



# ESTUDO DA SECAGEM POR ATOMIZAÇÃO DE BIOMASSA DE *RHODOTORULA SP.* CNPAT-02

L. S. C. BRANCO<sup>1,2</sup>, M. M. T. ALMEIDA<sup>1,2</sup>, T. M. CAETANO<sup>1,2</sup> e G. A. S. PINTO<sup>1,2</sup>, H. M. C. AZEREDO<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Agroindústria Tropical, Laboratório de Bioprocessos, R. Dra. Sara Mesquita, 2270 – Fortaleza/CE - CEP.: 60.511-110

e-mail: [leisecbranco@gmail.com](mailto:leisecbranco@gmail.com); [gustavo@cnpat.embrapa.br](mailto:gustavo@cnpat.embrapa.br)

<sup>2</sup>Universidade Federal do Ceará, Departamento de Engenharia Química

**RESUMO** – Atualmente os carotenóides utilizados são obtidos por rota sintética ou por extração a partir de plantas e algas. A procura por compostos naturais tem resultado em constantes pesquisas referentes à produção de carotenóides por via fermentativa. A secagem por atomização é uma técnica de encapsulamento muito utilizada na fabricação de alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e pigmentos, além de ser uma alternativa de aumentar a vida útil de produtos perecíveis transformando-os em pó seco. O objetivo deste trabalho foi estabelecer condições de atomização, preservando os carotenóides após a desidratação da biomassa de *Rhodotorula*. Foram avaliadas a influência da adição de adjuvante de secagem e a velocidade de aspiração do atomizador. Com base nos resultados obtidos foi realizado um planejamento experimental segundo delineamento composto central, em que os parâmetros avaliados foram a temperatura de entrada do atomizador e a vazão de alimentação da suspensão. Não foi detectada viabilidade celular acima de 160°C. O menor teor de umidade foi a 180°C de temperatura de entrada e 40 mL.h<sup>-1</sup> de vazão de alimentação.

**PALAVRAS-CHAVE:** atomização; secagem; carotenóides

## 1. INTRODUÇÃO

Uma alternativa conveniente de aumentar a vida útil de produtos perecíveis é transformá-los em pó seco. Atualmente a secagem por atomização é uma das técnicas mais utilizadas na fabricação de vários produtos incluindo alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos, argilas e pigmentos. A secagem por atomização envolve a pulverização de um alimento líquido em um meio de secagem, resultando em uma rápida evaporação do solvente (Vega; Roos, 2006).

A remoção de água das soluções por “*spray-dryer*” é uma prática comum utilizada

para diminuir o teor de umidade do produto e consequentemente a atividade de água, sendo geralmente utilizada na indústria de alimentos para garantir a estabilidade microbiológica dos produtos, evitar riscos de degradações químicas ou biológicas, reduzir os custos de armazenamento e transporte e, finalmente, obter um produto com determinadas propriedades como solubilidade instantânea, por exemplo. (Gharsallaoui *et al.*, 2007).

A desidratação por “*spray dryer*” sem aditivos exige a instalação de dispositivos especiais na câmara de secagem, tais como paredes resfriadas, resfriadores, dispersadores de ar secundário, reciclagem



do produto seco ou indutores de cristalização no alimentador. Para evitar a instalação de tais dispositivos é possível a adição de coadjuvantes (suportes) no líquido de alimentação.

Alguns coadjuvantes usados para introduzir alterações físicas no produto permitem reduzir a deposição nas paredes e facilitam a manipulação dos produtos. Entre os coadjuvantes estão incluídos o ar, gases comprimidos, espumas, alginatos, proteína de soja, mono-esterato de glicerol, gomas naturais, sacarose, xaropes de amido e dextrinas. (Daíuto; Cereda, 2003).

A síntese natural de carotenóides produzidos por algumas leveduras, como as do gênero *Rhodotorula*, tem sido considerada como potenciais produtoras de pigmentos (Libkind; Broock, 2006). Estes pigmentos microbianos apresentam-se como uma alternativa viável aos pigmentos de origem animal ou vegetal, apresentando problemas de sazonalidade, além de terem produtividade alta.

