

## APRIMORAMENTO DA ETAPA *DOWNSTREAM* PARA A EXTRAÇÃO DE CAROTENOIDES PRODUZIDOS PELA LEVEDURA *PHAFFIA RHODOZYMA*

*Improvement of the downstream step for the extraction of carotenoids produced by the yeast Phaffia rhodozyma*

Daniel PRESCENDO JÚNIOR<sup>1\*</sup>, Pedro Garcia Pereira SILVA<sup>2</sup>, Janaina Fernandes de Medeiros BURKERT<sup>3</sup>,  
Lucielen Oliveira SANTOS<sup>4</sup>

**RESUMO:** Os carotenoides são a classe de pigmentos mais difundida na natureza. Possuem alta demanda de mercado devido as suas propriedades benéficas a saúde, resultando em aumento nas pesquisas referentes à sua produção via biotecnológica, podendo estes, serem produzidos por diferentes micro-organismos como a levedura *Phaffia rhodozyma*. Para tanto, pesquisas são necessárias para avaliar métodos e técnicas de extração e recuperação mais eficientes destes produtos. Neste contexto, este estudo propõe avaliar diferentes pré-tratamentos na biomassa de *P. rhodozyma* e diferentes solventes para a recuperação de carotenoides. Para tal, três pré-tratamentos na biomassa foram avaliados (secagem 24 h – congelamento 24 h; secagem 48 h – congelamento 48 h e liofilização). A utilização de hexano e éter de petróleo como solvente para a obtenção do extrato carotenogênico também foi verificada. Com o aprimoramento da metodologia, obteve-se máxima concentração específica ( $245,71 \pm 6,08 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e volumétrica ( $1803,50 \pm 36,46 \mu\text{g L}^{-1}$ ) de carotenoides utilizando éter de petróleo no pré-tratamento com secagem 24 h (35 °C) e congelamento 24 h (-18 °C). Este resultado mostra que no ensaio 24 h a quantidade de carotenoides extraído da biomassa é 23,3% mais eficiente que o método usualmente utilizado (secagem 48 h - congelamento 48 h), reduzindo o tempo de processo em 48 h.

**Palavras-chave:** Cultivo microbiano. Pré-tratamento de biomassa. Recuperação de carotenoides. Solventes orgânicos.

**ABSTRACT:** Carotenoids are the most widespread class of pigments in nature. They have high market demand due to their beneficial health properties, resulting in an increase in research related to their biotechnological production, which can be produced by several microorganisms, such as the yeast *Phaffia rhodozyma*. Therefore, research is needed to evaluate more efficient extraction and recovery methods and techniques for these products. In this context, this study proposes to evaluate different pretreatments in the biomass of *P. rhodozyma* and different solvents for carotenoid recovery. For this, three pretreatments in the biomass were evaluated (drying 24 h - freezing 24 h; drying 48 h - freezing 48 h and freeze-drying). The use of hexane and petroleum ether as a solvent to obtain the carotenogenic extract was also verified. With the improvement of the methodology, the maximum specific concentration ( $245.71 \pm 6.08 \mu\text{g g}^{-1}$ ) and volumetric concentration ( $1803.50 \pm 36.46 \mu\text{g L}^{-1}$ ) of carotenoids were obtained using petroleum ether in the pre-treatment with drying 24 h (35 °C) and freezing 24 h (-18 °C). This result shows that in the 24 h assay the amount of carotenoids extracted from biomass is 23.3% more efficient than the method usually used (drying 48 h - freezing 48 h), reducing the processing time by 48 h.

**Keywords:** Microbial cultivation. Pretreatment of biomass. Carotenoid recovery. Organic solvents.

\*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 20/04/2021; aprovado em 05/06/2021

<sup>1</sup>Graduando em Engenharia Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande; (54) 996724641, daniel.prescendo@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutorando em Engenharia e Ciência de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande, pedroprr\_gps@hotmail.com

<sup>3</sup>Professor Doutor, Universidade Federal do Rio Grande, jfmb@furg.br

<sup>4</sup>Professor Doutor, Universidade Federal do Rio Grande, santoslucielen@gmail.com

