

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

ANDRÉ EDUARDO DE SOUZA BELLUCO

**Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação
nutricional e probiótico**

Piracicaba

2008

ANDRÉ EDUARDO DE SOUZA BELLUCO

**Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação
nutricional e probiótico**

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura
Orientador: Prof. Dr. Júlio Marcos Melges Walder

Piracicaba

2008

Aos meus país,

Celso Belluco e

Neide Gumbis de Souza Belluco,

Dedico

À minha esposa,

Elaine,

às minhas irmãs,

Claudia e Cristina,

aos meus pequenos sobrinhos,

Gabriel, Gabriela, Guilherme, Kim e Kimberly,

Ofereço

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela existência e força para percorrer a trilha da vida.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, em especial ao Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia, pela formação profissional e incentivo de seus funcionários e pesquisadores.

À Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, em especial ao Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, pela formação profissional e apoio de seus funcionários e professores.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos e recursos oferecidos durante o curso de Doutorado.

Ao Prof. Dr. Júlio Marcos Melges Walder, que, nos anos de convivência, muito me apoiou, principalmente nos momentos mais difíceis de minha vida, me ensinando, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao Prof. Dr. Jorge Horii, pela amizade, atenção, colaboração durante a realização do trabalho e por proporcionar amplo conhecimento de vida.

Ao Prof. Dr. André Ricardo Alcarde, pela amizade, colaboração durante a realização do trabalho e incentivo a concretização de mais uma etapa.

Aos assessores científicos do CENA e FAPESP, pelas relevantes sugestões durante a realização do trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Helena da Cruz, pela amizade, e valiosa colaboração durante a realização do trabalho.

Aos Dr. Antonio Sampaio Baptista e Dr^a. Maria Antonia Calori Domingues, pelas excelentes correções e sugestões no Exame de Qualificação e durante todo o projeto.

À amiga Regina Helena Gonçalves, pelo enorme auxílio nas análises laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Virgílio Franco do Nascimento Filho, pelo enorme auxílio nas análises dos micronutrientes.

Ao Prof. Dr. Cláudio Rosa Gallo, pelas importantes informações metodológicas e de interpretação, referente à avaliação de bactéria e levedura em grãos de milho.

À Maria Heloisa Duarte de Moraes, pelo enorme auxílio na avaliação de fungo em grãos de milho.

Ao Dr. Sergio Luis de Jesus, pelo apoio e valiosas informações de microscopia eletrônica de varredura.

À Bibliotecária Marília Ribeiro Garcia Henyei, pela amizade e auxílio referentes as diretrizes para elaboração da Tese.

À todos os meus amigos de pós-graduação, Evelise, Márcio, Matheus, Nilo, Rubens, Solange, Thaís, Vivian, Vivi, Zizi e todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização do trabalho.

Ao Dr. Ivan José Marmo de Almeida, pela amizade e atenção principalmente nos momentos delicados.

Aos meus familiares, pelo apoio e compreensão, com destaque para Alfredo, Antonia, Sergio, Waldir, Euclides, Edviges, Kathia, Lygia, Marcio, Maria, Joaquim e Marco.

À empresa AB Brasil, que novamente acreditou em nosso trabalho, fornecendo as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* Y904.

“A ciência progride da mesma forma como se infla um balão, aumentando a sua superfície externa (ignorância). Daí a propriedade da velha afirmativa de que, quanto mais se sabe, mais se sabe que se sabe muito pouco. A solução de um problema gera sempre o nascimento de vários outros e é dessa forma exponencial que cresce a nossa área de ignorância. Quanto mais se alargam nossos horizontes, mais se vê que eles se encontram cada vez mais distantes”.

Newton Freire - Maia

RESUMO

BELLUCO, A. E. S. **Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótico.** 2008. 96 f. Tese (Doutorado em Ciências – Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

A presente pesquisa visou o acúmulo dos micronutrientes ferro e zinco em levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, em meio contendo 300 mg L⁻¹ de ferro ou zinco (previamente definido) de acordo com o respectivo experimento. Ainda, teve o intuito de adicionar a levedura viva em um substrato (milho), esterilizado por irradiação gama (dose previamente definido), e avaliar a sua viabilidade celular para que essa possa ser uma fonte de probiótico. A levedura apresentou um acúmulo de ferro e zinco durante os ciclos fermentativos, alcançando no final do sexto ciclo 8883 mg kg⁻¹ de matéria seca e 7452 mg kg⁻¹ de matéria seca respectivamente. A viabilidade celular das leveduras decresce durante todo o tempo de investigação, apresentando um valor de 82,53% aos 110 dias.

Palavras-chave: Levedura. Micronutrientes. Enriquecimento. Nutrição. Irradiação. Probiótico.

ABSTRACT

BELLUCO, A. E. S. **Enriched live yeasts for nutritional supplementation and pro-biotic.** 2008. 96 f. Thesis (Doctorate in Sciences – Nuclear Energy on Agriculture) – Center for Nuclear Energy on Agriculture, University of São Paulo, Piracicaba, 2008.

The objective of this work was to accumulate the micro-nutrients iron and zinc in yeast *Saccharomyces cerevisiae* in broth with 300 mg L⁻¹ of iron or zinc. The enriched live yeasts were studied to be added to a substrate (corn) sterilized by gamma radiation in order to be a potential source of pro-biotic. The yeast accumulated iron and zinc during the fermentative cycles, reaching 8,883 mg kg⁻¹ (dry weight) and 7,452 mg kg⁻¹ (dry weight), respectively, at the end of the sixth cycle. The cellular viability of the yeasts added to corn decreased during the period of investigation, presenting the value of 82,53% at 110 days.

Key-words: Yeast. Micro-nutrients. Enrichment. Nutrition. Irradiation. Pro-biotic.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Micrografia destacando o aspecto ora liso, ora rugoso, dos aglomerados de levedura.....	69
Figura 2 - Micrografia identificando região com concentração de ferro na superfície da amostra.....	70
Figura 3 - Micrografia em ampliação da região anterior destacando a presença do elemento ferro.....	70
Figura 4 - Espectrograma da composição química da região na micrografia anterior.....	71
Figura 5 - Micrografia destacando duas regiões adjacentes de diferentes aglomerados de levedura.....	71
Figura 6 - Micrografia destacando a região anterior onde se observa a forma esferóide dos grupamentos de leveduras.....	72
Figura 7 - Micrografia destacando região com teores de zinco e adjacências.....	72
Figura 8 - Espectrograma indicando a composição química da região na micrografia anterior.....	73
Figura 9 - Incidência de fungos em grãos de milho.....	75
Figura 10 - Viabilidade das células das leveduras durante a investigação.....	79
Figura 11 - Comparação das viabilidades celulares durante o armazenamento.....	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Requerimento diário de proteínas para cavalos (400kg para manutenção).....	24
Tabela 2 - RDA do ferro durante o ciclo da vida.....	27
Tabela 3 - Requerimento de ferro para eqüinos.....	28
Tabela 4 - RDA do zinco durante o ciclo da vida.....	30
Tabela 5 - Requerimento de zinco para eqüinos.....	31
Tabela 6 - RDA do selênio durante o ciclo da vida.....	33
Tabela 7 - Requerimento de selênio para eqüinos.....	34
Tabela 8 - Meios de cultura YEPD ágar “Yeast extract peptone dextrose agar” com fontes de ferro ou zinco, para experimentos de inibição e manutenção da linhagem em diferentes concentrações.....	47
Tabela 9 - Meio de cultivo YEPD líquido “Yeast extract peptone dextrose” para reativação da linhagem comercial.....	47
Tabela 10 - Meio de cultivo YEPD líquido “Yeast extract peptone dextrose” para fermentação com fonte de ferro ou zinco.....	48
Tabela 11 - Esquema dos experimentos com fontes de ferro ou zinco.....	50
Tabela 12 - Esquema dos experimentos com fontes de ferro ou zinco.....	51
Tabela 13 - Esquema do experimento de avaliação do período de armazenamento de células viáveis.....	55

Tabela 14 - Contagem de colônias de leveduras em diferentes concentrações de ferro.....	61
Tabela 15 - Contagem de colônias de leveduras em diferentes concentrações de zinco.....	63
Tabela 16 - Levedura de referência.....	64
Tabela 17 - Valores médios de ferro em levedura e concentração celular.....	66
Tabela 18 - Valores médios de zinco em levedura e concentração celular.....	67
Tabela 19 - Determinação do teor de umidade em grãos de milho.....	74
Tabela 20 - Determinação da atividade de água em grãos de milho.....	74
Tabela 21 - Valores médios de colônias de leveduras em solução de milho.....	76
Tabela 22 - Determinação do teor de umidade em grãos de milho.....	76
Tabela 23 - Determinação da atividade de água em grãos de milho.....	76

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	16
1.2 HIPÓTESES	17
1.3 JUSTIFICATIVAS	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 IMPORTÂNCIA COMERCIAL DA LEVEDURA	18
2.2 OBTENÇÃO DE LEVEDURA SECA	19
2.3 VALOR NUTRICIONAL DA LEVEDURA	21
2.3.1 NUTRIÇÃO ANIMAL E HUMANA	23
2.3.1.1 PROTEÍNAS	23
2.3.1.2 FIBRAS	25
2.3.1.3 MINERAIS	26
2.3.1.3.1 FERRO	26
2.3.1.3.2 ZINCO	28
2.3.1.3.3 SELÊNIO	31
2.3.2 ACÚMULO DE MINERAIS EM LEVEDURA	34
2.3.3 UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO DE HUMANOS E ANIMAIS	36
2.4 MICRORGANISMOS E ASPECTOS AFLATOXICOGÊNICOS	42

2.4.1 DESINFECÇÃO DE ALIMENTOS ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO	43
2.4.2 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO E REDUÇÃO DE DANOS CAUSADOS POR AFLATOXINAS	44
3 MATERIAL E MÉTODOS	45
3.1 LOCAL	45
3.2 MICRORGANISMO	45
3.3 MEIOS DE CULTURA	46
3.3.1 MEIOS DE MANUTENÇÃO E DE REATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DESIDRATADAS	46
3.3.2 MEIO DE CULTIVO PARA FERMENTAÇÃO	48
3.4 VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DOS MICRONUTRIENTES AO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA LEVEDURA	49
3.5 FERMENTAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE MICRONUTRIENTES EM LEVEDURA	50
3.5.1 LEVEDURA REFERÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS MICROELEMENTOS FERRO e ZINCO EM YEPD	52
3.6 VALOR NUTRICIONAL DA LEVEDURA ENRIQUECIDA	52
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
3.8 AVALIAÇÃO DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE CÉLULAS VIÁVEIS	53
3.8.1 OBTENÇÃO DE SUBSTRATO ESTERILIZADO POR IRRADIAÇÃO	53
3.8.1.1 SUBSTRATO	53
3.8.1.2 ESTERILIZAÇÃO ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO	54
3.8.2 INOCULAÇÃO DA LEVEDURA NO SUBTRATO	54
3.8.3 CONDUÇÃO DO ARMAZENAMENTO	55
3.8.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55

