

PRODUÇÃO DE CAROTENOIDES POR MEIO DE FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO COM *RHODOTORULA MUCILAGINOSA* EM BAGAÇO DE LARANJA (*CITRUS SINENSIS*)

Whallans Raphael Couto Machado (UNESP) E-mail: whallansfm@hotmail.com

Ana Beatriz Vitar Soares (UNESP) E-mail: biavitar@gmail.com

Vanildo Luiz del Bianchi (UNESP) E-mail: vanildo@ibilce.unesp.br

Resumo: Carotenoides são pigmentos comumente encontrados em frutas e vegetais, responsáveis pela coloração dos mesmos, podendo variar de amarelo a vermelho. Com poder antioxidante, eles promovem um importante papel na saúde do ser humano, diminuindo o risco de desenvolver algumas doenças crônicas. Tendo em vista a crescente demanda por produtos naturais e processos ecologicamente corretos no mundo, promove-se o desenvolvimento de novas pesquisas em biotecnologia. Nesse contexto, a fim de aumentar a produção do corante e diminuir custos, o cultivo da levedura *R. mucilaginosa* sob fermentação em estado sólido a partir do coproduto bagaço de laranja foi estudado. Foram realizados cultivos variando a granulometria do bagaço em 1,41mm e 2,83mm, o pH inicial com soluções 0,1 e 0,5M de NaOH e soluções de NaOH e tampão fosfato com pH 7, 7,5 e 8, e a concentração de açúcar inicial com a adição de 20, 30, 40 e 50g de melaço de cana de açúcar para cada kg de material sólido. Também foram realizados experimentos com a adição de alguns suplementos, tais como: peptona, extrato de levedura, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 e MgSO_4 . Os resultados obtidos foram satisfatórios quando comparados a outros estudos realizados nesta área, com uma produção de até 228,38 mg de carotenoides por kg de bagaço.

Palavras-chave: Carotenoides, fermentação em estado sólido, bagaço.

PRODUCTION OF CAROTENOIDS BY SOLID STATE FERMENTATION IN WITH *RHODOTORULA MUCILAGINOUS* IN ORANGE (*CITRUS SINENSIS*) BAGASSE

Abstract:

Carotenoids are pigments commonly found in fruits and vegetables, responsible for their coloration, and may vary from yellow to red. With antioxidant power, they promote an important role in human health, reducing the risk of developing some chronic diseases. With the growing demand for natural products and environmentally friendly processes in the world, it has led to the development of new research in biotechnology. In this context, with the objective of increasing colorants production and reducing costs, the cultivation of yeast *R. mucilaginosa* under solid state fermentation from the orange bagasse co-product was studied. Cultures were carried out by varying the bagasse granulometry from 1.41mm to 2.83mm, the initial pH with 0.1 and 0.5M NaOH solutions and solutions of phosphate buffer pH 7, 7.5 and 8, and the initial sugar concentration with the addition of 20, 30, 40 and 50g sugar cane molasses for each kg of solid material. Experiments were also carried out with the addition of some supplements, such as peptone, yeast extract, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 and MgSO_4 . The results obtained were satisfactory when compared to other studies carried out in this area, with a production up to 228.38 mg of carotenoids per kg of bagasse.

Keywords: Carotenoids, solid-state fermentation, bagasse

1. INTRODUÇÃO

O aumento da demanda por produtos naturais motivou a substituição de vários aditivos a serem incorporados nos alimentos. Dentre eles, podem-se destacar os corantes, uma vez que, segundo algumas pesquisas, o consumo de pigmentos artificiais pode causar danos à saúde. Os carotenoides, pigmentos lipofílicos naturais, são responsáveis pelas colorações amarela, laranja ou vermelha presentes na natureza, tais como em algas,

plantas, crustáceos, peixes, pássaros e micro-organismos (AKSU e EREN, 2005). Estes corantes apresentam diversos benefícios para o ser humano, como a manutenção da visão, prevenção contra o câncer, ação antioxidante (retardando o processo de envelhecimento), a promoção de proteção da pele, estímulo à comunicação célula-célula, inibição da proliferação celular e atuação na resposta imune (JOMOVA e VALKO, 2013). Logo, com esta vasta gama de propriedades, é importante que essas biomoléculas sejam aplicadas em várias matrizes alimentícias com o propósito de enriquecer alimentos, além de serem utilizadas como suplemento de alimentação, em ração animal, em produtos farmacêuticos e em cosméticos