## INTRODUÇÃO

Com ampla distribuição na natureza, os carotenoides são substâncias lipofílicas que representam uma classe de mais de 700 pigmentos que apresentam, em sua maioria, coloração amarela, laranja ou vermelha (MESQUITA et al., 2017). Possuem estruturas químicas diversas, e além de serem utilizados comercialmente como corantes naturais na indústria de alimentos, alguns tipos de carotenoides possuem funções bioativas com efeitos benéficos para a saúde, sendo utilizados principalmente em fármacos e cosméticos. Isso devido a suas propriedades antioxidantes e por serem precursores da vitamina A. Todavia, por não serem sintetizados no organismo humano, requerem sua inserção na dieta (NGAMWONGLUMLERT; DEVAHASTIN, 2018; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Os carotenoides são sintetizados em algumas espécies de bactérias, fungos, leveduras, algas e plantas superiores (MESQUITA et al., 2017; RODRIGUEZ-AMAYA, 2019). E dentre os micro-organismos a levedura *Phaffia rhodozyma* destaca-se devido à sua capacidade de assimilar diferentes fontes de carbono como substrato (CIPOLATTI et al., 2015; URNAU et al., 2018), possuir metabolismo heterotrófico com taxa de crescimento relativamente rápida, habilidade de atingir alta densidade celular, ser certificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) e apresentar a capacidade de produzir carotenoides como  $\beta$ -caroteno, luteína e astaxantina, sendo este seu carotenoide majoritário (NOGUEIRA et al., 2017).

A *P. rhodozyma* sintetiza carotenoides no interior da célula, sendo necessário que ocorra o processo de ruptura celular para posterior extração do composto, processo esse que pode se dar por diferentes técnicas. Entre elas a extração com ruptura química, onde solventes orgânicos são aplicados diretamente na biomassa ou aplicados após um pré-tratamento térmico de modo a se obter maiores rendimentos no processo em escala laboratorial (MICHELON et al., 2012). Técnicas de lise celular utilizando pré-tratamentos térmicos na biomassa são alvos de estudos, pois a temperatura afeta diretamente a parede celular do micro-organismo, fazendo com que haja a liberação dos compostos intracelulares para o meio externo. Desta forma, operações como secagem e/ou congelamento da biomassa são interessantes anteriormente a extração do pigmento (ALBUQUERQUE, 2015; FONSECA et al., 2011; SAINI; KEUM, 2018).

Após a extração dos carotenoides do material intracelular, a solução formada é composta por diversas outras substâncias que são extraídas em conjunto no processo, assim como os lipídeos. Para a separação desta solução, são utilizados reagentes químicos que tenham afinidade com os carotenoides, separando-os dos demais compostos para serem quantificados (ALBUQUERQUE, 2015; FONSECA et al., 2011). O estudo de diferentes solventes para a separação da molécula alvo dos contaminantes se faz necessário, visto que, este afetará o coeficiente de partição da molécula de interesse e, consequentemente, afetará na recuperação desta biomolécula, quando em escala industrial (KILIKIAN; PESSOA JR., 2020).

Logo, o objetivo deste estudo é propor um aprimoramento da técnica de extração de carotenoides de *P. rhodozyma* pelo pré-tratamento da biomassa, avaliando diferentes solventes para recuperação dos carotenoides na etapa *downstream*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Micro-organismo e obtenção da biomassa

A levedura *Phaffia rhodozyma* NRRL-Y 17268, proveniente do Northern Regional Research Laboratories (Peoria, IL, EUA) foi o micro-organismo utilizado neste estudo. A cepa foi mantida a 4 °C em ágar *Yeast-Malt Extract* (YM) inclinado, composto por 10,0 g L<sup>-1</sup> de glicose; 5,0 g L<sup>-1</sup> de peptona; 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de levedura; 3,0 g L<sup>-1</sup> de extrato de malte e 20,0 g L<sup>-1</sup> de ágar. Para reativação, a levedura foi transferida para o meio YM e incubada a 25 °C por 48 h. O pré-inóculo foi feito com a suspensão de células em 1 mL de água peptonada (0,1%) e 9 mL de meio YM e incubado nas condições descritas por Cicolatti et al. (2015).