3.9 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS	56
3.9.1 ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)	56
3.9.2 VIABILIDADE CELULAR	56
3.9.3 CONCENTRAÇÃO DE LEVEDURA	56
3.9.4 ANÁLISE DE MICRONUTRIENTES	57
3.9.5 PROTEÍNA	58
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
4.1 VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DOS MICRONUTRIENTES AO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA LEVEDURA	59
4.1.1 FERRO	59
4.1.2 ZINCO	62
4.2 FERMENTAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE MICRONUTRIENTES EM LEVEDURA	64
4.2.1 FERRO	65
4.2.2 ZINCO	66
4.2.3 VALOR NUTRICIONAL DA LEVEDURA ENRIQUECIDA	68
4.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROMETRIA POR ENERGIA DISPERSIVA	69
4.3 AVALIAÇÃO DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE CÉLULAS VIÁVEIS	74
5 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

A utilização da levedura está relacionada a vários setores da agroindústria, tais como produção de álcool etílico, bebidas, panificação, enriquecimento de alimentos destinados a seres humanos e animais, e probióticos.

A levedura destinada a alimentação humana e animal está sendo muito considerada, decorrente seu elevado valor nutricional e por ser um subproduto abundante da fermentação alcoólica. O Brasil possui uma capacidade de excedente de produção anual de 300.000 toneladas de leveduras, destinada apenas à produção de etanol (BUTOLO, 1997). O teor de proteína bruta na levedura é cerca de 30% em matéria seca (MOREIRA, 1984; LIMA, 1983) e pode alcançar valores de 44 - 67% em matéria seca (WHITE, 1954), sendo, assim, uma excelente fonte de proteínas e aminoácidos. O mesmo ocorrendo com as fibras, componentes da parede celular, que podem apresentar teores de 0,13 – 2,35% (BERTO, 1997). Os micronutrientes, como zinco, ferro e selênio, também fazem parte da composição da levedura, porém apresentam-se em menores teores: 4 a 130 mg 100 g⁻¹ de matéria seca, 3 – 100 mg 100 g⁻¹ de matéria seca (HARRISON, 1971) e 24,21 mg 100 g⁻¹ de matéria seca (CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997), respectivamente.

O aumento do teor de micronutriente na composição da levedura, decorrente de um enriquecimento no processo fermentativo, se utilizada na alimentação,

poderia favorecer o aumento de peso de animais e evitar manifestações de doenças de origens nutricionais, como anemia em seres humanos, e infecciosas em humanos e animais por fortalecimento do sistema imunológico.

A levedura após processo fermentativo, enriquecida de micronutriente, quando adicionada em alimentos esterilizados por irradiação, além de apresentar alto valor nutricional e material mineral de fácil homogeneização na alimentação, poderia como destacado por Baptista (2001), efeito de combate a aflatoxicose. Assim, as leveduras poderiam minimizar os efeitos patogênicos de certas toxinas em animais e seres humanos.

Deste modo, a finalidade de enriquecer a levedura com micronutriente e posteriormente adicioná-la viva no substrato é um estudo muito interessante, por encontrar formas de utilização da levedura excedente de fermentações alcoólicas industriais, permitir fornecer suplementos nutricionais a seres humanos e animais, de fácil homogeneização na alimentação, e combater as aflatoxinas.

1.1 OBJETIVOS

O escopo desta pesquisa foi estudar:

- A possibilidade da levedura absorver ou adsorver micronutrientes do meio fermentativo;
- a avaliação do período de armazenamento no qual as leveduras enriquecidas poderão se manter viáveis no substrato.

1.2 HIPÓTESES

A levedura em meio fermentativo enriquecido com micronutrientes poderá absorvê-los e adsorvê-los, de modo que juntamente com as fibras e seu elevado teor protéico, possa servir de suplemento nutricional na alimentação humana e animal, e também, ao serem adicionadas vivas em um substrato isento de microrganismos, servir no combate a aflatoxicose.

1.3 JUSTIFICATIVAS

A levedura é um microrganismo unicelular capaz de realizar fermentação alcoólica, sendo que no Brasil o setor alcooleiro utiliza a levedura do gênero *Saccharomyces*, predominantemente, a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Levando-se em consideração que o setor alcooleiro apresenta um elevado excedente deste microrganismo, tem-se interesse de enriquecê-los com micronutrientes (ferro e zinco), com a finalidade de se obter um material que forneça uma adequada suplementação destes elementos, além de fibras e proteínas quando em mistura com a dieta de seres humanos e animais. Através de suplementação alimentar tem-se a possibilidade de combater problemas nutricionais, fisiológicos e infecciosos, agregar valor aos produtos comercializados e gerar empregos diretos e indiretos. Ainda, a levedura pode ser adicionada viva, em substratos estéreis, com o intuito de minimizar problemas micotoxicológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 IMPORTÂNCIA COMERCIAL DA LEVEDURA

A levedura está diretamente relacionada a diversos setores da agroindústria, dos quais se destaca o setor alcooleiro, com produções anuais de cerca de 15 bilhões de litros de álcool (UNICA, 2006), e com uma capacidade de se obter para outras finalidades, sem prejudicar o processo, cerca de 300.000 t de levedura (BUTOLO, 1997). Em 1997, foram produzidas e comercializadas 25.000 t de levedura, com uma demanda de mercado interno equivalente a 12.000 ton e mercado externo 13.000 ton. No mercado interno, a levedura é destinada principalmente para alimentação de aves, apresentando uma fatia de 50% do mercado, seguido pelos suínos com 25%, gatos e cachorros com 10% e ruminantes e outros com 15%. No mercado externo, a levedura é exportada para o sudeste asiático principalmente Japão, Austrália, Nova Zelândia (9.000 t), seguida pela Europa (2.500 t) e Estados Unidos e América Latina (1.500 ton), com demanda direcionada para suínos, aquicultura, animais domésticos e veículos (GHIRALDINI; ROSSELL, 1997).

Segundo Butolo (1997) um dos fatores relevantes para a utilização da levedura excedente de produção para alimentação de animais são os consideráveis preços de grãos de cereais e suplementos protéicos vegetais, despertando um grande interesse pelo aproveitamento de alimentos conhecidos como “não convencionais” na indústria animal do Brasil e na de outros países, grandes produtores de grãos.

2.2 OBTENÇÃO DE LEVEDURA SECA

Para obtenção de levedura seca de boa qualidade é necessário seguir alguns requisitos, os quais são destacados por Ghiraldini e Rossell (1997) resumidamente a seguir:

- a) a qualidade da cana é imprescindível para uma fermentação estável e eficiente, para isto a mesma deve ser limpa, fresca e madura, pois fatores como o grau de deterioração, medido pela infecção, tem forte efeito sobre a centrifugação do vinho, impedindo a sangria do fermento produzido e exigindo tratamento ácido mais intenso, ocasionando redução da produção e qualidade do fermento seco, no que se refere a teor de proteína, sabor, cor e cinzas;
- b) a assepsia da moenda é de relevante importância por afetar o funcionamento da centrifugação de fermento, com conseqüências muito semelhantes à destacada anteriormente;
- c) o tratamento do caldo deve ser realizado em um dentre vários objetivos, para retenção dos sólidos insolúveis, para evitar que o mosto enviado à fermentação,

composto de caldo clarificado, caldo de filtro, mel e água, presente em sua constituição tais sólidos, os quais se acumulariam no processo de fermentação, por as centrifugas de fermento separarem e retornarem estes sólidos;

d) na fabricação de açúcar, geralmente a fermentação é melhor controlada em Usinas que tem mosto com maior pureza, ou seja, as que tem menor degradação térmica de açúcares e menor uso de enxofre e cal. A estabilidade dos fornecimentos à fermentação é dentro deste contexto, um fator essencial para obtenção contínua de fermento de boa qualidade;

e) a fermentação alcoólica deve ser bem conduzida, com eficientes controles de temperatura e tratamento do pé-de-cuba, livres de infecções e / ou tendência de floculação. As centrifugas devem ser projetadas para centrifugar com espaço satisfatório todo o vinho, permitir boa separação e obtenção de elevadas concentrações de fermento no leite e rejeição de bactérias. No entanto, os produtos adicionados à fermentação, como ácido sulfúrico, anti-espumante e agentes dispersantes, devem respeitar critérios específicos para fermentações com sangria de levedura para fins de produção de levedura seca, desta forma, antibióticos e biocidas que se acumulem no leite de levedura não podem ser utilizados;

f) o processamento para obtenção de levedura seca a partir de leite de levedura ou fundo de dornas de fermentação alcoólica, inicia-se com a lavagem por centrifugação dos mesmos, removendo materiais estranhos e recuperando parte do teor de álcool. Posteriormente, o leite de levedura será submetido ao processo de estarvação, assim, consumindo as suas reservas de carboidrato, transformando-as em álcool e conseqüente aumento do teor de proteína na massa. O leite resultante da operação anterior é submetido a uma deflegmação em coluna de destilação de pratos perfurados, de forma a recuperar uma parte do teor de álcool. Finalmente, a

levedura será submetida a um processo de concentração para retirada mecânica de uma porção de água do leite, minimizando os custos de energia da secagem e que os secadores tenham aumentado sua capacidade e eficiência de secagem, e seguida para um pré-aquecimento em trocadores de calor e imediatamente bombeada para as Unidades de Secagem, ensaque e armazenamento.

2.3 VALOR NUTRICIONAL DA LEVEDURA

Segundo Desmots (1968) a composição da levedura varia em função de diversos fatores, tais como: o substrato na qual é cultivado, a espécie de levedura, o método de fermentação, o modo e as condições de secagem e a idade das células. As leveduras de recuperação no processo de produção de álcool podem ser obtidas através do desvio do leite-de-levedura, da centrifugação da vinhaça e aproveitamento do fundo de dornas, sendo que, o primeiro fornece um material mais puro e concentrado, ideal para alimentação animal (MARTIN, 1987).