O custo de obtenção de carotenoides microbianos ainda é elevado, mas o uso de materiais oriundos das agroindústrias pode representar uma economia de 80% nesse âmbito (LIU et al., 2015). A fermentação em estado sólido (SSF), por sua vez, pode levar a geração de diversos produtos nobres, como os carotenos, através do crescimento de microrganismos no meio. No Brasil são produzidos diversos resíduos como bagaço de laranja, mandioca e cana de açúcar.

A produção de suco de laranja é uma das *commodities* de maior movimentação na economia agrícola global, ocupando a 20ª posição em 2008, representando 10,5% de toda a comercialização de frutas (REZZADORI et al., 2012). O Brasil é responsável por processar 53% do suco de laranja no mundo. Em 2017 a produção de suco de laranja concentrado foi de 1,15 milhão de toneladas, sabe-se que 50% disso corresponde de resíduos (casca, polpa e sementes). Esta enorme quantidade de resíduos é usada como adubação, alimentação animal ou é queimada (MARTÍN et al, 2010). Uma alternativa para melhorar o gerenciamento desse resíduo e diminuir o impacto ambiental seria utilizar este bagaço como substrato para a produção de vários compostos com alto valor agregado, como proteínas microbianas, enzimas, ácidos orgânicos. Isso diminuiria os custos com o processo fermentativo tornando-o industrialmente viável. O objetivo desse trabalho foi utilizar o bagaço de laranja como substrato e meio suporte para a produção de carotenoides.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Microrganismo

Foi utilizada a levedura *Rhodotorula mucilaginosa* URM 7409 previamente isolada e identificada por Machado (2018). O micro-organismo foi mantido com repiques trimestrais (3 meses) em tubos de ensaio contendo meio ágar GYMP (2 g/L glicose, 1 g/L extrato de malte, 0,5 g/L extrato de levedura, 0,2 g/L NaH₂PO₄ e 1,8 g/L ágar) recoberto por uma camada de óleo mineral, e mantido sob refrigeração a 4°C (COELHO, 2011). Para a reativação, a partir das culturas-estoques, foram realizados repiques para outros tubos de ensaio com o mesmo meio e incubados por 48h a 25°C.

2.2. Coprodutos agroindustriais

O melaço de cana de açúcar foi doado pela agroindústria Bunge, unidade Moema, localizada em Orindiúva – SP e as cascas de laranja foram adquiridas no comércio local (São José do Rio Preto – SP).

2.3. Inóculo

As colônias foram repicadas em tubos com ágar GYMP inclinado e incubadas a 25°C durante 48h. No término do processo, os cultivos foram homogeneizados a partir de uma suspensão celular com 20 ml de meio YM (3 g/L de extrato de levedura, 3 g/L de extrato de malte, 5 g/L de peptona, 10 g/L de glicose, adicionados de 0,2 g/L de KNO₃) e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 30 ml do caldo YM, totalizando 50 ml, previamente esterilizados a 121°C por 15 min, incubados a 150 rpm, 25°C por 48h ou o tempo necessário para a contagem celular atingir 1x10⁷ células/ml, verificada em câmara de Neubauer (VALDUGA et al, 2007).

