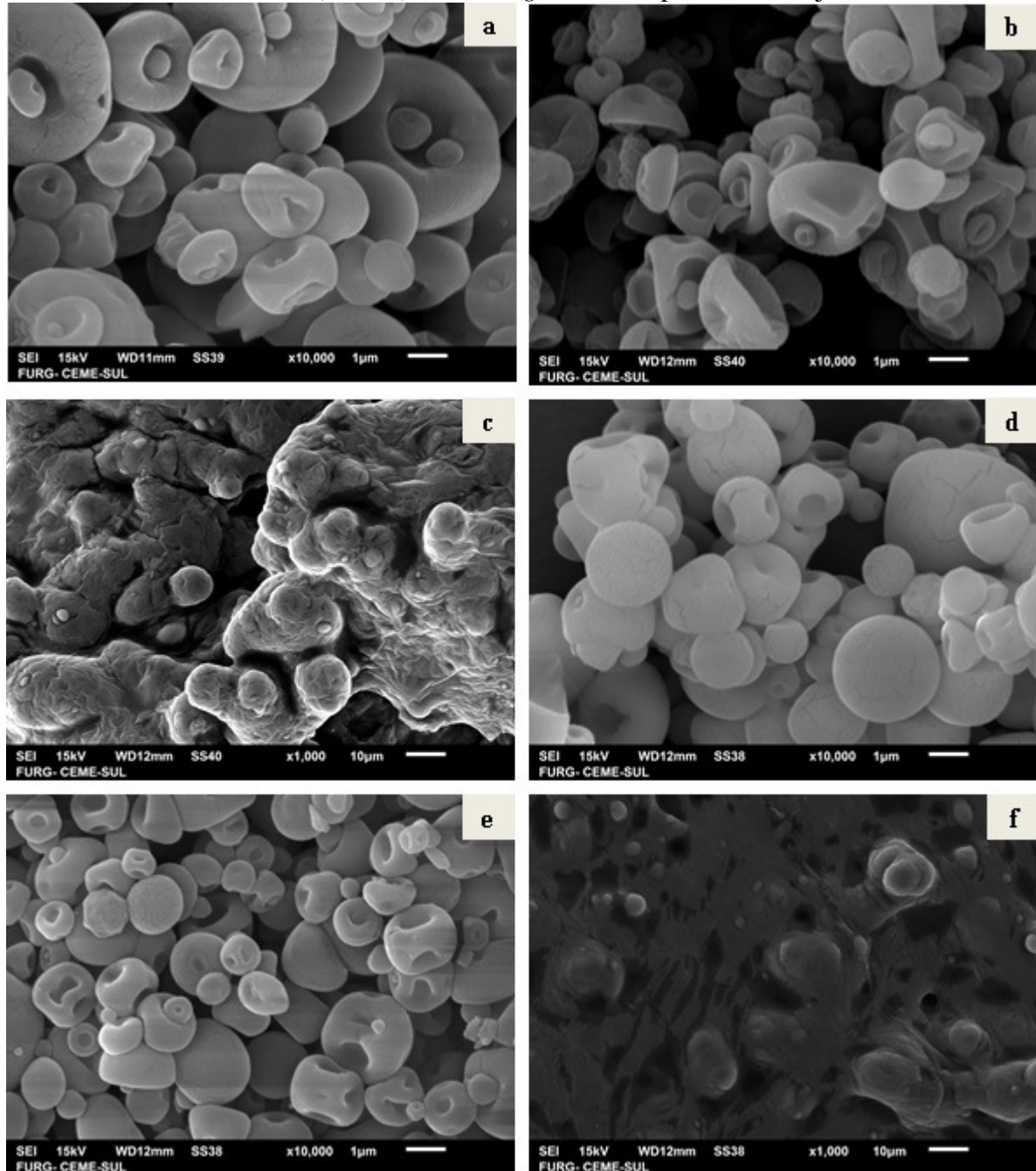
Ao contrário do que geralmente ocorre com a microencapsulação por liofilização, no processo de atomização as partículas obtidas apresentam formato e tamanhos mais característicos e uniformes. Outra vantagem da encapsulação por atomização é a possibilidade de trabalhar com materiais termolábeis, como os carotenoides (AZEREDO, 2005).