Levedura, alga, bactéria e fungo podem substituir os suplementos protéicos convencionais usados na alimentação animal e humana, pois apresentam elevado teor protéico, alta velocidade de crescimento e possibilidade de cultivo em substratos diversos (LAHR FILHO; GHIRALDINI; ROSSEL, 1996). As leveduras mais utilizadas como fonte de nutrientes têm sido *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis* e *C. tropicalis* (CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997).

Desta forma se torna interessante a utilização da levedura como suplemento nutricional de animais e humano, principalmente com acréscimo de micronutrientes em sua composição. A utilização deste suplemento nutricional pode ser realizada de diversas formas, como mistura de rações para animais e também, como já destacado por Desmonts (1968), através de “pellets”, pó, comprimidos, para entrar na composição de pratos cozidos ou salpicados em iguarias; sob forma de preparações alimentares complexas, como sopas desidratadas, baguetas de pão, patês, biscoitos, chocolates, drágeas, massas alimentares; sob forma de extratos ou autolizados, no estado sólido ou pastoso.

A levedura apresenta um teor de 7,1 – 10,8% de nitrogênio na M.S., proporcionando um teor de proteína bruta ($N \times 6,25$) variando de 44 – 67% M.S. (WHITE, 1954). Apesar do valor nutritivo da levedura variar com o substrato e com as condições de propagação, sua proteína apresenta boa digestibilidade, com uma variação de aproximadamente 77 a 95% (KIHLEBERG, 1972; WASLIEN, 1975).

O teor de fibras em leveduras *Saccharomyces cerevisiae* recuperadas do vinho pode variar entre 0,13 a 2,35%, como apresentado por Berto (1997). A fibra alimentar é de relevante interesse na alimentação humana, devido principalmente ao efeito benéfico da fibra solúvel como agente hipocolesterolêmico (COSTA; SGARBIERI, 1997).

Segundo Eddy (1958) a composição dos minerais representam 1,9 a 10% do peso seco das leveduras. As leveduras comerciais, como de cerveja, panificação e levedura para alimento animal e humano, apresentam valores de ferro entre 3 – 100 mg 100 g⁻¹ de matéria seca, zinco de 4 a 130 mg 100 g⁻¹ de matéria seca (HARRISON, 1971) e selênio de 24,21 mg 100 g⁻¹ de matéria seca (CABALLERO-CÓRDOBA; PACHECO; SGARBIERI, 1997).

2.3.1 NUTRIÇÃO ANIMAL E HUMANA

2.3.1.1 PROTEÍNAS

De acordo com a USDA (1989), as recomendações nutricionais (RDA) e USDA (2005) as ingestões de referência dietética (DRIs) para um adulto saudável, para proteína são $0,8 \text{ g kg}^{-1}$ de peso corpóreo. Para se obter a quantidade de proteína recomendada, os seres humanos necessitam que a proteína da dieta corresponda aproximadamente 10 a 15% da ingestão total de energia. Entretanto, durante o estresse hipermetabólico e na doença, estas necessidades de proteína são aumentadas (ETTINGER, 2002).

O requerimento nutricional de cavalos segundo a National Research Council (1989), varia de acordo com o momento fisiológico (gestação, lactação, etc.), ao tipo de trabalho físico e de prova esportiva, como apresentado na tabela 1 para um animal de aproximadamente 400 kg.

Tabela 1 – Requerimento diário de proteínas para cavalos (400kg para manutenção)

Animal	Peso (kg)	Proteína (g)
Manutenção	400	536
Gestação	9 meses	654
	10 meses	666
	11 meses	708
Lactação	3 meses	1141
	acima de 3 meses	839
Trabalho	Leve	670
	Moderado	804
	intenso	1072
Crescimento	4 meses	675
	moderado	643
	rápido	725
	12 meses (moderado)	700
	12 meses (rápido)	770
	18 meses (sem treinamento)	716
	18 meses (com treinamento)	970
	24 meses (sem treinamento)	650
	24 meses (com treinamento)	913

Fonte: USDA (1989).

A proteína é um nutriente de vital importância para o ser vivo, enquanto a estrutura da planta é formada principalmente de carboidrato, a do animal e ser

humano é construída de proteína, de modo, que a sua deficiência poderá ocasionar diversos problemas, como nos seres humanos se destaca o Kwashiorkor, doença derivada de uma palavra africana, que tem o significado de doença que afeta o primeiro filho após o segundo ter nascido (ETTINGER, 2002).

2.3.1.2 FIBRAS

De acordo com Krummel (2002), a ingestão recomendada de fibra é 25 a 30 g diários para adultos, sendo 6 a 10 g fibras solúveis.

Diversas evidências sugerem que o carboidrato da dieta, o qual se destacam os oligossacarídeos não absorvíveis e a fibra exerçam um impacto relevante na fisiologia humana, de forma que é reconhecido que os carboidratos específicos modulam toda a dinâmica da energia corpórea e afetam os processos de doença. As fibras insolúveis tem a capacidade de se ligarem a sais biliares e reduzem a absorção de gordura e colesterol (ETTINGER, 2002), enquanto, as fibras solúveis diminuem especificamente o colesterol LDL (ETTINGER, 2002; KRUMMEL, 2002). As fibras em estudos iniciais estão sendo analisadas com muita atenção devido ao possível papel protetor na prevenção de câncer de cólon, reto, mama e ovários, considerando a importância da ingestão de fibras dietéticas em influenciar a ingestão de carne, gordura e carboidratos refinados, e vários nutrientes e macronutrientes com conhecido impacto sobre a incidência de câncer (FRANKMANN, 2002).

2.3.1.3 MINERAIS

2.3.1.3.1 FERRO

As recomendações nutricionais (RDA) segundo USDA (1989) de ferro podem diferir de acordo com o sexo e a idade, sendo 10 mg para homens adultos e mulheres na pós-menopausa e 15 mg para mulheres na idade fértil (Tabela 2), entretanto de acordo com USDA (2005) as DRIs sugerem para crianças de 1 – 3 anos 7 mg e 4 – 8 anos 10 mg; homens 9 - 13 anos 8 mg, 14 – 18 anos 11 mg e 19 - >70 anos 8 mg; mulheres 9 – 13 anos 8 mg, 14 – 18 anos 15 mg, 19 – 50 anos 18 mg, 51 - > 70 anos 8mg; grávidas 14 – 50 anos 27 mg e mulheres na amamentação 14 – 18 anos 10 mg, 19 – 50 anos 9 mg. Durante a lactância e adolescência as necessidades são maiores, diminuindo após o estirão do crescimento na adolescência entre os homens, enquanto nas mulheres permanecem elevados até a transição para a menopausa, aumentando durante a gravidez, porém não durante a lactação (USDA, 1989).

O requerimento nutricional de ferro para eqüinos, pode variar por diversos fatores, como o momento fisiológico, trabalho, entre outros, como destacado pela National Research Council (1989), na Tabela 3.

Os bovinos de corte apresentam de acordo com a National Research Council (1996), um requerimento nutricional de 50 ppm de ferro, expresso na matéria seca.

A necessidade de ferro para leitões de 1 a 5 kg e de 20 a 50 kg de peso vivo é variável, de 100 e 60 mg kg⁻¹ e 80 mg kg⁻¹ para leitões pós desmame (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1998).

Tabela 2 – RDA do ferro durante o ciclo da vida.

	Idade (anos)	Ferro (mg / dia)
Bebês	0,5 – 0,5	6
	0,5 – 1,0	10
Crianças	1 – 3	10
	4 – 6	10
	7 - 10	10
Homens	11 - 14	12
	15 - 18	12
	19 – 24	10
	25 – 50	10
	51 +	10
Mulheres	11 - 14	15
	15 - 18	15
	19 – 24	15
	25 – 50	15
	51 +	10
Gestantes		30
Lactantes	Primeiro ano	15

Fonte: USDA (1989).

Tabela 3 – Requerimento de ferro para eqüinos.

Concentração adequada na dieta total					
Elemento	Manutenção	Gestação e lactação	Potros em crescimento	Trabalho	Tolerância Máxima
Ferro (mg kg ⁻¹)	40	50	50	40	1000

Fonte: National Research Council (1989).

O ferro é um elemento essencial ao ser humano, entretanto, a deficiência nutricional de ferro e a anemia por deficiência de ferro ainda persistem no ano 2000, sendo está a doença nutricional mais comum do mundo, mesmo existindo uma grande disponibilidade de alimentos ricos em ferro. A anemia pode ser combatida pelo fornecimento de altas doses de suplementos na forma de sulfato ou gliconato ferrosos até a normalização dos parâmetros sangüíneos (ANDERSON, 2002). Os sintomas da anemia podem ser variados, podendo resultar quando não tratada em alterações cardiovasculares e respiratórias, que às vezes levam a insuficiência cardíaca (KASDAN, 2002)

2.3.1.3.2 ZINCO

Segundo a USDA (1989), as recomendações nutricionais (RDA) de zinco podem deferir de acordo com o sexo e a idade, sendo 15 mg / dia para adultos do sexo masculino e 12 mg / dia para adultos do sexo feminino (Tabela 4), entretanto,

de acordo com a USDA (2005), as DRIs sugerem para crianças de 1 – 3 anos 3 mg, 4 – 8 anos 5 mg; homens 9 – 13 anos 8 mg, 14 - > 70 11 mg; mulheres 9 - 13 anos 8 mg, 14 – 18 anos 9 mg, 19 - > 70 anos 8 mg; grávidas 14 – 18 anos 12 mg, 19 – 50 anos 11 mg; mulheres na amamentação 14 – 18 anos 13 mg, 19 – 50 anos 12 mg.

O requerimento nutricional de zinco para eqüinos, apresenta-se em torno de 40 mg kg⁻¹ em diferentes situações, como o momento fisiológico, trabalho, entre outros, com uma tolerância máxima de 500 mg kg⁻¹, como destacado pela National Research Council (1989), na Tabela 5.

Os bovinos de corte apresentam de acordo com a National Research Council (1996), um requerimento nutricional de 30 ppm de zinco, expresso na matéria seca.