2.4. Bioprodução de carotenoides

O bagaço da laranja foi seco a 60°C, por 24h em estufa. Após este período, foi realizado um processo de trituração e submetido novamente ao processo de secagem a 60°C, por 24h. De acordo com o item 2.7, fez-se a padronização do tamanho da partícula do bagaço de laranja, ajustada a umidade (item 2.5), sendo posteriormente esterilizado a 121°C por 20 min. e acrescido do inóculo (item 2.3).

A produção de carotenoides foi mantida em repouso por 240h, revolvendo uma vez a cada 48h, por meio do cultivo em Erlenmeyers de 250 ml com 10 g de bagaço de laranja umedecidos e acrescido de inóculo, iniciando o cultivo em 1x10⁶ células/ml a 25°C.

Para extração de carotenoides do bagaço, foram adicionados 70 ml de água no cultivo e deixado sob agitação a 180 rpm por 1h sendo, depois, submetido a filtração.

2.5. Teste de umidade

Para avaliar a melhor umidade a ser utilizada, foram elaborados meios com uma razão de 1:1, 2:1 e 3:1 (volume de água : massa de sólido).

2.6. Teste de inóculo

Para determinar o volume de inóculo a ser utilizado, foi introduzida uma proporção de 10 e 20% do mesmo na quantidade de substrato trabalhada.

2.7. Padronização do tamanho de partícula

Após a etapa de secagem e trituração do bagaço de laranja, foi determinado o tamanho da partícula do material sólido, utilizando peneiras de 7 (2,83 mm) e 12 (1,41 mm).

2.8. Avaliação do pH inicial

Para ajustar o pH, foi utilizada uma solução de NaOH na água de umidificação do material sólido (bagaço de laranja), em valores de 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0. Também foi utilizada solução tampão fosfato, para valores 7,0 7,5 e 8,0. Além disso, foram utilizadas diferentes concentrações de NaOH, como 0,1 e 0,5M, para alterar o pH do meio.

2.9. Concentração de açúcar inicial

Foram avaliados 20, 30, 40 e 50 g de melação de cana de açúcar para cada kg de meio (MACHADO, 2018).

2.10. Suplementação com nutrientes

Foram realizados cultivos utilizando 2 g de extrato de levedura, 1 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g de KH_2PO_4 e 5 g de MgSO_4 para cada kg de material sólido (MANTZOURIDOU et al., 2015), e 2 g de peptona.

2.11. Cinética da produção de carotenoides

Nas melhores condições de cultivo (umidade, pH inicial, tamanho de partícula e suplementação), foi realizado um acompanhamento da evolução da concentração de carotenoides por 384h (16 dias).

2.12. Métodos analíticos

2.12.1. Recuperação de carotenoides totais

A recuperação de carotenoides totais foi realizada conforme metodologias descritas anteriormente por Fonseca et al. (2011) e Michelon et al. (2012), adaptadas por Cipolatti et al. (2015). A biomassa foi centrifugada a $3439 \times g$ por 5 min, transferida para placa de Petri e colocada em estufa com circulação de ar por 24 h, posteriormente macerada em um gral (almofariz) e padronizada em peneira com Tyler 115 (CIPOLATTI et al., 2015). Posterior à etapa de padronização, a biomassa foi submetida a uma lise com o agente de ruptura dimetilsulfóxido – DMSO ($(\text{CH}_3)_2\text{SO}$), adicionada de 1,1 g/mL de pérolas de vidro, seguida por agitação em vórtex durante 1 minuto, em intervalos de 15 min, totalizando 1h (FONSECA et al., 2011). Após a ruptura, foi adicionada acetona, seguida de centrifugação ($3439 \times g$ por 5 min). O sobrenadante foi separado e outra extração foi realizada até o branqueamento total da célula. No sobrenadante, obtido após a centrifugação, foram adicionadas soluções de NaCl 20% (p/v) e éter de petróleo, seguida de uma homogeneização. Após a formação das fases, foi coletada a fase polar e o excesso de água foi retirado com sulfato de sódio (Na_2SO_4), originando os extratos (MICHELON et al., 2012).