O objetivo deste trabalho foi estabelecer condições de atomização, preservando os carotenóides após a desidratação da biomassa de *Rhodotorula*.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo e manutenção da linhagem: A levedura *Rhodotorula* sp. CNPAT-02 do banco de microrganismos da Embrapa Agroindústria Tropical, Ceará foi utilizada nesse estudo. A linhagem foi mantida em ágar Sabouraud (10 g.L<sup>-1</sup> de peptona de soja, 40 g.L<sup>-1</sup> de dextrose e 15 g.L<sup>-1</sup>) segundo a técnica de subcultura e estocada sob refrigeração.

Ativação e preparo do inóculo: Com o auxílio de uma alça de platina, o inóculo foi transferido asépticamente para o ágar inclinado Sabouraud e, em seguida, foi

incubado em BOD por 3 a 5 dias. Para a produção do inóculo, transferiu-se asépticamente uma amostra da linhagem estocada, para frasco de erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de caldo Sabouraud (10 g.L<sup>-1</sup> de peptona de soja e 20 g.L<sup>-1</sup> de dextrose) e incubado a 30°C, 150 rpm por 24 horas em agitador orbital. Após a quantificação da biomassa, inoculou-se nos meios de fermentação o volume necessário para a obtenção de um inóculo em torno de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de massa seca.

Meio de fermentação: foi preparado de acordo com a seguinte composição (expressa em g.L<sup>-1</sup>): dextrose: 25,0; extrato de levedura: 3,57; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 2,0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 2,0 e MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O: 0,1. O pH do meio de cultura foi corrigido para 6,0. Após o ajuste do pH, para cada frasco/biorreator foram transferidos diferentes volumes de meio. Para os erlenmeyers de 500 e 2000 mL foram transferidos 50 e 450 mL de meio, respectivamente. Estes frascos foram esterilizados a 121°C por 15 min. Para o biorreator de 14L, preparou-se 9,5L de meio adicionado de óleo de soja comercial numa concentração de 0,30%, como agente de prevenção de espuma. A dorna de fermentação contendo o meio foi esterilizada em autoclave a 121°C por 30 min.

Processo Fermentativo: a partir do caldo Sabouraud, inoculou-se em frasco de 500 mL, contendo 50 mL de meio de crescimento o volume necessário para a obtenção de um inóculo em torno de 0,1 g.L<sup>-1</sup> de massa seca. O meio foi incubado em agitador orbital a 30°C, 150 rpm por 36 horas. 50 mL do meio fermentado foi utilizado para inocular um erlenmeyer de 2L contendo 450 mL de meio estéril. O meio inoculado foi então incubado em agitador orbital a 30°C, 150 rpm por 24 horas. O meio fermentado foi utilizado para inocular o biorreator da marca New Brunswinck Scientific Co., modelo BioFlo 3000 com capacidade nominal de 14L e volume



máximo de trabalho de 10L. Para este estudo, utilizaram-se duas turbinas de 6 pás planas, também conhecidas como turbinas “Rushton”. O fermentador também foi equipado com quatro chicanas (baffles) equidistantes, posicionadas a 90° em relação à parede. Antes da inoculação o fermentador foi ligado e os parâmetros de temperatura, agitação e taxa de aeração foram ajustados para 30°C, 250 rpm e  $1\text{vvm}^{-1}$  respectivamente, durante 30 minutos para estabilização do sistema. A fermentação foi conduzida em batelada simples durante 120 horas. Amostras foram retiradas a cada 24 horas de fermentação e coradas, segundo o método de Gram, visando o acompanhamento da pureza de cada amostra.

Preparo da suspensão de leveduras: mediou-se 300 mL da suspensão de leveduras concentrada, e então a suspensão foi colocada em bquer de vidro de 500 mL. A amostra foi homogeneizada com uma barra magnética imersa no líquido e um agitador, que manteve a suspensão sob constante agitação até que toda amostra fosse injetada no “*spray dryer*” (Figura 1).

Recuperação da biomassa: Ao final de 120h de fermentação, amostras foram distribuídas igualmente em frascos plásticos com tampa e centrifugadas a 8000rpm durante 10 minutos. As células foram separadas do meio de cultivo e o sobrenadante foi descartado. A centrífuga da marca Sigma, modelo 6K-15, rotor 12.500 com capacidade total de 1,5L, foi utilizada para recuperação das células. Este procedimento repetiu-se por sucessivas vezes até que todo o meio fermentado fosse centrifugado. As células foram então ressuspensas em 1,5L de água destilada e estocada sob refrigeração a 8°C para posterior secagem em “*spray dryer*”.