Na Figura 6 (a) é apresentado o MEV para o extrato de *S. pararoseus* com alginato de sódio como material de parede. As partículas obtidas demonstraram ter formato uniforme, semelhante ao de uma “rosquinha”, com diâmetros variando de 1,06 a 13,46  $\mu\text{m}$ . Partículas de formato parecido foram obtidas com extrato de *R. mucilaginoso*, porém a maior parte do encapsulado se apresentou em formato esférico e diâmetros menores, entre 0,64 e 5,84  $\mu\text{m}$  (Figura 6 (d)). Valores e formas mais próximas das descritas por Drusch (2006) ao estudar pectina de soja como emulsificante na microencapsulação de óleos alimentícios por atomização, onde o autor encontrou partículas características e de formas esféricas com diâmetro médio de 2  $\mu\text{m}$ . De acordo com Gharsallaoui et al. (2007) essas alterações no tamanho de partícula e na morfologia das cápsulas durante a atomização estão relacionadas com teor de umidade e temperatura do ar de secagem.

Já os extratos atomizados de *S. pararoseus* e *R. mucilaginoso* com goma arábica, Figura 6 (b) e (e), apresentaram diâmetros de 1,06 a 13,46  $\mu\text{m}$  e 0,4 e 4,66  $\mu\text{m}$ , respectivamente. Apesar da diferença nas dimensões, as partículas formadas são semelhantes para os dois extratos, além de similares em forma e tamanho às encontradas por outros autores que utilizaram o mesmo material de parede (KRISHNAN; KSHIRSAGAR; SINGHAL, 2005; MONTERO et al., 2016).

Para ambos os extratos encapsulados com proteína de soja, não foi possível observar a formação de partículas características (Figura 6c e 6f), pois são aglomerados amorfos.

**Figura 6** - Micrografias de MEV das microcápsulas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura: a (x 10000) – *S. pararoseus* com Alginato de sódio 1:1; b (x 10000) *S. pararoseus* com goma arábica 1:1; c (x 10000) *S. pararoseus* com proteína de soja 1:1; d (x 10000) *R. mucilaginosa* com alginato de sódio 1:1; e (x 10000) *R. mucilaginosa* com goma arábica 1:1; f (x 1000) *R. mucilaginosa* com proteína de soja 1:1.



Essa má formação, assim como a baixa eficiência deste encapsulante no método de liofilização, está ligada, provavelmente, a baixa solubilidade dos componentes além das condições operacionais, no caso do processo de atomização. Gharsallaoui et al. (2007) explicam que a temperatura de alimentação modifica a viscosidade, a fluidez e, portanto, a capacidade da emulsão para ser atomizada de forma homogênea. Quando a temperatura de



entrada do ar de secagem é inferior a ideal para o tipo de emulsão, a baixa taxa de evaporação provoca a formação de microcápsulas com elevado teor de água e a baixa fluidez favorece a aglomeração das partículas. Um estudo da temperatura do ar de secagem seria uma alternativa, uma vez que a proteína de soja tem a capacidade de absorver umidade do ar mais elevada, se comparada com os demais materiais de parede utilizados durante o trabalho.

### 5.5.2. Termogramas de DSC

Os termogramas de DSC (Figura 7) demonstram eventos endotérmicos através da representação de curvas para baixo e eventos exotérmicos através de curvas para cima.