O preparo do inóculo foi feito em frascos Erlenmeyer (250 mL) contendo 90 mL do meio YM e 10 mL do pré-inóculo. Os frascos foram mantidos a 150 rpm, 25 °C, por 24 h, até atingir 1x10<sup>8</sup> cél mL<sup>-1</sup>. O inóculo permaneceu sob intensidade de campo magnético de 30 mT gerado por um imã de ferrite (8 cm x 8 cm x 1 cm) disposto na base do frasco (SILVA et al., 2020).

Para a produção de carotenoides o cultivo foi feito em frascos Erlenmeyer (500 mL) contendo 225 mL do meio YM, 10% de inóculo, mantido a 25 °C, 180 rpm e pH inicial 6,0 (RIOS et al., 2015) por 96 h com aplicação de campo magnético de 30 mT durante todo o cultivo (SILVA et al., 2020).

### Pré-tratamentos da biomassa e avaliação de solventes para recuperação de carotenoides

Após 96 h de cultura, o meio de cultivo foi centrifugado e o sobrenadante descartado, a biomassa foi lavada e ressuspendida em água destilada. Três pré-tratamentos da biomassa foram avaliados (Tabela 1).

**Tabela 1.** Pré-tratamentos utilizados na biomassa para a extração de carotenoides.

| Ensaio | Pré-tratamento da biomassa           |
|--------|--------------------------------------|
| 24 h   | Secagem (24 h) / Congelamento (24 h) |
| 48 h   | Secagem (48 h) / Congelamento (48 h) |
| Lio    | Liofilização                         |

A secagem da biomassa foi feita em estufa de circulação de ar a 35 °C e o congelamento em freezer convencional a -18 °C. Para a liofilização, a biomassa foi mantida a -70 °C por 48 h e após liofilizada. A biomassa seca foi macerada com pilão e almofariz, padronizada em peneira mesh 115 e posteriormente congelada de acordo com os pré-tratamentos. Os ensaios e análises foram feitos em triplicata.

Para a ruptura celular, em 0,05 g de biomassa foram adicionados 2 mL de DMSO (dimetilsulfóxido) aquecido a 55 °C, homogeneizado por 1 min em vórtex (Biomixer QL-901, Ningbo, China) a cada 15 min durante 1 h. Após a ruptura, para a extração dos carotenoides, foi adicionado 6 mL de acetona P.A. e posteriormente centrifugado (3500 rpm, 10 min). O sobrenadante foi separado e o procedimento foi repetido novamente (MICHELON et al., 2012).

Ao sobrenadante separado, foi adicionado 10 mL de NaCl 20% (m v<sup>-1</sup>), 10 mL do solvente orgânico (hexano ou éter de petróleo). A fase de topo foi filtrada em papel filtro com

Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e o filtrado obtido foi denominado extrato carotenogênico (CIPOLATTI et al., 2015).

A determinação da concentração específica de carotenoides (CEC) nos extratos foi feita em espectrofotômetro a 470 nm (RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). A Eq. 1 foi utilizada, sendo os resultados expressos em termos de seu carotenoide majoritário (astaxantina em hexano, com absorvidade molar de 2100 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> e em éter de petróleo com absorvidade molar de 2110 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (CIPOLATTI et al., 2015; RODRIGUEZ-AMAYA, 2001). Onde na Eq. 1: CE = concentração específica de carotenóides (µg g<sup>-1</sup>); A = absorvância, V = volume (mL); m<sub>amostra</sub> = biomassa (g) e A<sub>1cm</sub><sup>1%</sup> = absorvidade molar.

$$CE (\mu g g^{-1}) = \frac{A \times V \times 10^6}{A_{1cm}^{1\%} \times 100 \times m_{amostra}} \quad (1)$$

Para obter a concentração volumétrica de carotenoides (µg L<sup>-1</sup>) foi multiplicado a concentração específica de carotenoides (µg g<sup>-1</sup>) pela concentração de biomassa (g L<sup>-1</sup>).

### Determinação do teor de umidade

Após a etapa de secagem, as biomassas foram submetidas a determinação do teor de umidade (método 925.45b) (AOAC, 2002).