Os suínos segundo National Research Council (1998), apresenta uma diferente exigência de zinco de acordo com a faixa de peso, sendo 3 – 5 kg 100 mg kg⁻¹, 5 – 10 kg 100 mg kg⁻¹, 10 – 20 kg 80 mg kg⁻¹, 20 – 50 kg 60 mg kg⁻¹, 50 – 80 kg 50 mg kg⁻¹ e 80 – 120 50 mg kg⁻¹.

Tabela 4 – RDA do zinco durante o ciclo da vida.

	Idade (anos)	Zinco (mg / dia)
Bebês	0,5 – 0,5	5
	0,5 – 1,0	5
Crianças	1 – 3	10
	4 – 6	10
	7 - 10	10
Homens	11 - 14	15
	15 - 18	15
	19 – 24	15
	25 – 50	15
	51 +	15
Mulheres	11 - 14	12
	15 - 18	12
	19 – 24	12
	25 – 50	12
	51 +	12
Gestantes		15
Lactantes	Primeiros 6 meses	19
	Segundo 6 meses	16

Fonte: USDA (1989).

Tabela 5 – Requerimento de zinco para eqüinos.

Concentração adequada na dieta total					
Elemento	Manutenção	Gestação e lactação	Potros em crescimento	Trabalho	Tolerância Máxima
Zinco (mg kg ⁻¹)	40	40	40	40	500

Fonte: National Research Council (1989).

O zinco é um elemento essencial ao ser humano, entretanto, a sua deficiência pode ocasionar problemas sérios de saúde, como destacado resumidamente por Anderson (2002), retardo de crescimento, maturação sexual retardada, hipogonadismo e hipoespermia, alopecia, cicatrização demorada de ferimentos, lesões de pele, apetite prejudicado, deficiências do sistema imunológico, distúrbios de comportamento, lesões oculares, incluindo fotofobia e cegueira noturna e paladar prejudicado. Nos eqüinos, o zinco é constituinte de enzimas relacionadas ao metabolismo de carboidratos, proteínas e queratina, sendo componente básico para os pêlos, pele e cascos, participando também no sistema imunológico e resistência ao estresse.

2.3.1.3.3 SELÊNIO

Segundo a USDA (1989), as recomendações nutricionais (RDA) de selênio podem deferir de acordo com o sexo e a idade, sendo de 70 µg para homens adultos

e 55 µg para mulheres adultas (Tabela 6), porém, de acordo com Anderson (2002), estas necessidades podem aumentar decorrente ao maior consumo de ácidos graxos insaturados na dieta devido à necessidade de atividade antioxidante de selênio. A USDA (2005), sugere uma DRIs para crianças de 1 – 3 anos de 20 µg, 4 – 8 anos 30 µg; homens 9 – 13 anos 40 µg, 14 - > 70 anos 55 µg; mulheres 9 – 13 anos 40 µg, 14 - > 70 anos 55 µg; grávidas 14 – 50 anos 60 µg; mulheres na amamentação 14 – 50 anos 70 µg.

O requerimento nutricional de selênio para eqüinos, apresenta-se em torno de 0,10 mg kg⁻¹ em diferentes situações, como o momento fisiológico, trabalho, entre outros, com uma tolerância máxima de 2 mg kg⁻¹, como destacado pela National Research Council (1989), na Tabela 7.

Os bovinos de corte apresentam de acordo com a National Research Council (1996), um requerimento nutricional de 0,10 ppm de selênio, expresso na matéria seca.

Tabela 6 – RDA do selênio durante o ciclo da vida.

	Idade (anos)	Selênio (μg / dia)
Bebês	0,5 – 0,5	10
	0,5 – 1,0	15
Crianças	1 – 3	20
	4 – 6	20
	7 - 10	30
Homens	11 - 14	40
	15 - 18	50
	19 – 24	70
	25 – 50	70
	51 +	70
Mulheres	11 - 14	45
	15 - 18	50
	19 – 24	55
	25 – 50	55
	51 +	55
Gestantes		65
Lactantes	Primeiros 6 meses	75
	Segundo 6 meses	75

Fonte: USDA (1989).

Tabela 7 – Requerimento de selênio para eqüinos.

Concentração adequada na dieta total					
Elemento	Manutenção	Gestação e lactação	Potros em crescimento	Trabalho	Tolerância Máxima
Selênio (mg kg ⁻¹)	0,10	0,10	0,10	0,10	2

Fonte: National Research Council (1989).

Segundo Anderson (2002), o selênio é um elemento essencial ao ser humano, e a sua deficiência pode ocasionar problemas a saúde, como a doença de Keshan, uma forma de miocardiopatia, a doença de Kashin-Beck, provocada por uma deficiência grave de selênio combinada a uma doença viral e também contribui para a carcinogênese, provavelmente pelo pela falha da GSH-Px em varrer radicais livres, nas células em divisão. Nos eqüinos, o selênio está na base da formação das enzimas com função antioxidante intracelular, responsável pela redução da hidroxidase e lipídio peroxidase, inibindo a formação de radicais livres justamente com a vitamina E.

2.3.2 ACÚMULO DE MINERAIS EM LEVEDURA

Segundo Brady e Duncan (1994) os microrganismos acumulam metais por diferentes processos, como: transporte, biosorção para parede celular e armadilhas em cápsulas extracelular, precipitação e reações de óxido redução.

As células de leveduras são capazes de acumular vários metais pesados, preferencialmente os com potencial de toxicidade e de valores, como é o caso Cu^{2+} , Co^{2+} e Cd^{2+} . Elas mantêm esta habilidade para acumular metais pesados sob grande variedade de condições ambientais (BRADY; DUNCAN, 1994).

As leveduras enriquecidas com microelementos, sob condições bem definidas, são capazes de conter tais nutrientes em teores várias vezes maiores do que os níveis normais e fixá-los como fonte orgânica. As leveduras em sete preparações apresentavam 60 ppm de Fe; 27 ppm de Cu; 150 ppm de Zn; 0,4 ppm de Se; 0,01 ppm de Zr; 20 ppm de Al e 0,01 ppm de Bi, atingindo após enriquecimento valores de 1000 a 10000 ppm de Fe; 500 a 1000 ppm de Cu; 500 a 5000 ppm de Zn; 1000 a 6000 ppm de Se; 800 a 5000 ppm de Zr; 500 a 1500 ppm de Al e 200 a 1200 ppm de Bi (HEGÓCZKI, 1994).

A suspensão celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ferro apresentou um valor de ferro de 5% em relação aos sólidos totais, sendo que 89% do ferro encontrava-se no sobrenadante, enquanto apenas 13% fazia parte da massa celular, entretanto, pode se notar que a soma das porcentagens ultrapassa 100%, ou seja, 102 %, isto possivelmente deva ter ocorrido por questão de erro metodológico, ou o que é menos provável, que o autor não tenha computado o valor de ferro presente na levedura inicial, na soma de ferro da suspensão inicial total. O material celular após ser desintegrado, continha um teor de ferro 3 vezes maior na parede celular do que no citoplasma da célula, região celular que apresentava um teor de ferro nas organelas muito inferior do que no resto do citoplasma (peptídeos, aminoácidos, etc), mostrando assim que parte do ferro absorvido pelas leveduras estão livres no interior das células (GAUDREAU; TOMPKINS; CHAMPAGNE, 2001).

Blumer (2002) avaliou a capacidade de adsorção de ferro (sulfato ferroso) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* vivas visando à incorporação em ração animal, e observou os seguintes resultados: a) no teste de tolerância da levedura em concentração de ferro, a concentração escolhida foi de 5,36 mmoles de $\text{Fe}^{+2} \text{L}^{-1}$ em função de inibição de crescimento e tempo para obtenção de massa satisfatória; b) após cinco fermentações consecutivas para enriquecimento da levedura com Fe^{+2} , a mesma apresentou um acúmulo crescente de Fe^{+2} na levedura a cada fermentação, iniciando-se por 1,43 mmoles de $\text{Fe}^{+2} \text{kg}^{-1}$ de matéria seca para 6,68 mmoles de $\text{Fe}^{+2} \text{kg}^{-1}$ de matéria seca após cinco fermentações consecutivas. O mesmo autor observou que a adsorção de Fe^{+2} por células mortas também ocorreu, de modo, com que esta possa ser utilizada como um meio rápido de menor enriquecimento.

O meio contendo Fe^{+2} em concentrações crescentes, torna-se inibidor do crescimento das colônias, verificado pelo retardamento do aparecimento até a total inibição em concentrações de 1000 ppm de Fe^{+2} , sendo que a maior concentração de Fe^{+2} em que se verificou crescimento de colônias em placas de Petri, foi de 14,28 mmoles L^{-1} ou 800 ppm de Fe^{+2} após 168 horas de cultivo (BLUMER, 2002).

2.3.3 UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA NA ALIMENTAÇÃO DE HUMANOS E ANIMAIS

A levedura de cerveja, viva ou morta, é utilizada há muitos anos, para alimentação dos cavalos de trato, pelos cervejeiros. A levedura é consumida, desde tempos mais remotos pelo homem, entretanto, sem saber, através de frutas, bebidas alcoólicas, pão, etc. Na Guerra Mundial de 1914, que austríacos e alemães,

submetidos ao bloqueio dos aliados, produziram e utilizaram em grande escala a levedura, seca, morta, como alimento supletivo (DESMONTS, 1968).

Os gêneros que se destacam na produção das leveduras alimentares são: *Saccharomyces* e *Torula (Cândida)*, sendo a segunda (no setor da indústria do açúcar e álcool), cultivada em melaço ou vinhaça, a principal que se deve contribuir para a alimentação humana. As leveduras de recuperação do gênero *Saccharomyces* podem apresentar grandes variações em suas composições, fazendo com que os mesmos sejam reservados a alimentação animal. O coeficiente de digestibilidade para o homem, da levedura fragmentada, apresenta-se na ordem de 94% para os protídeos, e a levedura viva, também situasse acima dos 50% (DESMONTS, 1968).

Os minerais são de relativa importância para os animais domésticos, sendo que na maioria das vezes a baixa produção animal no nosso país é atribuída à falta de proteína e energia, principalmente na época das secas, entretanto, em determinados momentos, mesmo com disposição de alimentos em abundância a produtividade fica a baixo do ideal, devido geralmente à deficiência mineral. As deficiências minerais são aumentadas nas épocas de grande disponibilidade de forragem, pois mesmo sendo a composição das plantas melhor, as exigências são maiores devido à maior ingestão de matéria seca pelo animal, por outro lado, na época das secas, as plantas são na maioria das vezes pobres em minerais, porém o desempenho animal é pequeno, pelo motivo de que este não recebe proteína e energia em quantidades suficientes para sustentar uma produção adequada e mesmo as vezes insuficiente para manter o peso (ZANETTI, 2001).