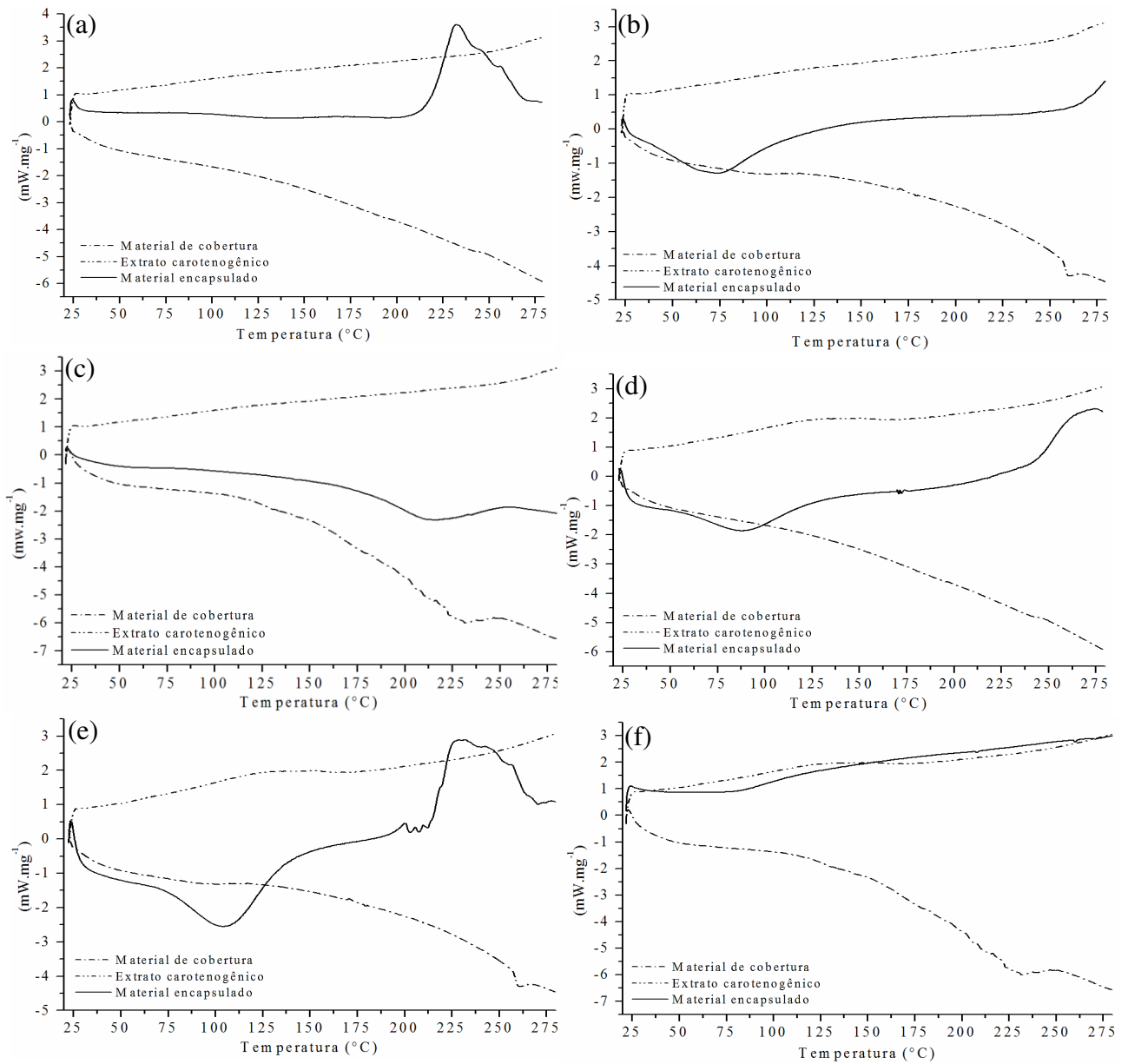
A curva para o extrato de *S. pararoseus* encapsulado com alginato de sódio, Figura 7 (a) apresentou apenas um pico exotérmico em 232°C, indicando que nesta temperatura o material passou por transição cristalina (Bernal et al., 2002). O mesmo material de cobertura, porém para o extrato de *R. mucilaginosa*, Figura 7 (d) demonstrou um pico endotérmico discreto próximo ao 80°C que se encontra na faixa de perda de água. E a ondulação que se inicia próxima aos 260°C indica degradação do material (SOUSDALEFF et al., 2013).

A curva para o extrato de *S. pararoseus* encapsulado com goma arábica, Figura 7 (b), apresentou o pico endotérmico característico de perda de água próximo a 80°C e um exotérmico ao final, indicando a degradação do material. O mesmo material, para o extrato de *R. mucilaginosa*, Figura 7 (e), além do pico em 100°C um pico exotérmico próximo a 230°C e, como ocorrido com goma xantana e extrato de *S. pararoseus*, indica que nesta temperatura o material possivelmente passou por transição cristalina (BERNAL et al., 2002).

Na Figura 7 (f) está apresentado o termograma para o extrato de *S. pararoseus*, assim como para proteína de soja e também o produto da atomização destes dois. O comportamento do material atomizado foi muito semelhante ao do material de cobertura, indicando que houve pouca adesão do extrato com a proteína.



**Figura 7** - Termogramas de DSC das microcápsulas de carotenoides utilizando diferentes materiais de cobertura: a - *S. pararoseus* com alginato de sódio 1:1, b - *S. pararoseus* goma arábica 1:1, c - *S. pararoseus* proteína de soja 1:1, d - *R. mucilaginoso* com alginato de sódio 1:1, e - *R. mucilaginoso* com goma arábica 1:1, f - *R. mucilaginoso* com proteína de soja 1:1.