Figura 1 – Preparo da suspensão de *Rhodotorula sp.* CNPAT-02.

Determinações analíticas: **cor instrumental** - A coloração foi determinada por análise colorimétrica utilizando colorímetro Minolta CR-300, o qual emite um feixe de luz sobre o material e, em seguida, captura a luz refletida, fornecendo três variáveis: **L\*** (variação de luminosidade do preto ao branco); **a\*** (variação do verde ao vermelho) e **b\*** (do azul ao amarelo), na escala padrão de cromaticidade na faixa de -60 até +60 para os parâmetros **a\*** e **b\***; **células viáveis** - A concentração de células viáveis e totais foi determinada pela contagem da suspensão previamente diluída, através da técnica de exclusão pela coloração com azul de metileno em câmara de *Neubauer*; **atividade de água** - foi determinada no produto em pó por leitura direta em aparelho *Aqualab* modelo CX-2 – *Decagon*; **umidade** - a umidade foi determinada no produto seco. Foram pesados, em duplicata, 1g do produto seco e colocados em cadinhos, previamente tarados, a 90°C por 24 horas em estufa de circulação



de ar da marca *Quimis* (IAL, 1985); **extração e quantificação de carotenóides** - foram pesados 50 mg da amostra seca para extração e quantificação. Com o intuito de romper a parede celular das leveduras, foi utilizado dimetilsulfóxido de acordo com a metodologia de Squina (2003). Após a extração exaustiva dos carotenóides, todo o extrato foi colocado em balão de 50 mL e aferido com a mistura de éter etílico/acetato de etila (1:1). Os carotenóides foram quantificados em espectrofotômetro a 450 nm, utilizando branco preparado com a mesma mistura de solventes e curva-padrão de  $\beta$ -caroteno; **higroscopicidade** – durante dois dias o produto seco foi estocado em ambiente a 25°C e 80% de umidade relativa, sem acondicionamento (amostras sobre placa de Petri), onde se observou o menor grau de aglomeração (visual) do produto.

Parâmetros estudados no processo: a secagem por atomização foi conduzida em Mini Spray Dryer Büchi B-290, com capacidade máxima de secagem de 1,0 L de água por hora e bico atomizador integrado de duplo fluido com 0,7mm de diâmetro. O atomizador de secagem Büchi B-290 funciona segundo o princípio da corrente de ar e de produto em sentido concorrente (Büchi, 2005). O processo envolve a atomização de um líquido em pequenas gotículas dentro de uma câmara de secagem por onde passa um fluxo de ar quente. Essas gotículas são secas pelo ar transformando-se em pequenas partículas sólidas (Ré, 2007). Inicialmente foi avaliado o efeito da adição de adjuvantes de secagem para se avaliar qual das amostras apresentaria um melhor desempenho em termos de teor de umidade, atividade de água e higroscopicidade. Estes testes foram realizados a temperatura de entrada de 160°C, com vazão de alimentação da suspensão de 20 mL.h<sup>-1</sup> e aspiração de 50%, com e sem adição de maltodextrina e o PPVP-90K (polivinilpirrolidona), usados como agentes adjuvantes. A partir dos

melhores resultados obtidos da primeira etapa, variou-se a velocidade do aspirador do “*spray dryer*” em 50%, 70% e 90% que corresponde a aproximadamente 20, 28 e 35 m<sup>3</sup>.h<sup>-1</sup> do fluxo de volume de ar aspirado, respectivamente. Com base nos resultados obtidos na segunda etapa, foram definidas as faixas dos parâmetros de secagem para realização dos tratamentos do delineamento composto central. O planejamento consistiu de um fatorial 2<sup>2</sup>, adicionado de 4 pontos axiais e 3 ensaios no ponto central. Nos tratamentos de secagem realizados, foram utilizados diferentes combinações de temperatura de entrada e vazão de alimentação, apresentando variação de 160°C a 200°C e 20 a 40 mL.h<sup>-1</sup>, respectivamente. A vazão de ar comprimido durante a atomização (357L.h<sup>-1</sup>) foi constante em todos os experimentos do planejamento.

Tabela 1 – Valores das variáveis segundo o delineamento composto central.