2.12.2. Determinação de carotenoides totais

A determinação da concentração de carotenoides totais nos extratos foi realizada em espectrofotômetro através do valor médio da máxima absorbância a 448 nm (CABRAL et al. 2011), expresso em termos de seu carotenoide majoritário (β -caroteno em éter de petróleo com absorvância de $A_{1\text{cm}}^{1\%} = 2592$), utilizando a equação 1 (DAVIES, 1976).

$$CT = \frac{A * V * 10^6}{A_{1\text{cm}}^{1\%} * 100 * m_{\text{amostra}}} \quad (\text{Eq.1})$$

Onde CT é a concentração específica de carotenoides totais (mg/kg), A é a absorvância, V é o volume (ml), $m_{amostra}$ é a massa celular seca (g) e $A_{1cm}^{1\%}$ é a absorvância específica. Sendo o resultado expresso em concentração específica de carotenoides (mg/kg).

2.13. Análise estatística

Para avaliação do desempenho do teor de umidade, de pH inicial, do tamanho da partícula e da suplementação do meio de cultivo, os ensaios foram conduzidos em triplicata para posterior análise pelo teste de diferença de médias (Tukey) com α de 5% de significância, para verificar a influência dos diferentes tratamentos no meio agroindustrial.

Todos os resultados foram analisados estatisticamente utilizando o software Statistica V 10.0 (Startsoft).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram feitos experimentos variando umidade do meio, volume de inóculo, granulometria da partícula do bagaço de laranja e suplementação de nutriente sem o controle do pH inicial, o qual não foi obtido resultado, pois o valor de pH do meio de crescimento influencia não apenas a atividade de biossíntese da cultura, mas também a taxa de crescimento da mesma (VALDUGA, 2007). Visto isso, foram feitos outros experimentos, com umidade e volume de inóculo fixos, considerando os valores trabalhados anteriormente (3:1 e 20%, respectivamente), controlando o pH inicial, variando o mesmo com NaOH em água e a granulometria da partícula do bagaço de laranja com peneiras de Tyler 7 e 12. As figuras 1 e 2 ilustram o crescimento da levedura no bagaço da laranja e os resultados obtidos estão contidos na Tabela 1.

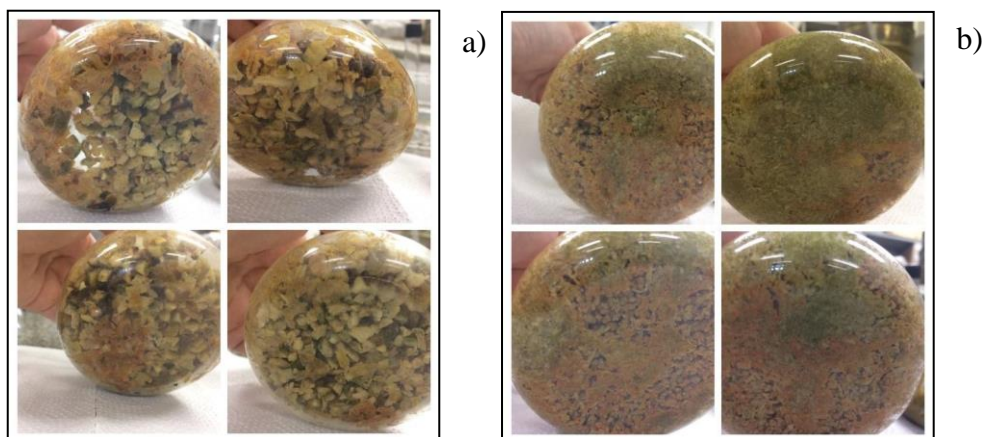


Figura 1: a) Crescimento da levedura em bagaço de laranja: a) granulometria de 2,83 mm (Tyler 7). b) granulometria de 1,41 mm (Tyler 12).