A levedura apresenta capacidade de quelatar minerais, entretanto, estes devem ser fornecidos em quantidades adequadas. Os minerais quando quelatados

apresentam grande importância no aumento da eficiência reprodutiva dos animais e na redução da mastite decorrente da melhoria nos tecidos epiteliais (MACHADO, 1997).

A palavra quelato é oriunda do grego “chele” cuja tradução é pinça ou garra, isto se deve as estruturas dos quelatos, os quais são resultados do compartilhamento de elétrons entre um metal e um ligante. Um ligante é usualmente um ânion ou uma molécula que tenha um átomo com um par de elétrons em valências disponíveis, sendo que ligantes comuns contêm nitrogênio, oxigênio, enxofre, halogênios, ou uma combinação deles decorrente às suas estruturas eletrônicas. Os minerais quelatados possuem ligantes não metálicos, mas orgânicos. Os átomos que podem compartilhar elétrons são chamados de átomos doadores, ligantes com um átomo doador são chamados de monodentados, e aqueles com dois ou mais são os polidentados, entretanto, apenas o segundo podem formar quelatos, por estes poderem ligar (agarrar) um metal entre seus dentes eletrônicos, ou suas pinças (VIEIRA, 2005).

A inter-relação dos elementos minerais é bem conhecida, a qual pode ser sinérgica, por não causar efeitos deletérios e pouco percebidos, ou antagônica, por ocasionar sintomas de deficiência e detectada mais freqüentemente. A absorção dos minerais presentes em uma mistura depende em parte, da inter-relação existente entre eles, sendo que os cátions dos sais minerais inorgânicos dissolvidos no sistema digestivo do animal são expostos à influência da camada externa de elétrons de outros minerais ionizados. Desta forma, resultará numa competição que interfere na absorção dos minerais presentes á nível de trato digestivo. Os efeitos negativos dos minerais inorgânicos ionizáveis no sistema digestivo podem ser eliminados pela utilização de minerais na forma de quelatos, devido a estarem

ligados quimicamente a um composto orgânico não ionizável no sistema digestivo, que bem preparados, não apresentam antagonismos e nem formação de compostos insolúveis (CAZES; SOARES, 2004)

Os minerais quelatados geralmente são mais caros que fontes inorgânicas do mesmo mineral, e o aumento da inclusão destas fontes inorgânicas é tradicionalmente considerado mais econômico, entretanto, há informações que em algumas situações os minerais quelatados podem atingir fins biológicos que os inorgânicos não podem. Na absorção dos produtos da digestão protéica, não apenas aminoácidos são absorvidos, em geral di e tri-peptídeos são mais rapidamente absorvidos do que aminoácidos livres, assim sendo, aminoácidos e peptídeos contendo minerais tem potencial para serem rapidamente absorvidos e transportados de forma integral, assim, não podem ser descartadas as possibilidades de diferentes ações sobre o metabolismo destas moléculas complexas (VIEIRA, 2005).

Os métodos de suplementação mineral apresentam-se das mais variadas formas dentro do prisma nutricional humano e animal, de modo que Zanetti (2001), aponta que o grande problema após a detecção de uma deficiência mineral de bovino a pasto é a sua suplementação adequada, o método mais utilizado é a suplementação através de uma mistura mineral completa, composta de macro e microelementos, que podem no caso de animais estabulados ser adicionados à dieta, facilitando a sua suplementação. Os métodos de suplementação mineral podem ser divididos em dois grupos, indiretos e diretos: o primeiro destaca a correção do pH do solo, adição de fertilizantes, cultivo de determinadas espécies e ingestão de terra; o segundo são os mais utilizados e podem ser divididos em

ingestão forçada ou “ad libitum”, sendo o último, o principal, o mais comum é a mistura completa, havendo ainda os blocos e as misturas com cereais.

Os microelementos de fontes orgânicas são mais adequados e vantajosos para os organismos animais, incluindo seres humanos, do que aqueles obtidos de fontes inorgânicas. Os microelementos de fontes orgânicas, com destaque para as leveduras, têm melhor coeficiente de absorção, são menos tóxicos, têm melhor sabor e são mais facilmente distribuídos do que aqueles obtidos de fontes inorgânicas. As leveduras enriquecidas com microelementos e seu extrato solúvel em água podem ser aplicadas como aditivo em quase toda área da indústria de alimentos (HEGÓCZKI, 1994).

Em seu trabalho Desmonts (1968), citou diversas doses de suplemento a base de levedura utilizada na alimentação humana, sendo usado em crianças subnutridas e cobertas de absessos até 30 g / dia. A mistura da levedura seca nas rações animais, normalmente, pode variar de 6 a 20% sobre o peso final da ração (LAHR FILHO; GHIRALDINI; ROSSEL, 1996)

Em casos relatados por Desmonts (1968), as leveduras (com destaque para as do gênero *Saccharomyces*) foram utilizadas por adultos, crianças lactantes, crianças e adolescentes em fase escolar, mulheres gestantes e nutrízes, obtendo uma boa aceitação, propiciando dependendo do caso, além de uma fonte protéica, melhoras significativas de manifestações de doenças de origem nutricionais e infecciosas por fortalecimento do sistema imunológico.

Segundo Cazes e Soares (2004), o zinco na forma de quelato diminui a incidência de doenças podais, aumentam a dureza do casco, por desempenhar um importante papel na resposta imunológica aos agentes infecciosos.

A levedura utilizada na alimentação animal deve ser tratada e inativada para evitar perturbações digestivas decorrentes de fermentações anormais no aparelho digestivo dos animais (JARDIM, 1976). Entretanto, Baptista (2001) destaca a importância das leveduras serem adicionadas vivas no substrato, como probiótico.

As leveduras *Saccharomyces cerevisiae* vivas, ao serem adicionadas na dieta de frangos de corte, na concentração de 0,1% e 5 mg.kg⁻¹ de aflatoxinas, obtiveram ganho de peso de cerca de 15% maior do que aqueles que receberam dietas contaminadas com aflatoxinas, sem a adição de leveduras. Os pesos relativos dos órgãos internos, fígado, coração e proventrículo aumentaram consideravelmente, com a adição de 5 mg.kg⁻¹ de aflatoxinas, entretanto, nos animais que receberam dietas contaminadas com 5 mg.kg⁻¹ da toxina e a adição de 0,1% de leveduras vivas, os pesos relativos destes órgãos foram semelhantes ao controle (STANLEY et al., 1993)

O tempo em que a levedura consegue manter-se vivas em um determinado substrato é de relevante importância para se determinar o tempo de estocagem sobre o mesmo. Baptista (2001) destaca que a viabilidade das leveduras adicionadas em grãos de milho, mantidos em armazenamento, não sofreu influência da concentração de células aplicadas, mas o teor de umidade do milho interferiu, de modo que, os substratos com maiores teores de umidade apresentaram menores médias de viabilidade. Assim, a viabilidade de células de leveduras permaneceu constante até 30 dias. Aos 90 dias em armazenamento houve uma redução do número de células vivas, chegando aos 110 dias com uma viabilidade de aproximadamente 70%.

2.4 MICRORGANISMOS E ASPECTOS AFLATOXICOGÊNICOS

Os microrganismos podem acarretar perda da qualidade dos alimentos destinados aos seres vivos, sendo que, segundo Lacey (1989), uma das causas da perda da qualidade dos grãos de cereais armazenados são decorrentes da contaminação fúngica dos grãos, que, ao se desenvolverem, podem causar perdas nutricionais devido à transformação ou degradação de nutrientes, consumo da energia bruta, consumo da matéria seca e a possibilidade de fungos toxigênicos se desenvolverem e produzirem metabólitos tóxicos (micotoxinas) ao homem e aos animais.

As aflatoxinas são metabólitos fúngicos secundários produzidos por três espécies relacionadas: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* e *A. nomius*, sendo que *A. flavus* produz apenas as toxinas B₁ e B₂, e os outros dois produzem B₁, B₂, G₁, G₂ (FRISVAD; THRANE, 1995).

Segundo Ellis et al. (1991), a biosíntese das aflatoxinas pode ser afetada por diversos fatores, dos quais se destacam os biológicos, como: variabilidade da linhagem, microflora competitiva, tamanho do inóculo; os químicos, como: substrato, nutrientes, agentes antifúngicos; e os ambientais, como: temperatura, atividade de água, atmosfera, luz, pH.

Os fungos estão distribuídos tanto no solo como no ar, assim, a infestação do amendoim com fungos toxigênicos pode ocorrer antes mesmo dele ser removido do solo ou durante a colheita, secagem e estocagem, mas, o fungo pode também ter sua entrada dentro do grão facilitada por danos causados por nematóides, cupins e outros animais (FAO, 1979). Segundo Jelinek (1988), os produtos mais suscetíveis à

contaminação por aflatoxinas, em ordem decrescente, são: o amendoim, o milho, o caroço de algodão e a castanha-do-Brasil.

As aflatoxinas podem afetar a saúde dos organismos vivos, por efeitos bioquímicos e biológicos. Bioquimicamente podem afetar o metabolismo de energia, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e das proteínas. Biologicamente podem apresentar efeitos como carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade (ELLIS et al., 1991; BRADBURN et al., 1993), hepatotoxicidade e aflatoxicoses (ELLIS et al., 1991).

2.4.1 DESINFEÇÃO DE ALIMENTOS ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO

Atualmente existem diversas técnicas para se conservar alimentos, das quais se destacam: conservação pelo calor, frio, desidratação, liofilização, salga, defumação, fumigação e irradiação. Os processos de irradiação de alimentos segundo Wiendl (1978) podem ser divididos em quatro grupos, que diferem principalmente pela dose de radiação ionizante aplicada, os quais são: esterilização dos alimentos com altas doses; irradiação de alimentos com doses pasteurizantes; desinfestação de grãos e produtos armazenados; e inibição do brotamento e retardamento da maturação.

A irradiação de alimentos, assim como outras técnicas de processamento de alimentos, induz certas alterações, que podem modificar a composição química e o valor nutritivo dos alimentos. A extensão e natureza destas alterações dependem da

composição do alimento, da dose de radiação e de fatores como temperatura e a presença ou ausência de oxigênio do ar WIENDL (1984).