### Tratamento estatístico

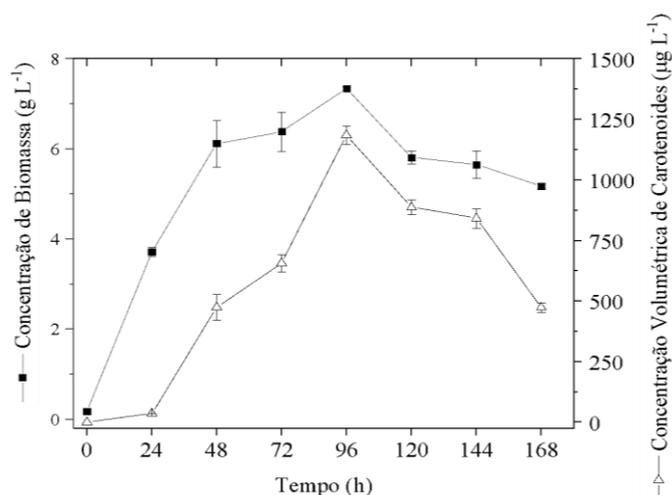
Para os ensaios de pré-tratamento na biomassa, os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo Teste de Tukey. Para os ensaios entre os dois solventes, as médias foram comparadas pelo teste T de “student”, ambos com 95% de confiança.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Estudo do cultivo microbiano

Inicialmente foi feito o cultivo nas condições descritas no estudo de Silva et al. (2020) para selecionar qual o tempo de cultivo ideal para máxima produção de biomassa (Figura 1). A utilização de campos magnéticos (CM) no cultivo foi descrita por Silva et al. (2020), onde os efeitos da aplicação de 30 mT no cultivo de levedura *P. rhodozyma* NRRL-Y 17268 aumentou em 59,4% a produção de carotenoides.

**Figura 1.** Cultivo de *P. rhodozyma* sob efeito de campo magnético de 30 mT.

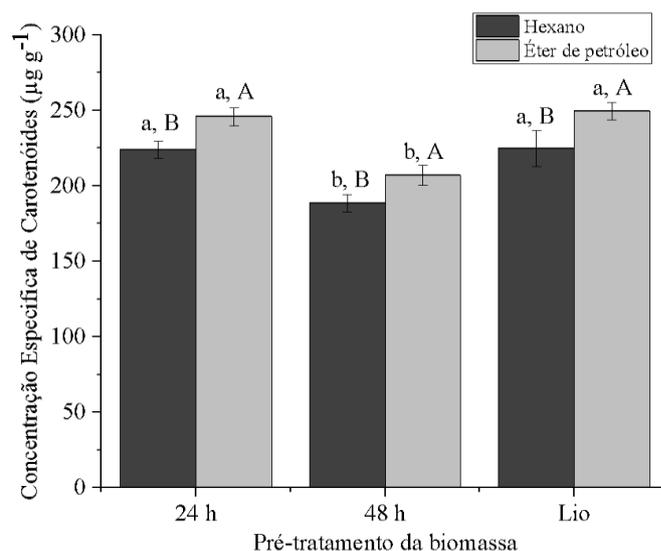


Percebe-se que a máxima concentração volumétrica de carotenoide (1184,60 ± 38,74 µg L<sup>-1</sup>) e máxima concentração de biomassa (7,34 ± 0,04 g L<sup>-1</sup>) foram obtidas em 96 h. Frente a estes resultados, decidiu-se estudar o aprimoramento do processo de extração dos carotenoides dos pré-tratamentos da biomassa e da avaliação de diferentes solventes para recuperação dos carotenoides.

### Efeitos do pré-tratamento da biomassa na extração de carotenoides

O pré-tratamento da biomassa que apresentou maior extratibilidade de carotenoides por grama de biomassa foi o ensaio 24 h, sendo estatisticamente igual ao ensaio Lio. Os resultados podem ser analisados na Figura 2.