## 6 CONCLUSÃO

O aumento de 168 h para 192 e 216 h, no cultivo em frascos agitados das leveduras *S. pararoseus* e *R. mucilaginosa*, respectivamente, em meio YM, com pH inicial 6,0 a 25°C e 180 rpm, incrementou a produção de carotenoides em aproximadamente 14% para *S. pararoseus* e 30% para *R. mucilaginosa*, em comparação a estudos anteriores em condições similares.

Para ambos os micro-organismos foram realizados 3 ciclos de extração, permitindo a redução de 1 ciclo de extração (10 min) no processo de recuperação dos carotenoides através da ruptura celular assistida por ultrassom, sem alterar significativamente a concentração carotenogênica dos extratos recuperados.

A avaliação da estabilidade dos extratos livres em diferentes condições de armazenamento demonstrou que a 25°C em ausência de iluminação as perdas no conteúdo carotenogênico foram um pouco menores quando comparadas a 4°C, comprovando a necessidade da busca por processos de microencapsulação, visando futuras aplicações em produtos alimentícios.

Características importantes para os métodos de microencapsulação como a liofilização e atomização destes compostos bioativos foram verificadas. Dentre os materiais de parede aplicados, apenas a proteína de soja não conseguiu se solubilizar ou se manter estável com os extratos, gerando partículas amorfas nos dois métodos avaliados. Goma arábica e alginato de sódio se mostraram promissores como materiais de parede, uma vez que apresentaram valores elevados de eficiência de encapsulação na liofilização, assim como formaram partículas características e de tamanho esperado quando atomizados. Já a goma xantana, mesmo tendo um bom desempenho como encapsulante para o extrato de *S. pararoseus* durante a liofilização, não se comportou como o esperado para o extrato de *R. mucilaginosa* não possibilitando a atomização.

Portanto, ainda são necessários estudos de diferentes concentrações e proporções entre carotenoides e material de cobertura, assim como de condições operacionais no processo de atomização. Porém, foi possível obter através da atomização partículas morfologicamente mais próximas de microcápsulas, a partir dos extratos oriundos de fonte biotecnológica e com potencial para emprego na área de alimentos.

## **7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Encapsular extratos produzidos pelas leveduras cultivadas em meios alternativos;
- Testar diferentes proporções entre o conteúdo de carotenoides e a concentração de material de parede utilizado para recobrimento das microcápsulas;
- Determinar a eficiência de encapsulação pelo método de atomização;
- Otimizar as condições operacionais do atomizador;
- Avaliar a estabilidade das microcápsulas.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: Use of agricultural wastes as a carbon source. **Process Biochemistry**, n. 40, p. 2985–2991, 2005.

AKSU, Z.; EREN, A. T. Production of carotenoids by the isolated yeast of *Rhodotorula glutinis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 35, p. 107–113, 2007.

AOAC – ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official Methods of Analysis**. 17 th edition. Washington, D.C., CD-ROM, 2000.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 16, n.1, p. 89-97, 2005.

AZMACH, G.; GEDIL, M.; MENKIR, A.; SPILLANE, C. Marker-trait association analysis of functional gene markers for provitamin A levels across diverse tropical yellow maize inbred lines. **BMC Plant Biology**, v. 13, 2013.

BERNAL, C.; COUTO, A. B.; BREVIGLIERI, S. R.; CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849-855, 2002.

BOTELLA-PAÍVA, P.; RODRÍGUES-CONCEPCIÓN, M. Carotenoid biotechnology in plants for nutritionally improved foods. **Physiologia Plantarum**, v. 126, p. 369-381, 2006.

CABRAL, M. M. S.; CENCE, K.; ZENI, J.; TSAI, S. M.; DURRER, A.; FOLTRAN, L. L.; TONIAZZO, G.; VALDUGA, E.; TREICHEL, H. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain by submerged fermentation. **European Food Research & Technology**, v. 233, p. 159-166, 2011.

CASTRO, L. A. S.; SANHUEZA, R. M. V.; CANTILLANO, R. F. F.; ROCHA, N. E. M. Metodologia para observação da camada de cera em maçãs, utilizando microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 24, n. 3, p. 774-775, 2002.

CERÓN-GARCIA, M. C.; CAMPOS-PÉREZ, I.; MACÍAS-SÁNCHEZ, M. D.; BERMEJO-ROMÁN, R.; FERNÁNDEZ-SEVILLA, J. M.; MOLINA-GRIMA, E. Stability of carotenoids in *Scenedesmus almeriensis* biomass and extracts under various storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 6944-6950, 2010.