2.4.2 MÉTODOS DE DESCONTAMINAÇÃO E REDUÇÃO DE DANOS CAUSADOS POR AFLATOXINAS

Métodos visando descontaminação de lotes contaminados são utilizados, dos quais se destacam os métodos físicos e químicos (PATTINSON; CROWTHER; NOUBEY, 1968). A levedura viva (*Saccharomyces cerevisiae*) pode ser utilizada para a alimentação, tendo importante efeito funcional de metabólico ou probiótico (MACHADO, 1997). Segundo Baptista (2001) as leveduras vivas foram capazes de reduzir os danos ocasionados pelas aflatoxinas em nível celular.

Segundo Sullivan, Kuhl Jr. e Holder (1978), a explicação para a capacidade das leveduras poderem neutralizar efeitos das aflatoxinas poderia ser que há um incremento de enzimas que podem contribuir para a melhor utilização dos alimentos. Cooney (1980) destaca a possibilidade de que *Saccharomyces cerevisiae* suprima a severidade de aflatoxicoses através de quelação, ligando-se com as aflatoxinas sendo eliminadas pelo trato intestinal.

Ao adicionar 0,1% de leveduras vivas a dieta contaminada com aflatoxina, foram observados aumentos nas atividades das enzimas, alanina transaminase, aspartato aminotransferase, lactato desidrogenase e creatina fosforoquinase, apontando que a severidade das aflatoxinas foi reduzida, assim, aumentando a biodisponibilidade de nutrientes (STANLEY et al., 1993).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAL

Os experimentos foram realizados em conjunto com o Laboratório de Irradiação de Alimentos e Radioentomologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo e o Setor de Açúcar e Álcool do Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo.

3.2 MICRORGANISMO

O microrganismo utilizado nesta pesquisa foi a linhagem de levedura espécie *Saccharomyces cerevisiae* Y904 (AB Brasil – Pederneiras – SP), desidratada, viva (80% de viabilidade celular), mantida sob vácuo, obtida no comércio local.

3.3 MEIOS DE CULTURA

3.3.1 MEIOS DE MANUTENÇÃO E DE REATIVAÇÃO DAS CÉLULAS DESIDRATADAS

Para a realização dos experimentos, foram necessárias as utilizações de três meios de cultura (Tabela 8 e 9), com a função de manutenção e reativação das células desidratadas. Na tabela 8, são destacados os componentes e suas quantidades utilizadas nos meios de cultura YEPD ágar “Yeast extract peptone dextrose agar”, para experimentos de inibição e manutenção da linhagem, sendo que, foram adicionados fontes de ferro ou zinco em diferentes concentrações, de acordo com os respectivos experimentos.

Tabela 8 - Meios de cultura YEPD ágar “Yeast extract peptone dextrose agar” com fontes de ferro ou zinco, para experimentos de inibição e manutenção da linhagem em diferentes concentrações.

Componente	Quantidade
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Dextrose	50 g
Ágar	20 g
H ₂ O destilada	1.000 mL

Experimento com fonte de ferro

adicionou FeSO₄.7H₂O 200 mg, 400 mg, 800 mg, 1.000 mg ou
1200 mg de Fe L⁻¹

Experimento com fonte de zinco

adicionou ZnSO₄.7H₂O 200 mg, 400 mg, 800 mg, 1.000 mg ou
1200 mg de Zn L⁻¹

Tabela 9 - Meio de cultivo YEPD líquido “Yeast extract peptone dextrose” para reativação da linhagem comercial.

Componente	Quantidade
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Dextrose	20 g
H ₂ O destilada	1.000 mL

3.3.2 MEIO DE CULTIVO PARA FERMENTAÇÃO

Para realização do processo fermentativo, foram necessários as utilizações dos meios de cultivo YEPD líquido “Yeast extract peptone dextrose”, com adição de ferro e zinco de acordo com o experimento (Tabela 10).

Tabela 10 - Meio de cultivo YEPD líquido “Yeast extract peptone dextrose” para fermentação com fonte de ferro ou zinco.

Componente	Quantidade
Extrato de levedura	10 g
Peptona	10 g
Dextrose	50 g
H ₂ O destilada	1.000 mL

Experimento com fonte de ferro

adicionou FeSO₄.7H₂O 1,4934 g L⁻¹ ou 300 mg de Fe L⁻¹

Experimento com fonte de zinco

adicionou ZnSO₄.7H₂O 1,3194 g L⁻¹ ou 300 mg de Zn L⁻¹

3.4 VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DOS MICRONUTRIENTES AO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA LEVEDURA

A levedura foi reativada em tubos de cultura esterilizados contendo 5 mL de meio de cultivo YEPD (Tabela 9) e incubada a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 24 horas.

Posteriormente foram realizadas diluições em série, a partir das culturas reativadas, com água destilada esterilizada até concentração desejada. O plaqueamento em meios de cultura YEPD ágar esterilizado contendo fontes de Fe ou Zn em diversas concentrações de acordo com os respectivos experimentos (Tabela 8), foram feitos pela técnica de superfície (10 placas para cada concentração), com incubação a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ até 360 h (Tabela 11).

Após este período as leveduras foram contadas em câmara de Spencer visando obter a concentração ótima dos micronutrientes ao crescimento e desenvolvimento das leveduras (BELLUCO, 2001; BLUMER, 2002).

Tabela 11 – Esquema dos experimentos com fontes de ferro ou zinco.

Experimentos	Quantidade				
(1)					
YEPD agar	200	400	800	1000	1200
+	(mg Fe L ⁻¹)	(mg Fe L ⁻¹)	(mg Fe L ⁻¹)	(mg Fe L ⁻¹)	(mg Fe L ⁻¹)
fonte de Fe					
(2)					
YEPD agar	200	400	800	1000	1200
+	(mg Zn L ⁻¹)	(mg Zn L ⁻¹)	(mg Zn L ⁻¹)	(mg Zn L ⁻¹)	(mg Zn L ⁻¹)
fonte de Zn					

3.5 FERMENTAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE MICRONUTRIENTES EM LEVEDURA

A reativação e propagação da levedura desidratada visando a fermentação alcoólica foi realizada através da inoculação de 3,0 g de matéria seca de levedura em 21 frascos erlenmeyer de 500 mL de capacidade, contendo cada um 100 mL de meio de cultivo YEPD líquido esterilizado (Tabela 9) e incubação a $30 \pm 1\text{C}^\circ$ por 18 h, sob agitação de 90 rpm, em movimento circular, em “shaker New Brunswick, modelo G53”. Após este período, os frascos foram decantados a frio ou centrifugados em centrífuga IEC – PR 6000 a 480 G por 5 min. Dos 21 frascos, 3 foram separados para quantificação da concentração celular na suspensão e teor de ferro e zinco nas leveduras dos respectivos experimentos. Os 18 frascos restantes

receberam 100 mL de meio YEPD líquido (Tabela 10) com adição de dosagem ótima de micronutrientes (ferro e zinco, previamente definidos) de acordo com o experimento (item 3.4) e acondicionados a 30 ± 1 C°, sob agitação de 90 rpm.

Deste modo, constatando-se o término da fermentação através de monitoramento por pesagens periódicas dos frascos (MATIAZI, 1995), sedimentação e tiras de glicose, suspensões dos frascos foram decantadas a frio ou centrifugados. Dentre os 18 frascos, 3 foram separados para quantificação da concentração celular na suspensão e teor de ferro e zinco nas leveduras dos respectivos experimentos. Este procedimento foi realizado até completar 6 ciclos fermentativos, sendo que ao final deste, foram avaliados além da concentração celular na suspensão de células, e teor de ferro e zinco nas leveduras nos respectivos experimentos, também a viabilidade celular e o teor de proteínas.

Tabela 12 – Esquema dos experimentos com fontes de ferro ou zinco.

Experimentos		Ciclos fermentativos					
(1)							
Reativação	YEPD	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
	+						
fonte de Fe							
(2)							
Reativação	YEPD	1º ciclo	2º ciclo	3º ciclo	4º ciclo	5º ciclo	6º ciclo
	+						
fonte de Zn							

As leveduras referência armazenadas sobre vácuo, e as obtidas do último ciclo fermentativo dos respectivos experimentos foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura e espectrometria por energia dispersiva.

3.5.1 LEVEDURA REFERÊNCIA E DETERMINAÇÃO DOS MICROELEMENTOS FERRO e ZINCO EM YEPD

Uma alíquota de levedura desidratada, recém amostrada da embalagem sob vácuo foi analisada para servir como referência dos teores de micronutrientes do fermento original.

Os componentes extrato de levedura, peptona e dextrose foram avaliados em relação aos seus componentes, ferro e zinco, para balanço de elementos presentes no meio fermentativo (Apêndices C e D).

3.6 VALOR NUTRICIONAL DA LEVEDURA ENRIQUECIDA

Com a determinação dos teores de micronutrientes (ferro e zinco) e proteínas da levedura viva foi possível uma comparação das quantidades destes elementos presentes nas leveduras obtidas em relação à recomendação diária para eqüinos (cavalos), gado de corte e leite, suínos e seres humanos como suplemento nutricional.

3.7 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Nos experimentos foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 0,05 de probabilidade.

3.8 AVALIAÇÃO DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE CÉLULAS VIÁVEIS

3.8.1 OBTENÇÃO DE SUBSTRATO ESTERILIZADO POR IRRADIAÇÃO

3.8.1.1 SUBSTRATO

O substrato utilizado nesta pesquisa foi grãos de milho, obtidos comercialmente na cidade de Piracicaba. Neste substrato foi examinado sua atividade de água (a_w) e umidade, segundo Brasil (1992).

3.8.1.2 ESTERILIZAÇÃO ATRAVÉS DE IRRADIAÇÃO

Os grãos de milho foram submetidos à irradiação gama (Cobalto 60), em dosagem de até 12 kGy para alterar ao mínimo as suas características físico-químicas e torná-los estéreis (BLANK; CORRIGAN, 1995). As dosagens de irradiação 4, 8 e 12 kGy foram avaliadas com o intuito de obter a esterilidade do material, através da verificação da presença de contaminantes (microbiológicos, fungo, bactéria e levedura), pelo método de plaqueamento direto de acordo com Lucca Filho (1987) visando avaliação de fungo, e uma proporção de 1:1 em massa de milho irradiado (dosagens 0, 4, 8 ou 12 kGy) e água destilada esterilizada, foram triturados e homogeneizado em homogeneizador e uma alíquota foi diluída até concentração adequada e plaqueada por superfície, em duplicata, em meios Agar Padrão para Contagem (PCA) e incubadas a 35°C por 72 h e YEPD a 30°C por 120 h, visando avaliação de bactérias e leveduras respectivamente.