Número de ensaios	Temperatura de Entrada (°C)	Vazão de alimentação da suspensão (%) <sup>a</sup>
1	166	23
2	194	23
3	166	37
4	194	37
5	160	30
6	200	30
7	180	20
8	180	40
9	180	30
10	180	30
11	180	30

**a** - correlação entre os valores percentuais indicados e a vazão de alimentação, em mL.h<sup>-1</sup> para água destilada.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES



### 3.1 Avaliação do uso de adjuvante de secagem

As suspensões de leveduras contendo maltodextrina ou PPVP-90, além de permanecerem aderidas à câmara de secagem ocasionando um menor rendimento, apresentaram um elevado teor de umidade em relação à amostra sem adjuvante. Também foi possível observar que a amostra à qual não se adicionou adjuvante, apresentou uma atividade de água relativamente baixa, quando comparada às amostras que possuíam em sua composição adjuvante de secagem. Estes dados estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 – Adjuvantes de secagem adicionados na suspensão de levedura.

<b>Tipo de adjuvante de secagem</b>	<b>Teor de Umidade (%)</b>	<b>Atividade de água (A<sub>w</sub>)</b>
Sem adição	2,92	0,252
Maltodextrina	6,65	0,534
PPVP-90K	7,17	0,347

Adicionalmente o teste de higroscopicidade indicou que as amostras contendo adjuvantes de secagem apresentaram aspecto bem mais úmido e aglomerado em relação à amostra sem adjuvante. Portanto, o melhor resultado para a obtenção de um pó seco, fino e com baixo teor de umidade foi o teste conduzido sem adição de adjuvante de secagem.

A partir destes resultados realizaram-se experimentos variando-se somente a velocidade do aspirador e mantendo fixos os outros parâmetros do processo de secagem: temperatura de entrada, vazão de alimentação e vazão de ar comprimido.

### 3.2 Avaliação da variação da velocidade do aspirador

Para este estudo a temperatura de entrada (160°C), a vazão de ar comprimido (357L.h<sup>-1</sup>) e vazão de alimentação da suspensão (20%) foram mantidas constantes, a fim de definir qualitativamente uma velocidade de aspiração que resultasse em um produto seco, fino com mínimo teor de umidade. Analisando as amostras que foram submetidas a velocidades de aspiração de 50%, 70% e 90%, foi observado que a melhor velocidade do aspirador aplicada ao processo de secagem das células de *Rhodotorula* foi a velocidade de 90%. A câmara de secagem, o ciclone e o coletor encontravam-se completamente secos e toda a amostra recuperada, ficou depositada completamente no coletor, resultado ao contrário foi observado quando se aplicou as velocidades de 50% e 70%, em que a amostra encontrava-se depositada no ciclone, apresentando um teor de umidade maior, devido à menor temperatura de saída e maior umidade que são decorrentes da menor transferência de calor e de massa devido à baixa velocidade de ar de secagem, que provavelmente está associada a uma baixa temperatura do ar de entrada.

A temperatura de saída registrada foi mais elevada utilizando velocidade de aspiração de 90%, atingindo 73°C, o que pode ser uma desvantagem no caso de se desejar a obtenção de células vivas, porém no presente estudo leveduras vivas poderiam posteriormente promover alterações na composição dos carotenóides, podendo até mesmo diminuir a vida útil do produto (Bhosale *et al.*, 2003).

### 3.3 Avaliação dos dados obtidos na secagem da levedura

Admitindo os parâmetros de velocidade do aspirador de 90% e uma



amostra de levedura concentrada sem adição de adjuvante, mostrou-se adequadas ao processo de secagem para realização do planejamento experimental. A secagem da suspensão de *Rhodotorula* sp., resultou em um pó seco, fino, livre de umidade e com coloração rosada.

De acordo com as diferentes combinações de temperatura de entrada e vazão de alimentação da suspensão foi possível obter teores de umidade e atividade de água do produto baixa, conforme pode ser observado na

### Tabela 3.

A partir dos dados experimentais obtidos do planejamento, foi possível observar que não houve uma diferença significativa no teor de umidade e atividade de água. No entanto, a fim de tornar o processo de secagem menos dispendioso, devido a menor quantidade de energia e tempo gastos para a secagem da amostra e consequentemente pela menor oxidação dos carotenóides, o melhor tratamento de secagem para a suspensão de levedura foi a condição em que se aplicou temperatura de entrada de 166°C e vazão de alimentação da suspensão de 37 mL.h<sup>-1</sup>.