CIPOLATTI, E. P. **Obtenção de carotenoides microbianos com atividade antioxidante a partir de coprodutos agroindustriais**. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2012.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de alimentos de Fennema**. Trad. de Adriano Brandelli; cons. super. e rev. téc. desta edição por Adriano Brandelli. 4. ed. Porto Alegre, RS: Artemed, 2010. 900 p.

DAVIES, B. H.; Carotenoids. In: GOODWIN, T. W. **Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments**. London: Academic Press. cap. 2, p. 39-165, 1976.

DRUSCH, S. Sugar beet pectin: A novel emulsifying wall component for microencapsulation of lipophilic food ingredients by spray-drying. **Food Hydrocolloids**, v. 21, p. 1223-1228, 2007.

EL-BANNA, A. A. E-R.; EL-RAZEK, A. M. A.; EL-MAHDY, A. R. Isolation, Identification and Screening of Carotenoid-Producing Strains of *Rhodotorula glutinis*. **Food and Nutrition Sciences**, v. 3, p. 627-633, 2012.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 510-523, 2010.

FONSECA, R. A. dos S.; RAFAEL, R. da S.; KALIL, S. J.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. de M. Different cell disruption methods for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007

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

GU, Z.; CHEN, D.; HAN, Y.; CHEN, Z.; GU, F. Optimization of carotenoids extraction from *Rhodobacter sphaeroides*. **LWT**, v. 41, p. 1082–1088, 2008.

GUO, H.; HUANG, Y.; QIAN, J.; GONG, Q.; TANG, Y. Optimization of technological parameters for preparation of lycopene microcapsules. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 7, p. 1318-1325, 2014.

HEIDER, S. A. E.; PTERS-WENDISCH, P.; WENDISCH, V. F.; BEEKWILDER, J.; BRAUTASET, T. Metabolic engineering for themicrobial production of carotenoids and related products with a focus on the rare C50 carotenoids. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 98, p.4355–4368, 2014.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA Jr. Purificação de produtos biotecnológicos. In: SHCMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; **Biociencia Industrial – Engenharia bioquímica**. São Paulo: Editora Edgar Blücher LTDA, v. 2, p. 493-520, 2001.

KLIS, F. M.; MOL, P.; HELLINGWERF, K.; BRUL, S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 239-256, 2002.

KUSDIYANTINI, E.; GAUDIN, P.; GOMA, G.; BLANC, P. J. Growth kinetics and astaxanthin production of *Phaffia rhodozyma* on glycerol as a carbon source during batch fermentation. **Biotechnology Letters**, v. 20, n.10, p. 929-934, 1998.

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.

LIN, C. H.; CHEN, B. H. Stability of carotenoids in tomato juice during storage. **Food Chemistry**, v. 90, p. 837-846, 2005.

LOPES, N. A. **Recuperação de carotenoides microbianos por diferentes técnicas de ruptura celular**. 98 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos). Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2014.

MACHADO, W.R.C.; BURKERT, J. F. M. Optimization of agroindustrial medium for the production of carotenoids by wild yeast *Sporidiobolus pararoseus*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, p. 209-219, 2015.

MALDONADE, I. R.; SCAMPARINI, A. R. P.; RODRIGUES-AMAYZA, D. B. Selection and characterization of carotenoid-producing yeasts from Campinas region, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.65-70, 2007.

MATA-GÓMES, L. C.; MONTAÑEZ, J. C.; MÉNDEZ-ZAVALA, A.; AGUILAR, C. N. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Chemical Engineering Department, School of Chemistry, Universidad Autónoma de Coahuila, Saltillo, Mexico. **Microbial Cell Factories**, 2014.

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  $\beta$ -galactosidase para uso em laboratório. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 336-339, 2008.

MELÉNDEZ-MARTINEZ, A. J.; VICARIO, I. M.; HEREDIA, F. J. Pigmentos carotenoides: consideraciones estructurales y fisicoquímicas. **Archivos latinoamericano de nutricion**, v. 57, n. 2, 2007.

MENDES-PINTO, M.; SANSIAUME, E.; HASHIMOTO, H.; PASCAL, A. A.; GALL, A.; ROBERT, B. Electronic absorption and ground state structure of carotenoid molecules. **The journal of physical chemistry B**, v. 117, p. 11015-11021, 2013.

MICHELON, M.; MATOS, B. T.; 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 and Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2012.