3.8.2 INOCULAÇÃO DA LEVEDURA NO SUBTRATO

Para inoculação da levedura viva no substrato foi utilizada uma solução de sacarose 0,5% (p/p), para servir de veículo de adesão e alimento para a levedura e obtenção de umidade de 14%. Posteriormente, foram adicionadas células de levedura com concentração (1%) suficiente para cobrir superficialmente todo o substrato, o qual foram uniformizados e homogeneizados.

3.8.3 CONDUÇÃO DO ARMAZENAMENTO

O substrato inoculado com leveduras vivas foi acondicionado em frascos com tampas vedadas.

O experimento foi acondicionado pôr cinco períodos: 0, 15, 30, 90 e 110 dias após a inoculação, apresentando 6 repetições por período de coleta, para análise de viabilidade celular.

Tabela 13 – Esquema do experimento de avaliação do período de armazenamento de células viáveis.

Período de coleta para análise de viabilidade celular					
(dias)					
Experimento 1	0	15	30	90	110

3.8.4 ANÁLISE ESTÁTISTICA

No experimento foi utilizado o delineamento experimental inteiramente casualizado. Os resultados foram submetidos à análise de variância e teste de comparação de médias de Tukey, ao nível de 0,05 de probabilidade.

3.9 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

3.9.1 ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)

A determinação da atividade de água (a_w) foi realizada de acordo com as instruções do equipamento Determinador de Atividade de Água da marca Testo 650 (TESTO AG, Lenzkirch, Alemanha).

3.9.2 VIABILIDADE CELULAR

A determinação de viabilidade celular em células de levedura foi realizada através do método por coloração com azul de metileno (PIERCE, 1970).

3.9.3 CONCENTRAÇÃO DE LEVEDURA

A determinação da concentração de levedura expressa em matéria seca foi realizada através da levedura úmida obtida do final das etapas de reativação e fermentação e acondicionadas em estufa a 100 - 105°C por 8 h (até peso constante).

3.9.4 ANÁLISE DE MICRONUTRIENTES

O teor de ferro e zinco na matéria seca foi determinado pela técnica de fluorescência de raios X não dispersiva, também caracterizada por análise multielementar instrumental de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF, energy dispersive X-ray fluorescence) (NASCIMENTO FILHO, 2006).

A técnica se baseia na medida das intensidades dos raios X emitidos pelos elementos químicos da amostra, quando excitada por raios X emitidos por uma fonte radioativa. Um elemento de uma amostra quando excitado, tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, conseqüentemente, os elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. A transição eletrônica representa uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de raio X, de energia característica e definida para cada elemento. Desta forma, pode se definir a análise por fluorescência de raios X em três fases: excitação dos elementos que constituem a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X.

A técnica de ED-XRF é utilizada para análise qualitativa e quantitativa, podendo atingir limites de detecção da ordem de 1 a 20 mg kg⁻¹ para amostras sólidas (sem tratamento químico) e da ordem de 1 a 20 µg kg⁻¹ para amostras líquidas (com tratamento de pré concentração).

3.9.5 PROTEÍNA

A determinação do nitrogênio total foi realizada pelo método de Kjeldahl, conforme descrição em Silva (1990), e convertido para proteína (x 6,25).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 VERIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO ÓTIMA DOS MICRONUTRIENTES AO CRESCIMENTO E DESENVOLVIMENTO DA LEVEDURA

Preliminarmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* Y904, desidratada, viva, mantida sobre vácuo, foi reativada e plaqueada em meio contendo concentrações crescentes de ferro ou zinco, possibilitando obter informações referentes à dosagem e crescimento celular (tolerância ao elemento), para a escolha de uma concentração do elemento a ser utilizada no processo fermentativo de enriquecimento.

4.1.1 FERRO

As leveduras inoculadas em placas de Petri contendo 0; 200; 400; 800; 1000; 1200 mg L⁻¹ de Fe em meio de cultura YEPD ágar, foram acondicionadas em estufa à temperatura de 30 ± 1°C e verificadas a cada 24 horas, com intuito de avaliar a

influência da dosagem do Fe em relação ao tempo para quantificação do número de colônias.

Passadas 24 h após a inoculação, as placas contendo 0 (controle) e 200 mg L⁻¹ de ferro apresentavam visível crescimento de colônias de leveduras, sendo que as primeiras continham colônias notoriamente maiores, as quais foram contadas as suas Unidades Formadoras de Colônias (UFC), enquanto nas segundas foram realizadas as contagens de UFC às 48 h.

Após 48 h da inoculação, nas placas com 400 mg L⁻¹ de ferro, já era possível visualizar as colônias de leveduras, entretanto, ainda eram pequenas, necessitando a contagem ser realizada no dia seguinte (72 h).

Nas placas contendo 800 mg L⁻¹ de ferro, as colônias de leveduras apenas foram visíveis após 96 h, e contadas aos 168 h, onde se observou uma queda acentuada nos números de UFC.

Nas concentrações de 1000 e 1200 mg L⁻¹ de ferro, não se observou crescimento de colônias de leveduras até 360 h após a inoculação.

Dentro deste contexto, algumas observações são de relativa importância, como o decréscimo da tolerância das leveduras ao aumento das concentrações de ferro em meio YEPD agar (Tabela 14), retardando o aparecimento e diminuindo o tamanho das colônias.

Tabela 14 - Contagem de colônias de leveduras em diferentes concentrações de ferro.

Tempo de crescimento para contagem (horas)	Ferro (mg L ⁻¹)	Média de número de colônias de leveduras
24	0	0,99x10 ⁸
48	200	1,01x10 ⁸
72	400	1,01x10 ⁸
168	800	2,67x10 ⁵
360	1000	Não houve crescimento
360	1200	Não houve crescimento

Para a determinação do melhor valor de concentração de ferro a ser utilizado no processo fermentativo, foram levados em consideração os parâmetros de crescimento de leveduras e o tempo de formação de colônias. As dosagens de ferro de 200 e 400 mg L⁻¹ de ferro foram aquelas que proporcionaram os maiores crescimentos de colônias, entre o período de 24 – 72 h. O acréscimo da concentração de Fe acarretou um decréscimo acentuado dos números de UFC, sendo que nas concentrações de 1000 e 1200 mg L⁻¹ de ferro não houve crescimento. Na dosagem de 800 mg L⁻¹ de ferro, o tempo de colonização foi consideravelmente lento. Desta forma, a concentração de 300 mg L⁻¹ de ferro, pode ser considerada a mais adequada para ser utilizada no processo fermentativo, por centralizar as concentrações de 200 e 400 mg L⁻¹ de ferro, as quais demonstraram ter maior crescimento em menor tempo, afirmativa que confirma observação por Blumer (2002).

4.1.2 ZINCO

As leveduras inoculadas em placas de Petri contendo 0; 200; 400; 800; 1000; 1200 mg L⁻¹ de Zn em meio de cultura YEPD ágar, foram acondicionadas em estufa à temperatura de 30 ± 1°C e verificadas a cada 24 horas, com intuito de avaliar a influência da dosagem do Zn em relação ao tempo para quantificação do número de colônias.

As placas contendo 0 (controle) e 200 mg L⁻¹ de zinco apresentaram visível crescimento de colônias de leveduras 24 horas após a inoculação, e por as primeiras apresentarem colônias notoriamente maiores, foram contadas as suas Unidades Formadoras de Colônias (UFC), enquanto nas segundas foram realizadas as contagens de UFC às 48 h.

Nas placas com 400 e 800 mg L⁻¹ de zinco, foi possível visualizar as colônias de leveduras 48 h após a inoculação, mas ainda eram pequenas, sendo a contagem realizada no dia seguinte (72 h).

Nas concentrações de 1000 e 1200 mg L⁻¹ de zinco, não se observou crescimento de colônias de leveduras até 360 h após a inoculação.

Dentro deste contexto, algumas observações são de relativa importância, como o decréscimo da tolerância das leveduras ao aumento das concentrações de zinco em meio YEPD ágar (Tabela 15), retardando o aparecimento e diminuindo o tamanho das colônias.

Tabela 15 - Contagem de colônias de leveduras em diferentes concentrações de zinco.

Tempo de crescimento para contagem (horas)	Zinco (mg L ⁻¹)	Média de número de colônias de leveduras
24	0	1,03x10 ⁸
48	200	0,13x10 ⁸
72	400	0,12x10 ⁸
72	800	0,94x10 ⁷
360	1000	Não houve crescimento
360	1200	Não houve crescimento

Os parâmetros de crescimento de leveduras e o tempo de formação de colônias foram levados em consideração para a avaliação do melhor valor de concentração de zinco a ser utilizado no experimento de fermentação.

O acréscimo da concentração de zinco ocasionou um decréscimo acentuado do número de UFC, sendo as dosagens de 200, 400 e 800 mg L⁻¹ de zinco que apresentaram os maiores crescimentos de colônias, em até 72 h, enquanto que nas dosagens de 1000 e 1200 mg L⁻¹ de zinco não se observou crescimento de colônias de leveduras.

Assim sendo, o intervalo de concentração de 200 e 400 mg L⁻¹ de zinco, demonstra uma relação positiva entre o maior crescimento em menor tempo, desta forma, a concentração de 300 mg L⁻¹ de zinco, pode ser considerada a mais adequada para ser utilizada no processo fermentativo.

4.2 FERMENTAÇÃO E ENRIQUECIMENTO DE MICRONUTRIENTES EM LEVEDURA

Foi utilizado como inóculo inicial, um lote de levedura desidratada, viva, de *Saccharomyces cerevisiae*, Y904, produzida e embalada a vácuo pela empresa AB Brasil. As leveduras comerciais prensadas ou desidratadas, vivas, são obtidas através de fermentações aeróbias seqüenciais até a separação final em centrifugas e filtros rotativos seguido de secagem ou prensagem antes do embalamento. A levedura é monitorada quanto ao teor de trealose para manutenção de viabilidade celular pelo tempo pré-estabelecido de armazenamento.