A partir da figura 1 (a e b), pode ser observado que há uma coloração específica do tipo de colônia da levedura *Rhodotorula* (ALMEIDA, 2015) e que, portanto, o crescimento foi possível no bagaço da laranja quando há o controle do pH do meio.

Tabela 1: Produção de carotenoide obtida por fermentação em bagaço de laranja variando o pH inicial com NaOH e diâmetro da partícula.

Ensaio	CEC (mg/kg)
Tyler 7, NaOH pH 7,5	101,41 ± 1,94 ^c
Tyler 7, NaOH pH 8,0	72,20 ± 0,01 ^e
Tyler 7, NaOH pH 8,5	75,19 ± 0,01 ^d
Tyler 7, NaOH pH 9,0	31,07 ± 0,31 ^f
Tyler 12, NaOH pH 7,5	228,38 ± 1,55 ^a
Tyler 12, NaOH pH 8,0	227,87 ± 0,14 ^a
Tyler 12, NaOH pH 8,5	187,18 ± 9,67 ^b
Tyler 12, NaOH pH 9,0	187,19 ± 0,78 ^b

Média ± desvio. Tyler 7 = 2,83mm, Tyler 12 = 1,41 mm. Letras minúsculas iguais não representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = Concentração específica de carotenoides.

O pH inicial afetou significativamente as propriedades de crescimento e a síntese de carotenoides pela *R. Mucilaginoso*, uma vez que à medida que o pH inicial aumenta, as taxas de produção diminuem, atingindo um nível máximo em pH 7,5 dentre os valores analisados. Outro fator observado nesse experimento foi a granulometria da partícula, pois quanto maior a partícula menor a quantidade de carotenoides obtida, descartando, assim, as granulometrias maiores. Quando utilizado o Tyler 12 é observado uma maior superfície de contato (menor a partícula) isso provoca maior exposição dos açúcares presentes no material, proporcionando maior desenvolvimento celular para a *Rhodotorula*.

Para avaliar a influência do pH inicial, foram utilizadas soluções de NaOH, variadas em concentração e tampões fosfato com diferentes pH, em granulometria definida de 1,41 mm, umidade e volume de inóculo fixados como antes. Os resultados dessas análises estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Produção de carotenoide obtida por fermentação em bagaço de laranja com variação do pH inicial com tampão fosfato e da concentração inicial de NaOH.

Ensaio	CEC (mg/kg)
Tampão fosfato (pH 7,0)	93,19 ± 20,17 ^a
Tampão fosfato (pH 7,5)	82,23 ± 12,91 ^a
Tampão fosfato (pH 8,0)	69,15 ± 10,48 ^{ab}
NaOH 0,1M (pH 7,0)	86,89 ± 1,96 ^a
NaOH 0,5M (pH 7,0)	82,46 ± 14,14 ^a

Média ± desvio. Letras minúsculas iguais não representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = concentração específica de carotenoides.

O uso de outro lote de laranja proporcionou uma quantidade inferior de carotenoides, devido a fatores de sazonalidade como acidez, açúcares e local de colheita. É observado

que a maior média da produção de carotenoides foi com a solução tampão fosfato pH 7, mas o uso de pH 7,5 não apresenta diferença estatística, por outro lado, o uso de valores acima de pH 8 pode não beneficiar a bioprodução de carotenoides. Já o uso de solução de NaOH provocou modificações químicas no bagaço, apresentando aspecto escuro após sua esterilização (Figura 3). Segundo Banerjee et al (1981) estas alterações podem afetar o crescimento e o metabolismo dos micro-organismos, apesar da mudança de cor do coproduto não ter interferido na produção de carotenoides. Dessa forma, considerou-se utilizar a solução tampão fosfato com pH 7,5.



Figura 3: Bagaço da laranja umedecido com NaOH antes e depois de esterilização em autoclave.