Segundo Farias (2009), na secagem por “*spray-dryer*”, altas temperaturas de entrada do ar são requeridas para a obtenção de um produto final na forma de pó com baixo teor de umidade, recomendando valores de umidade entre 4% e 5%.

A atividade de água ( $A_w$ ) é um índice importante para o pó seco por atomização (Figura 2), pois pode afetar muito a vida -de-prateleira do pó produzido (Quek *et al.*, 2007).



Figura 2 – Pó seco obtido da atomização da espécie *Rhodotorula*.

A temperatura de entrada utilizada no processo de secagem possui forte influência na viabilidade das células. No entanto, neste presente trabalho, o importante é a retenção do pigmento após a secagem das células e não a viabilidade celular. Nos tratamentos de secagem realizados, foram utilizadas diferentes combinações de temperatura de entrada, variando de 160 a 200°C. Neste intervalo de temperatura não foram detectadas células viáveis. Dados semelhantes foram apresentados por (Bhosale *et al.*, 2003) ao secar *Rhodotorula glutinis* mutante 32 em “*spray-dryer*”. Quando se admitiu temperaturas acima de 160°C, praticamente não foram detectadas células viáveis, com valores de viabilidade de aproximadamente  $0,3 \pm 0,2$ .



Tabela 3 – Planejamento experimental segundo o delineamento composto central.

Tratamentos	Temperatura de entrada (°C)	Vazão de alimentação (mL.h <sup>-1</sup> )	Umidade (%)	Atividade de água (A <sub>w</sub> )	Cromaticidade a*
1	166	23	2,68	0,30	18,10
2	194	23	2,26	0,29	19,30
3	166	37	2,80	0,27	22,63
4	194	37	2,17	0,28	19,06
5	160	30	3,83	0,23	22,60
6	200	30	1,77	0,22	17,73
7	180	20	2,92	0,29	18,24
8	180	40	1,72	0,27	22,97
9	180	30	2,45	0,27	20,13
10	180	30	2,48	0,29	20,94
11	180	30	2,10	0,25	20,46

Durante o processo de secagem por “*spray drying*”, as variáveis como, a natureza do produto, a quantidade de ar injetada, bem como as temperaturas de entrada e saída afetaram as propriedades do produto final (Bhosale, *et al.*, 2003).

Ao final do processo de secagem das células de *Rhodotorula sp.*, foi realizada uma análise de cor instrumental do pó seco, para avaliar a quantidade de pigmento retido, depois da atomização das células sob diferentes temperaturas de entrada.

A medição de cor representa um indicador de qualidade importante, que se reflete sobre o pó produzido no processo de secagem (Quek *et al.*, 2007). De acordo com a Figura 3, foi possível verificar que quanto maior a temperatura de entrada do ar admitida, menor é o teor de pigmentos carotenóides. Este resultado se deve a baixa

estabilidade dos carotenóides, que podem ser facilmente desnaturados, quando expostos a elevadas temperaturas, luminosidade e ao oxigênio. Como esperado o teor de pigmento foi danificado com o aumento da temperatura, diminuindo, portanto, a quantidade de pigmentos presentes no interior das células. De acordo com resultados obtidos por Bhosale (2003), a recuperação dos carotenóides foi menor (53%), quando se utilizou temperaturas mais elevadas de secagem.

Na Figura 3 também foi possível observar que o teor de pigmentos carotenóides é diretamente proporcional à vazão de alimentação da suspensão, ou seja, quanto maior a vazão de alimentação da suspensão, maior é o teor de carotenóides. De acordo com a superfície de resposta da figura abaixo, mantendo-se constante a temperatura de entrada, durante a atomização



da suspensão, observa-se que a retenção de pigmentos nas células de levedura é fortemente influenciada pela variação da vazão durante o processo de secagem.

Para vazões de alimentação mais baixas, a quantidade de água é menor, sendo, portanto, mais rapidamente evaporada e assim expondo as células durante um tempo maior em contato com o calor, causando decomposição das moléculas de caroteno, já que são moléculas termossensíveis. No entanto, para vazões mais elevadas, a uma mesma temperatura de entrada admitida, o teor de água é maior a ser evaporada. Um volume maior de água a ser evaporado a uma mesma quantidade de calor fornecido funcionaria como uma barreira de proteção das células, pois a água é mais lentamente evaporada.

Quanto maior a vazão de alimentação da solução, maior é a energia necessária para evaporar a água das gotas transformando-as em partículas (Büchi, 2007; Farias, 2009).