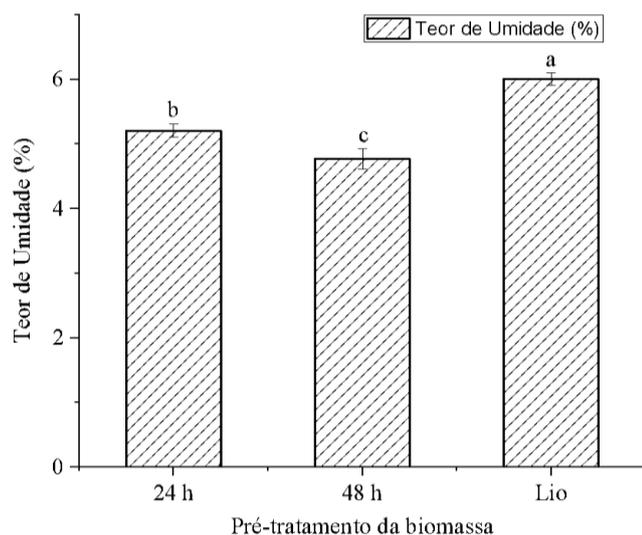
**Figura 2.** Concentração específica de carotenoides. Média ± Desvio Padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes representam que há diferença estatística pelo teste Tukey (p ≤ 0,05) entre os pré-tratamentos; Letras maiúsculas diferentes representam que há diferença estatística pelo teste T de “student” (p ≤ 0,05) entre os solventes.



O teor de umidade da biomassa diferiu estatisticamente dentre todos os pré-tratamentos de biomassa. O menor teor de umidade foi obtido no pré-tratamento 48 h ( $4,8 \pm 0,2\%$ ), sendo aproximadamente 9,2 e 26% menor do que os ensaios 24 h e Lio, respectivamente. No ensaio Lio, ao padronizar as partículas de biomassa em mesh 115, observou-se que a biomassa absorveu água do ambiente, provavelmente por isso apresentou teor de umidade maior que os demais pré-tratamentos. Isso pode não ter influenciado significativamente na extração dos carotenoides frente a técnica utilizada, entretanto foi observado durante o estudo (Figura 3).

A menor concentração específica de carotenoides ( $188,47 \pm 5,70 \mu\text{g g}^{-1}$ ) foi observada também no ensaio 48 h utilizando hexano como solvente para recuperação dos carotenoides. Sendo essa metodologia a utilizada por Silva et al. (2020). Assim, propõe-se um aprimoramento na técnica, reduzindo em 48 h (24 h do processo de secagem e 24 h de congelamento) o processo de extração de carotenoides. Neste mesmo ensaio foi observada uma concentração específica de carotenoides 18,7 e 19,2% menor que a do ensaio 24 h e Lio, respectivamente.

**Figura 3.** Teor de umidade de biomassa nos pré-tratamentos e solventes estudados. Média  $\pm$  Desvio Padrão (n=3). Letras minúsculas diferentes representam que há diferença estatística pelo teste Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



Percebe-se que o teor de umidade de cada pré-tratamento influenciou no processo de extração dos carotenoides. Fonseca et al. (2011) comprovaram a hipótese de que tanto a quantidade de água fora da célula, quanto a quantidade de água livre, influência nos processos de ruptura celular e na extração de carotenoides. Além disso, Mazur (1970) explicou que a formação de cristais de gelo no processo de congelamento, a concentração de solutos e a desidratação celular pelo aumento da pressão osmótica colaboram com a lise celular ao danificarem a membrana da célula da levedura.

Visto que a quantidade de água, que formará os cristais de gelo, influencia positivamente no pré-tratamento da biomassa, é possível comprovar que o ensaio de pré-tratamento

de biomassa 24 h é o mais efetivo. Isso, porque a formação de cristais de gelo será maior, por haver mais água na célula. Este fato, ocorre exclusivamente para a levedura estudada, perante ao fato de que cada micro-organismo possui suas próprias características de rigidez de membrana. Pode-se citar o trabalho de Lopes et al. (2017), que não obtiveram diferenças significativas da biomassa liofilizada de *S. pararouseus* e de *R. mucilaginosa* com a biomassa seca ( $35\text{ }^\circ\text{C}$ ; 48 h) e congelada ( $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ; 48 h).

No estudo de Fonseca et al. (2011), foi demonstrado que o pré-tratamento de biomassa de *P. rhodozyma* utilizando secagem ( $35\text{ }^\circ\text{C}$ ; 48 h) e posterior congelamento ( $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ; 48 h) foi significativamente mais efetivo do que sem pré-tratamento da biomassa, ou quando a biomassa foi submetida apenas a secagem ou congelamento.