A terceira etapa do trabalho foi com o uso de melação de cana de açúcar adicionado ao suporte (bagaço de laranja). A intenção foi verificar se ocorre uma maior produção na concentração específica de carotenoides aumentando as concentrações de açúcares do meio, segundo Aksu e Eren (2005). Além disso, o suporte utilizado apresenta uma boa capacidade de absorção de água. Foi verificado que a casca conseguiu absorver uma relação de 3:1 em relação ao seu peso e isso pode representar uma boa absorção de nutriente quando dissolvido o melação na água de hidratação para o uso da levedura. Os resultados com adição de melação estão na Tabela 3. Ao analisar a tabela, é possível concluir que a produção máxima de carotenoides ocorreu com adição de 50 g/L de melação na casca.

Tabela 3: Produção de carotenoide obtida por fermentação em bagaço de laranja com adição de diferentes concentrações de melação.

Ensaio	CEC (mg/kg)
Melaço 20g/kg	74,46 ± 1,91 ^b
Melaço 30g/kg	125,04 ± 6,45 ^a
Melaço 40g/kg	107,08 ± 12,77 ^a
Melaço 50g/kg	130,39 ± 12,49 ^a

Média ± desvio. Letras minúsculas iguais não representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = concentração específica de carotenoides.

Levando em consideração o melhor crescimento da etapa anterior, foram feitos novos experimentos adicionando também outros tipos de suplementos ao bagaço, tais como: extrato de levedura, peptona, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e KH_2PO_4 . Paralelo a isso, foi feito também um teste para saber como seria a produção de carotenoides com a mesma contagem do número de células e um menor volume de inóculo acrescido na fermentação. Tais

resultados estão contidos na Tabela 4, assim como a ilustração dos mesmos está presente na figura 4.

Tabela 4: Produção de carotenoide obtida por fermentação em bagaço de laranja com adição de diferentes suplementos e volumes de inóculo inicial.

Ensaio	CEC (mg/kg)
Inóculo 1 ml	170,25 ± 0,55 ^{ab}
Inóculo 2 ml	180,99 ± 4,69 ^a
Extrato de levedura + Sais	179,74 ± 5,04 ^a
Extrato de levedura 2g/kg	174,41 ± 9,07 ^{ab}
Peptona 2g/kg	170,53 ± 8,00 ^{ab}
Peptona + Sais	183,15 ± 6,13 ^a
(NH ₄) ₂ SO ₄ 1g/kg	175,33 ± 2,00 ^{ab}
KH ₂ PO ₄ 1g/kg	176,26 ± 2,46 ^{ab}
Sais	162,62 ± 3,19 ^b

Média ± desvio. Letras minúsculas iguais não representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$). Sais = (NH₄)₂SO₄ 1g/kg + KH₂PO₄ 1g/kg + MgSO₄ 5g/kg. CEC = concentração específica de carotenoides.

Observou-se entre os diferentes volumes de inóculo acrescidos que não há uma diferença estatística na produção, mas o uso de 2 ml apresenta uma média maior na concentração específica de carotenoide. O uso em conjunto de extrato de levedura com sais ou peptona com sais estimula a produção de carotenoides. Entretanto, o uso somente de sais não apresenta o mesmo desempenho.