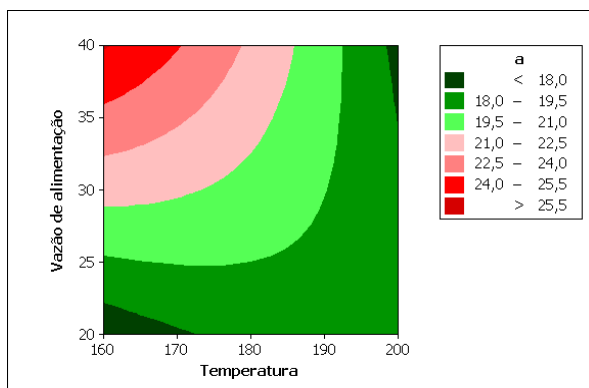


Figura 3 – Superfície de resposta do parâmetro  $a^*$  dos ensaios realizados no planejamento experimental de secagem.

De acordo com os dados obtidos do planejamento e pelo fato dos pigmentos carotenóides serem moléculas termossensíveis, a temperatura de entrada admitida de  $166^{\circ}\text{C}$  com vazão de alimentação de  $37 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ , foi o tratamento mais adequado

para a secagem da suspensão de leveduras, apresentando o parâmetro de cor (cromaticidade  $a^*$ ), que está associada aos pigmentos carotenóides, elevada.

## 4. CONCLUSÕES

A secagem conduzida sem adjuvante de secagem apresentou-se mais eficiente que os processos que envolveram a adição de adjuvantes (Maltodextrina ou PPVP-90K).

Analisando o processo de secagem qualitativamente, a velocidade do aspirador de 90% foi definida como a mais adequada para a obtenção de um pó fino e seco e com baixo teor de umidade.

A secagem de leveduras acima de  $160^{\circ}\text{C}$  resultou em não-viabilidade das células de leveduras, o que foi considerado uma vantagem do ponto de vista de estabilidade do produto.

Quanto maior a vazão de alimentação da suspensão, maior é os teores de pigmentos carotenóides retidos nas células.

Elevadas temperaturas de entrada admitidas, resultou em um menor teor de pigmentos carotenóides, uma vez que, os carotenóides são termossensíveis.

## 5. AGRADECIMENTOS

A Embrapa agroindústria tropical pela realização experimental do projeto e ao CNPq por ter proporcionado a bolsa de estudos.

## 6. REFERÊNCIAS

BHOSALE, P.; JOGDAND, V. V.; GRADE, R. V.; Stability of  $\beta$ -carotene in spray dried preparation of *Rhodotorula glutinis* mutant





32. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, p. 584-590, 2003.

BÜCHI. Manuel d'instructions atomisateur de séchage B-290. 2005.

BÜCHI LABORTECHNICK AG. Training papers – Spray drying. Disponível em : [http://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html?&no\\_cache=1&file=308&uid=2283](http://www.buchi.com/Spray-Drying.69.0.html?&no_cache=1&file=308&uid=2283).

Acesso em 15/01/2007.

DAIÚTO, E. R. e CEREDA, M. P. Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento. In: CEREDA, M. P. (Coord.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas**. São Paulo: Fundação Cargill, 2003, v.3, cap. 16, p. 449-454.

FARIAS, V. L. **Estudo das condições de secagem de conídios de *Trichoderma harzianum* LCB47**. Fortaleza, CE, 2009. 76 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Faculdade em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas: Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. IAL: São Paulo, 1985. 3. ed. 533 p.

IPT. Instituto de Pesquisas Tecnológicas (São Paulo). Maria Inês Ré. **Método de microencapsulação de agentes terapêuticos e composição farmacêutica**. BR n.PI 0103732-3, 11 jul. 2001, 29 maio 2007.

LIBIKIND, D. e BROCK, M.V. Biomass and carotenoid pigment production by Patagonian native yeasts. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.22, p. 687-692, 2006.

SQUINA F. M.; MERCADANTE, A. Z. Análise, por CLAE, de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n. 3, p. 309-318, 2003.

QUEK, Y. S.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. **Chemical Engineering and Processing**. v.46, p. 386–392, 2007.

VEGA, C. e ROOS, Y. H. Spray-dried dairy and dairy-like emulsions compositional considerations. **American Dairy Science Association**, v. 89, p. 383 - 401, 2006.