Assim sendo, percebe-se que o pré-tratamento na biomassa de *P. rhodozyma* se faz necessário, e que o mais eficiente é a secagem por 24 h e posterior congelamento por 24 h. Este ensaio não diferiu significativamente do ensaio Lio. Entretanto, levando em consideração a complexidade e custo do processo de liofilização, nota-se que o ensaio 24 h é tanto mais vantajoso em relação a extratibilidade, quanto a facilidade de operação.

### Recuperação de carotenoides: comparação entre os solventes hexano e éter de petróleo

Neste estudo, foram avaliados também os solventes hexano e éter de petróleo para a recuperação dos carotenoides e formação do extrato carotenogênico na etapa de *downstream*. O hexano apresentou-se como um solvente de menor capacidade de extração de carotenoides perante o éter de petróleo em todos os pré-tratamentos estudados. A menor concentração volumétrica de carotenoides ( $1383,36 \pm 34,15 \mu\text{g L}^{-1}$ ) foi obtida no ensaio 48 h, utilizando o hexano (Tabela 2). Sendo que este, é o solvente padrão utilizado na literatura.

Em escala laboratorial, para quantificação dos carotenoides, o éter de petróleo é o mais adequado. Entretanto, este solvente não pode ser utilizado em escala industrial devido a sua toxicidade. Em contrapartida, segundo Chen et al. (2018), o hexano é permitido em concentrações específicas, dependendo do uso e suas concentrações.

As máximas concentrações volumétricas de carotenoides obtidas foram  $1803,50 \pm 36,46 \mu\text{g L}^{-1}$  no ensaio 24 h e  $1831,00 \pm 34,10 \mu\text{g L}^{-1}$  no ensaio Lio, ambas utilizando éter de petróleo como solvente extrator. Desta forma o método mais viável estudado foi o pré-tratamento de biomassa com secagem 24 h a  $35\text{ }^\circ\text{C}$  e posterior congelamento por 24 h a  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ , sendo a extração feita com éter de petróleo.

A metodologia utilizada por Silva et al. (2020) é feita com o pré-tratamento de biomassa por secagem por 48 h e posterior congelamento por 48 h e a recuperação dos carotenoides feita com hexano. Neste estudo, o ensaio 24 h apresentou-se como uma metodologia 23,3% mais eficiente em relação a quantidade de carotenoides extraído da biomassa, do que o método utilizado usualmente. Todavia, vale ressaltar que os dados obtidos são em função do aperfeiçoamento da metodologia empregada e não do melhoramento do processo de produção de carotenoides pela levedura *P. rhodozyma*.

**Tabela 2.** Recuperação de carotenoides utilizando hexano e éter de petróleo em diferentes pré-tratamentos de biomassa.

| Pré-tratamento da biomassa | Concentração volumétrica de carotenoide ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) |
|----------------------------|--|
|----------------------------|--|

|      | Hexano                          | Éter de petróleo                |
|------|---------------------------------|---------------------------------|
| 24 h | 1641,54 ± 34,50 <sup>a, B</sup> | 1803,50 ± 36,46 <sup>a, A</sup> |
| 48 h | 1383,36 ± 34,15 <sup>b, B</sup> | 1519,09 ± 38,72 <sup>b, A</sup> |
| Lio  | 1649,10 ± 72,34 <sup>a, B</sup> | 1831,00 ± 34,10 <sup>a, A</sup> |

Média ± Desvio Padrão. Letras minúsculas iguais na mesma coluna representam que não há diferenças estatísticas pelo teste Tukey ( $p > 0,05$ ); Letras maiúsculas iguais na mesma linha representam que não há diferença estatística ao nível de confiança de 95% pelo teste T de “student” ( $p \leq 0,05$ ).

## CONCLUSÕES

1. Na etapa *downstream* o pré-tratamento da biomassa de *P. rhodozyma* NRRL 17268 que se mostrou mais eficiente foi a secagem por 24 h (35 °C) e congelamento por 24 h (-18 °C), utilizando éter de petróleo para extração dos carotenoides;
2. A máxima concentração específica (245,71 ± 6,08 µg g<sup>-1</sup>) e volumétrica (1803,50 ± 36,46 µg L<sup>-1</sup>) de carotenoides foi 23,3% mais eficiente em relação a quantidade de carotenoides extraído da biomassa, do que o método utilizado usualmente (48 h; extraído com hexano);
3. O hexano apresentou menor extratibilidade de carotenoides da biomassa de *P. rhodozyma* em todos os pré-tratamentos estudados;
4. O processo de extração de carotenoides foi reduzido em 48 h.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; ao CNPq pela bolsa de iniciação científica e bolsas de produtividade em pesquisa; a FAPERGS e a Universidade Federal do Rio Grande (FURG) pelos laboratórios de pesquisa.

## REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis. 17<sup>a</sup> ed. Washington: AOAC, 2002. 1115 p.

ALBUQUERQUE, C. D. Estudo da cinética de produção de carotenoides de *Sporobolomyces ruberrimus* e de técnicas de extração de pigmentos. 2015. 177f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

CHEN, L.; WANG, J. L.; NI, H. ZHU, M. J. Disruption of *Phaffia rhodozyma* cells and preparation of microencapsulated astaxanthin with high water solubility. Food Science and Biotechnology, v. 28, p. 111-120, 2018.

CIPOLATTI, E. P.; BULSING, B. A.; SÁ, C. S.; BURKET, C. A. V.; FURLONG, E. B.; BURKET, J. F. M. Carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: Antioxidant activity and stability of extracts. African Journal of Biotechnology, v. 14, n. 23, p. 1982-1988, 2015.

FONSECA, R. A. S.; SILVA, R. R.; KALIL, S. J.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. M. Different cell disruption methods

for astaxanthin recovery by *Phaffia rhodozyma*. African Journal of Biotechnology, v. 10, n. 7, p. 1165-1171, 2011.

KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR., A. Purificação de produtos biotecnológicos: Operações e processos com aplicação industrial. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher Ltda., 2020. 760p.

LOPES, N. A.; REMEDI, R. D.; SÁ, C. S.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. M. Different cell disruption methods for obtaining carotenoids by *Sporodiobolus pararoseus* and *Rhodothorula mucilaginosa*. Food Science and Biotechnology, v. 26, n. 3, p. 759-766, 2017.

MAZUR, P. Cryobiology: The freezing of biological systems. Science, v. 168, n. 3934, p. 939-949, 1970.

MESQUITA, S. D. S.; TEIXEIRA, C. M. L. L.; SERVULO, E. F. C. Carotenoides: Propriedades, aplicações e mercado. Revista Virtual de Química, v. 9, n. 2, p. 672-688, 2017.

MICHELON, M.; BORBA, T. M.; RAFAEL, R. S.; BURKET, C. A. V.; BURKET, J. F. M. Extraction of carotenoids from *Phaffia rhodozyma*: A comparison between different techniques of cell disruption. Food Science and Biotechnology, v. 21, n.1, p. 1-8, 2012.

NGAMWONGLUMLERT, L.; DEVAHASTIN, S. Carotenoids. In: VARELIS, P.; MELTON, L.; SHAHIDI, F. (eds.). Encyclopedia of Food Chemistry. 1. ed. Elsevier, 2018. vol. 1, p.40-52.

NOGUEIRA, M. B.; PRESTES, C. F.; BURKET, J. F. M. Microencapsulation by lyophilization of carotenoids produced by *Phaffia rhodozyma* with soy protein as the encapsulation agent. Food Science and Technology, v. 37, n. spe, p. 1-4, 2017.

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

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A guide to carotenoid analysis in food. 1. ed. Washington: ILSI Press, 2001. 64p.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. A. Update on natural food pigments – A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. Food Research International, v. 124, n. 2017, p. 200-205, 2019.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Carotenoid extraction methods: A review of recent developments. Food Chemistry, v. 240, p. 90-103, 2018.

SILVA, P. G. P.; PRESCENDO JUNIOR, D.; SALA, L.; BURKET, J. F. M.; SANTOS, L. O. Magnetic field as a trigger of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma*. *Process Biochemistry*, v. 98, p. 131-138, 2020.

URNAU, L.; COLET, R.; SOARES, V. F.; FRANCESCHI, E.; VALDUGA, E.; STEFFENS, C. Extraction of carotenoids from *Xanthophyllomyces dendrorhous* using ultrasound-assisted and chemical cell disruption methods. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 96, n. 6, p. 1377-1381, 2018.