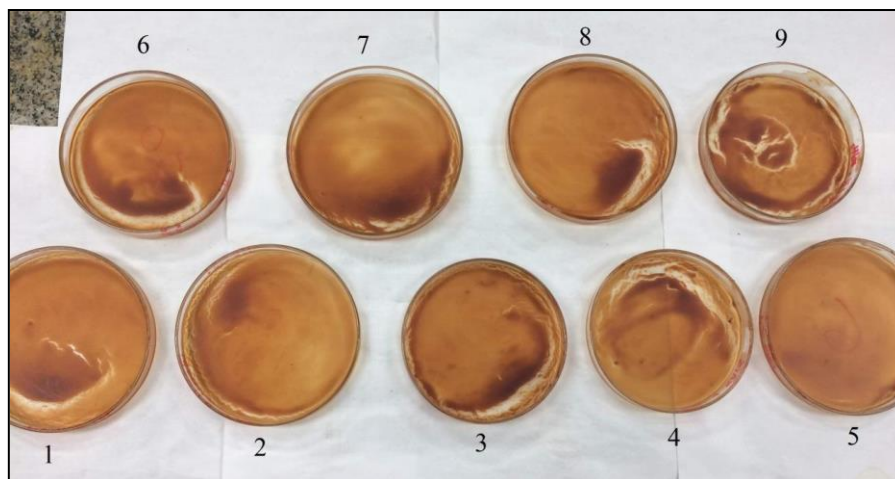


Figura 4: Pigmentação obtida em fermentações com adição de diferentes suplementos ao bagaço de laranja. 1 = inóculo 1 ml; 2 = inóculo 2 ml; 3 = extrato de levedura + sais; 4 = extrato de levedura; 5 = peptona; 6 = peptona + sais; 7 = (NH₄)₂SO₄; 8 = KH₂PO₄; 9 = sais.

Tendo em vista a melhor condição de crescimento, foi feito um acompanhamento da produção de carotenoides durante 16 dias, sendo feita a extração nos dias 6, 8, 10, 12, 14 e 16, porém com um novo lote de coproduto, havendo alterações nos resultados quando comparados ao anterior. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 5 e na Figura 8 a seguir:

Tabela 5. Produção de carotenoides obtida por fermentação em bagaço de laranja durante 16 dias.

Ensaio	CEC (mg/kg)
Dia 6	90,86 ± 5,65 ^{bc}
Dia 8	120,043 ± 12,08 ^a
Dia 10	106,83 ± 7,56 ^{ab}
Dia 12	105,26 ± 6,33 ^{ab}
Dia 14	84,01 ± 0,96 ^c
Dia 16	75,85 ± 7,43 ^c

Média ± desvio. Letras minúsculas iguais não representam diferença significativa pelo teste Tukey ($p < 0,05$). CEC = concentração específica de carotenoides.

De acordo com a Tabela 5, observa-se a diferença entre os resultados obtidos na etapa antecedente a esta, o qual obteve uma produção maior nas mesmas condições. Pode-se verificar também uma melhor produção no dia 8, indicando o melhor período para ser feita a extração e, em seguida, um decréscimo da produção. A baixa produção em relação aos experimentos anteriores pode estar associada à presença de açúcares oriundos do coproduto utilizado e/ou também de óleos, como o D-limoneno, que possuem efeitos inibitórios ou letais sobre diferentes microrganismos e, dependendo da safra, pode estar em maior ou menor quantidade (CORAZZA, 2001; BEZERRA, et al., 2013). De acordo com Mantzouridou, Paraskevopoulou e Lalou (2015), esse composto é encontrado na casca da laranja em porcentagem superior a 90% e seu forte efeito inibitório em relação ao crescimento da levedura se deve ao rompimento da membrana celular e transporte de H⁺ e K⁺ energizado pela glicólise.

Segundo Machado (2018), após uma otimização dos processos de fermentação em estado líquido, foi possível obter uma concentração específica de carotenoides de até 252,99 µg/g em meio YM pela levedura *R. mucilaginosa*. No presente trabalho, é possível observar que alguns resultados chegaram bem próximos ao obtido por ele, alcançando uma produção de até 228,38 mg/kg (Tabela 1). Assim, pode-se considerar a fermentação em estado sólido como um método tão eficaz quanto em estado líquido quando se tem o objetivo de uma boa produção deste pigmento por esta levedura.

4. Conclusão

Conclui-se que o uso do bagaço de laranja-pera oriundo da produção de suco de laranja é uma boa fonte para produção de carotenoides pela levedura *Rhodotorula mucilaginosa* em fermentação em estado sólido e o uso de coprodutos, como o melaço, pode elevar a produção. Porém a presença de óleos inibidores presentes no meio de cultivo ainda é uma questão a ser estudada.