MONKS, L. M.; RIGO, A.; MAZUTTI, M. A.; VLADIMIR, J. O.; VALDUGA, E. Use of chemical, enzymatic and ultrasound-assisted methods for cell disruption to obtain carotenoides. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 165-169, 2013.

MONTERO, P.; CALVO, M. M.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; ESTACA-GÓMEZ, J. Microcapsules containing astaxanthin from shrimp waste as potential food coloring and

functional ingredient: Characterization, stability, and bioaccessibility. **Food Science and Technology**, v. 70, p. 229-236, 2016.

NAGHAVI, F. S.; HANACHI, P.; SOUDI, M. R.; SABOORA, A.; GHORBANI, A. Evaluation of the relationship between the incubation time and carotenoid production in *Rhodotorula slooffiae* and *R. mucilaginosa* isolated from leather tanning wastewater. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 16, n. 10, 2013.

OLIVEIRA, S. C.; CIRILO, A. T. O.; AQUINO, A. C. M. S.; CASTRO, A. A.; NARAIN, N. Estudo da extração e estabilidade dos carotenoides em amostras de salmão (*Salmo salar*) cru resfriado e congelado durante o armazenamento. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-5, 2011.

OLIVIER, J.; PALOU, A. Chromatographic determination of carotenoids in foods. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 543-555, 2000.

ORDÓÑEZ-SANTOS, L. E.; PINZÓN-ZARATE, L. X.; GONZALEZ-SALCEDO, L. O. Optimization of ultrasonic-assisted extraction of total carotenoids from peach palm fruit (*Bactris gasipaes*) by-products with sunflower oil using response surface methodology. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 560-566, 2015.

OTERO, D. M. **Bioprospeção de leveduras silvestres produtoras de carotenoides**. 114 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2011.

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.

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.

QV, X.Y.; ZENG, Z. P.; JIANG, J. G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1596-1603, 2011.

REIS, D. F. **Crescimento celular e produção de carotenoides pela microalga *Haematococcus pluvialis***. 81 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2012.

RASCÓN, M. P.; BERISTAIN, C. I.; GARCIA, 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.

RASHED, M. M. A.; TONG, Q.; ABDELHAI, M. H.; GASMALLA, M. A. A.; NDAYISHIMIYE, J. B.; CHEN, L.; REN, F. Effect of ultrasonic treatment on total phenolic

extraction from *Lavandula pubescens* and its application in palm olein oil industry. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 39-47, 2016.

REIS, D.; MACHADO JR, F.; OLIVEIRA, K.; TREVISOL, T.; BURKERT, C. A.; BURKERT, J. **Haematococcus pluvialis: crescimento celular e produção carotenogênica em diferentes meios de cultivo**. In: VIII Encontro de Pós-Graduação, 2011, Pelotas. Anais do VIII Encontro de Pós Graduação. Pelotas: UFPEL, 2011.

REYES, L. H.; GOMEZ, J. M.; KAO, K. C. Improving carotenoids production in yeast via adaptive laboratory evolution. **Metabolic Engineering**, v. 21, p. 26-33, 2013.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. Instituto Mauá de Tecnologia. Editora Edgard Blücher Ltda, 1ª ed., São Paulo, p. 155-157, 2004.

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.

RUTZ, J. K.; ZAMBIAZI, R. C.; BORGES, D. C.; KRUMREICH, F. D.; LUZ, S. R. da; HARTWING, N.; ROSA, C. G. da; Microencapsulation of purple Brazilian cherry juice in xanthan, taragums and xanthan-tara hydrogel matrixes. **Carbohydrate Polymers**, v. 98, p. 1256– 1265, 2013.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R.C.; ROSA, C. G.; SILVA, M. M. Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food. **Food Chemistry**, v. 202, p. 324-333, 2016.

SACHINDRA, N. M.; MAHENDRAKAR, N. S. Stability of carotenoids recovered from shrimp waste and their use as colorant in fish sausage. **Journal of Food Science and Technology**, v.47, n. 1, p. 77-83, 2010.

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.

SAUVANT, P.; CANSELL, M.; SASSI, A. H.; ATGIÉ, C.; Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. **Food Research International**, v. 46, p. 469-479, 2012.

SILVA, C. M.; **Produção de carotenoides pela levedura *Phaffia rhodozyma* cepa NRRL-Y 17268: valoração da glicerina (derivada da síntese do biodiesel) e da água de parboilização do arroz**. 105 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2010.