5. REFERÊNCIAS

- AKSU, Z.; EREN, A. T. Carotenoids production by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa*: use of agricultural wastes as a carbon source. *Process Biochemistry* Vol. 40, n. 9, p. 2985–2991, 2005.
- ALMEIDA, G.M.D. *Rhodotorula spp. Isoladas de hemocultura no Hospital das Clínicas da Faculdade de São Paulo: características clínicas e microbiológicas*. 2015. 168 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R. & VISWANATHAN, L. *Inhibition of glycolysis by furfural in Saccharomyces cerevisiae.* European journal of applied microbiology and biotechnology Vol. 11, n. 4, p. 226–228, 1981.

BEZERRA, L.M.D.; FERREIRA, G.L.S.; SILVA, I.C.G. & CASTRO, R.D. *Atividade antibacteriana in vitro de fitoconstituintes sobre micorganismos do biofilme dentário.* Revista Brasileira de Ciências da Saúde Vol. 17, n. 1, p. 79–84, 2013.

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 and Technology, Nova York Vol. 233, p. 159–166, 2011.

CIPOLATTI, E.P.; BULSING, B.A.; SÁ, CS; BURKERT, C.A.V.; FURLONG, E.B. & BURKERT, J.F.M. *Carotenoids from Phaffia rhodozyma: Antioxidant activity and stability of extracts.* African Journal of Biotechnology, Nairóbi Vol. 14, p. 1982–1988, 2015.

COELHO, A. R. *Evaluation of potential antagonism in yeasts, seeking biocontrol of spoilage by Penicillium expansum.* Semina: Ciências Agrárias. Londrina Vol. 32, n. 1, p. 1879–1892, 2011.

CORAZZA, M.L.; RODRIGUES, D.G. & NOZAKI, J. *Preparação e caracterização do vinho de laranja.* Química nova Vol. 24, n. 4, p. 449–452, 2001.

DAVIES, B.H. *Chemical Biochemistry Plant Pigments;* GOODWIN, T.W., ed.; Academic Press: Nova York, 1976.

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

JOMOVA, K.; VALKO, M. *Health protective effects of carotenoids and their interactions with other biological antioxidants.* European Journal of Medicinal Chemistry Vol. 70, p. 102–110, 2013.

LIU, Y.; WANG, Y. & ZHANG, J. *Enhanced lipid production with undetoxified corncob hydrolysate by Rhodotorula glutinis using a high cell density culture strategy.* Bioresource Technology Vol. 180, p. 32–39, 2015.

MACHADO, W.R.C. *Bioprospecção de leveduras para produção de carotenoides microbianos.* 123p. Tese (Engenharia e Ciência de Alimentos). Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas UNESP, São José do Rio Preto – SP, 2018.

MANTZOURIDOU, F.T.; PARASKEVOPOULOU, A. & LALOU, S. *Yeast flavour production by solid state fermentation of orange peel waste.* Biochemical engineering journal Vol. 101, p. 1–8, 2015.

MARTÍN, M.A.; SILES, J.A.; CHICA, A.F.; MARTÍN, A. *Biomethanization of orange peel waste.* Bioresource Technology Vol. 10, p. 8993–8999, 2010.

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

REZZADORI, K.; BENEDETTI, S. AMANTE, E.R. *Proposals for the residues recovery: Orange waste as raw material for new products.* Food and Bioproducts Processing Vol. 90, n 4, p. 606–614, 2012.

SURYANARAYAN, S. & MAZUMDAR, K. *Solid state fermentation.* U.S. Patent n. 6,197,573, 2001.

VALDUGA, E.; VALÉRIO, A.; TREICHEL, H. & LUCCIO, M.D. *Pré tratamento de melão de cana de açúcar e água de maceração para a bioprodução de carotenoides.* Química Nova Vol. 30, n. 8, p. 1860–1866, 2007.