SILVA, C. M.; BORBA, T. M.; BURKERT, C. A. V.; BURKERT, J. F. M.; Carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* using raw glycerol as an additional carbon source. **International Journal of Food Engineering**, v. 8, n. 4, 2012.



SILVA, D. A. ; BORBA, T. M. ; KALIL, S. J. ; BURKERT, J. F. M.; Use of rice parboiling wastewater in maximization of carotenoids bioproduction by *Phaffia rhodozyma*. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 39, p. 401-410, 2015.

SILVA, D. A.; **Maximização da produção de astaxantina por *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrohous*) utilizando água de parboilização do arroz.** 91 p. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande, FURG, Rio Grande, 2009.

SILVA, M. C.; **Alterações na biossíntese de carotenoides em leveduras induzidas por agentes químicos.** 134 p. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP, Campinas, 2004.

SOUSDALEFF, M.; BAESSO, M. L.; MEDINA NETO, A.; NOGUEIRA, A. C.; MARCOLINO, V. A.; MATIOLI, G.; Microencapsulation by freeze-drying of potassium norbixinate and curcumin with maltodextrin: Stability, solubility, and food application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 61, p. 955–965, 2013.

SU, Y; WANG, J; SHI, M; NIU, X; YU, X; GAO, L; ZHANG, X; CHEN, L; ZHANG, W. Metabolomic and network analysis of astaxanthin–producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. **Bioresource Technology**. 2014. v 170, p.522-529.

SUTTER, S. C.; BUERA, M. P.; ELIZALDE, B. E.;  $\beta$ -carotene encapsulation in a mannitol matrix as affected by divalent cations and phosphate anion. **International Journal of Pharmaceutics**, v.332, p.45-54, 2007.

TANG, J-e.; WANG, R-j.; ZHONG, H.; YU, B.; CHEN, T.; Vitamin A and risk of bladder cancer: a meta-analysis of epidemiological studies. **World Journal of Surgical Oncology**, v.12, p.130, 2014.

TATSCH, P.O.; **Produção de carotenoides em meio sintético por *Sporidiobolus salmonicolor* CBS 2636 em biorreator.** 2008. 94 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, URI, Erechim, RS, 2008.

TISCH, D.; SCHMOLL, M.; Light regulation of metabolic pathways in fungi. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 85, p. 1259–1277, 2010.

TOMŠIK, A.; PALVIĆ, B.; VLADIĆ, J.; RAMIĆ, M.; BRINDZA, J.; VIVOVIĆ, S.; Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from wild garlic (*Allium ursinum* L.). **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 502-511, 2016.

ÚBEDA, B. T. **Estudo da produção de carotenoides pela bactéria *Kocuria rhizophila*.** 2008. 174 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VOS, P.; FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J.; Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.

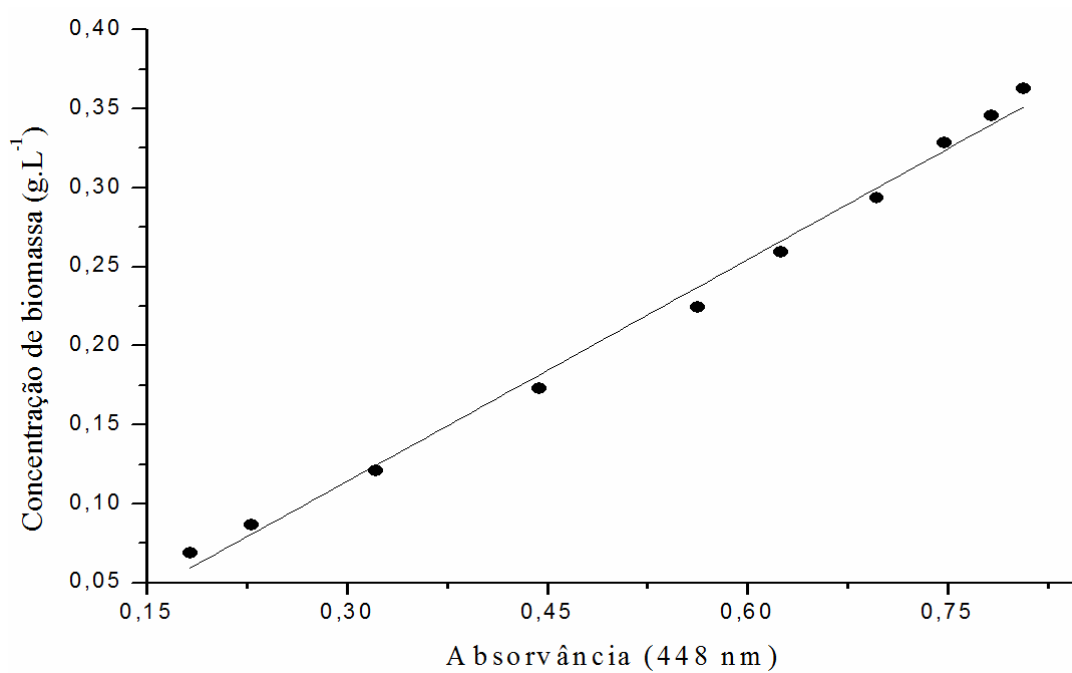
YEUM, K-J, RUSSELL, R. M.; Carotenoid bioavailability and bioconversion. **Annual Review Nutrition**, v. 22, p. 483-504, 2002.

YOO, A. Y.; ALNAEELI, M.; PARK, J. K.; Production control and characterization of antibacterial carotenoids from the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* AY-01. **Process Biochemistry**, v. 51, p. 463-473, 2016.

YOO, J.J.; CHOI, S. P.; KIM, B. W.; SIM, S. J. Optimal design of scable photo-bioreactor for phototropic culturing of *Hematococcus pluvialis*. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 3, p. 309–315, 2012.

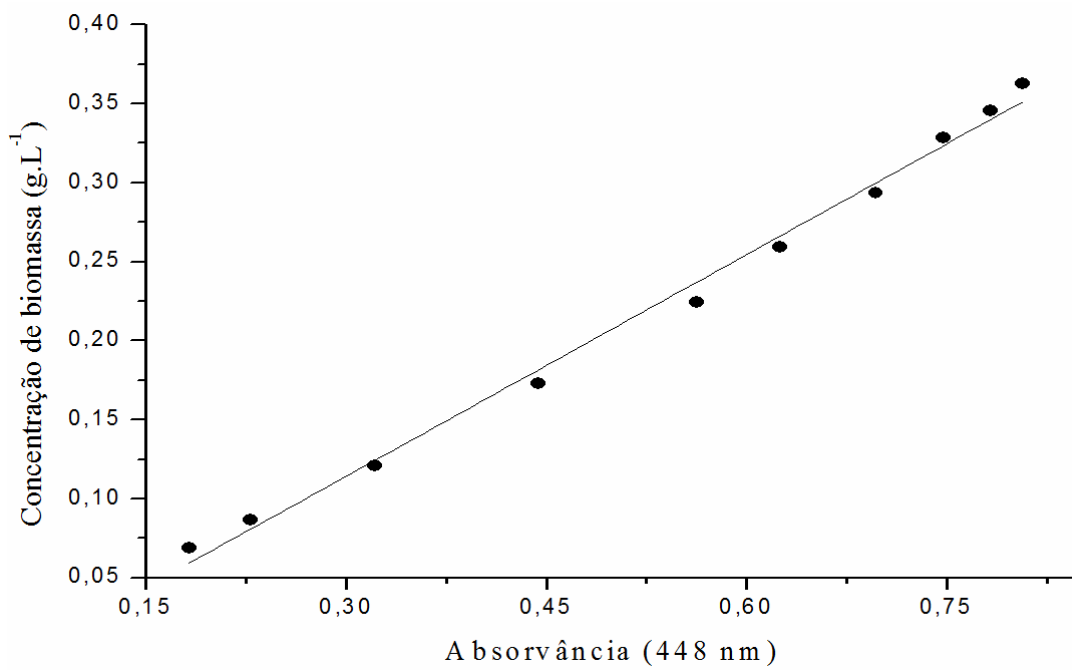
ZUANON, L. A. C.; MALACRIDA, C. R.; TELIS, V. R. N.; Production of turmeric oleoresin microcapsules by complex coacervation with gelatin-gum arabic. **Journal of Food Process Engineering**, n. 36, p. 364–373, 2013.

**APÊNDICE A- Curva padrão de biomassa da levedura *Sporidiobolus pararoseus*.**



$R^2 = 0,9932$ ;  $[Biomassa] = 0,4676 * Abs - 0,0260$

**APÊNDICE B- Curva padrão de biomassa da levedura *Rhodotorula mucilaginosa*.**



$$R^2 = 0,9988; [\text{Biomassa}] = 0,8275 * \text{Abs} - 0,0317$$