A levedura mesmo tendo em sua constituição um considerável teor de carboidrato de reserva (trealose) e proteína, também apresenta microelementos como ferro e zinco (Tabela 16).

Tabela 16 – Levedura de referência.

	Levedura (mg kg ⁻¹ de M.S)	Limite de detecção (mg kg ⁻¹ de M.S)
Ferro	25,0	2,7
Zinco	103, 9	0,6

A levedura desidratada foi reativada e propagada, e posteriormente submetida a 6 ciclos fermentativos em meio YEPD (conteúdo original de ferro e zinco, apêndices C e D) com acréscimo de 300 mg L⁻¹ de ferro ou zinco de acordo com os experimentos.

4.2.1 FERRO

A levedura referência continha 25 mg kg⁻¹ de ferro e após o processo de reativação 41,67 mg kg⁻¹. No final do primeiro ciclo fermentativo, a levedura demonstrou uma capacidade de acumulo chegando a 2529,33 mg kg⁻¹, entretanto, apenas no final do segundo ciclo ocorreu um aumento de massa celular (3,03 gramas), enquanto não se observou acúmulo de ferro na levedura. No final do terceiro ciclo a levedura sofreu um aumento na sua concentração de ferro (5400,67 mg kg⁻¹), porém a massa celular apenas apresentou um aumento no final do quarto ciclo (3,59 g), momento em que não se observou aumento da concentração de ferro na levedura. No final do quinto ciclo a levedura novamente acumulou mineral mesmo com aumento da massa, permanecendo-se constantes até o final do sexto ciclo fermentativo 8883 mg kg⁻¹ e 4,01 g, respectivamente.

A variação de massa celular, pode ser um fator importante em relação a capacidade de acumulo de minerais inorgânicos, mas por outro prisma, é importante realçar que a levedura apesar de ser adicionada em fonte potencialmente inibitória, ferro, demonstrou capaz de aumentar a massa celular no decorrer do ciclos.

Uma concentração de ferro de 8883 mg kg⁻¹ em levedura, também foi reportada por Hegóczki (1994), que afirma que as leveduras enriquecidas com microelementos sob condições bem definidas são capazes de serem enriquecidas com certos microelementos, em teores várias vezes maiores que os níveis normais e fixar com fonte orgânica, sendo que em seu experimento, a levedura inicial com 60 ppm de ferro, alcançou valores entre 1000 - 10000 ppm.

Tabela 17 – Valores médios de ferro em levedura e concentração celular.

	Ferro (mg kg ⁻¹)	Concentração celular (M.S) (g)
Reativação	41,67 ^d	2,51 ^f
1º ciclo fermentativo	2529,33 ^c	2,72 ^{ef}
2º ciclo fermentativo	3620,67 ^c	3,03 ^{de}
3º ciclo fermentativo	5400,67 ^b	3,44 ^{cd}
4º ciclo fermentativo	5977,67 ^b	3,59 ^{bc}
5º ciclo fermentativo	7857 ^a	4,18 ^a
6º ciclo fermentativo	8883 ^a	4,01 ^{ab}

Letras distintas, na coluna, diferem entre si, estatisticamente, ao nível de significância de 5%, perante ao teste de Tukey.

A levedura apesar de ser submetida a 6 ciclos fermentativos com fontes de ferro, a sua viabilidade celular foi de 96,8% e o teor de proteína de 41,63%, valor este de acordo com (WHITE, 1954).

4.2.2 ZINCO

A levedura referência apresentou um valor de 103,9 mg kg⁻¹ de zinco, enquanto após o processo de reativação 129,33 mg kg⁻¹. No final do primeiro ciclo fermentativo, a levedura apresentou uma capacidade de acúmulo chegando a 1665,33 mg kg⁻¹, e manteve-se aumentos sucessivos até o final do quarto ciclo

(3322,67 mg kg⁻¹, 5187 mg kg⁻¹, 6825,33 mg kg⁻¹, respectivamente, enquanto a massa celular aumentou apenas no final do terceiro ciclo 3,79 g, e ambos mantiveram-se estáveis até o final do sexto ciclo fermentativo.

A concentração final de zinco na levedura no presente trabalho foi de 7452 mg kg⁻¹, concentrações próximos a esta grandeza já fora relatada por Hegóczi (1994), que através de uma levedura inicial com 150 ppm atingiu uma concentração de 500 – 5000 ppm de zinco.

Tabela 18 – Valores médios de zinco em levedura e concentração celular.

	Zinco (mg kg ⁻¹)	Concentração celular (M.S) (g)
Reativação	129,33 ^e	2,55 ^b
1º ciclo fermentativo	1665,33 ^d	2,69 ^b
2º ciclo fermentativo	3322,67 ^c	3,01 ^b
3º ciclo fermentativo	5187 ^b	3,79 ^a
4º ciclo fermentativo	6825,33 ^a	3,69 ^a
5º ciclo fermentativo	7633 ^a	3,65 ^a
6º ciclo fermentativo	7452 ^a	3,54 ^a

Letras distintas, na coluna, diferem entre si, estatisticamente, ao nível de significância de 5%, perante ao teste de Tukey.

A levedura apresentou após o sexto ciclo fermentativo uma viabilidade celular de 79,36%, e um teor de proteína de 42,87%, que esta de acordo com (WHITE, 1954)

4.2.3 VALOR NUTRICIONAL DA LEVEDURA ENRIQUECIDA

As concentrações obtidas de ferro e zinco na levedura no decorrer dos ciclos fermentativos e o teor de proteína na levedura no sexto ciclo fermentativo apresentados nos itens 4.2.1 e 4.2.2, possivelmente poderá contribuir na alimentação de eqüinos, bovinos, suínos e seres humanos (item 2.3) como suplemento nutricional, entretanto, a presente pesquisa teve como intuito investigar maneiras de utilização da levedura excedente de fermentações alcoólicas industriais, servindo assim como uma porta aberta para novos estudos, referentes a toxicidade química e microbiológica das leveduras obtidas de fermentações alcoólicas industriais, tolerância ao consumo de leveduras vivas ou mortas, dosagens de consumo visando utilização como suplemento nutricional e probiótico, etc., para posteriormente e finalmente servir como alimentação de animais e seres humanos. Desta forma, este trabalho **NÃO RECOMENDA** a utilização da levedura como alimentação principalmente de seres humanos, apenas mostra um provável horizonte futuro, que poderemos ter um alimento saudável e a preço acessível.

A literatura mostra indícios que a levedura possa ser uma excelente fonte de selênio e fibras, sendo assim, um importante foco de futuros estudos.

4.2.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E ESPECTROMETRIA POR ENERGIA DISPERSIVA

Nas análises das leveduras foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura acoplado com espectrômetro por energia dispersiva (EDS).

As amostras foram secas e depositadas em suporte à base de alumínio com fita de carbono dupla face. Em seguida as amostras foram recobertas com ouro-paládio em equipamento Denton Vacuum. Os registros das imagens no microscópio eletrônico foram obtidos por elétrons secundários e retro-espalhados e as análises de composição química elementar foram obtidas por espectrometria por energia dispersiva sobre a região das amostras.

A Figura 1 apresenta a micrografia da amostra obtida em modo elétrons retro espalhados onde se observa a superfície rugosa e tubular, forma comum de agregação das leveduras adquiridas comercialmente.

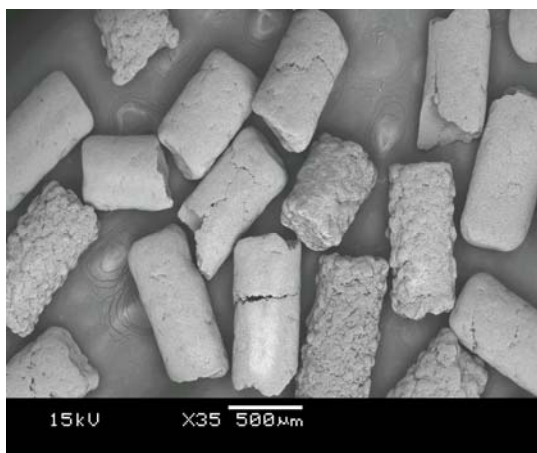


Figura 1. Micrografia destacando o aspecto ora liso, ora rugoso, dos aglomerados de levedura.

A micrografia na Figura 2 indica intensa deposição do elemento ferro em regiões de concentração preferencial (mais clara) em oposição à região vizinha (mais escura) em modo retro espalhados. A micrografia 3 destaca a região anterior onde é possível identificar pontos onde ocorrem concentração de ferro na superfície da levedura e a Figura 4 exibe a composição elementar obtida por espectrometria por energia dispersiva da mesma região corroborando a constatação.

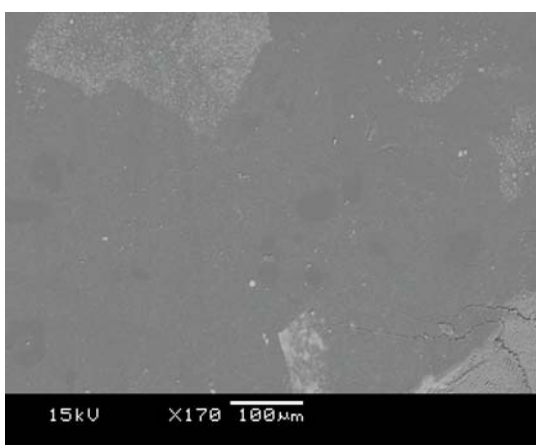


Figura 2. Micrografia identificando região com concentração de ferro na superfície da amostra.

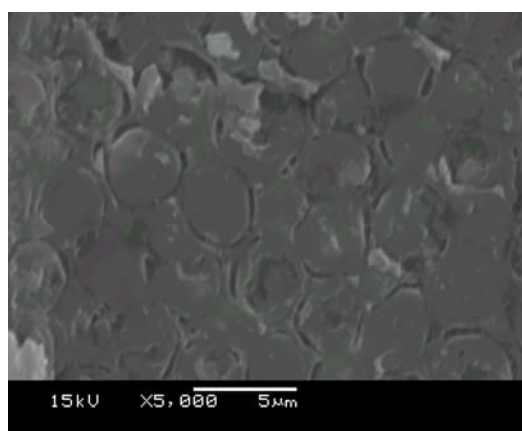


Figura 3. Micrografia em ampliação da região anterior destacando a presença do elemento ferro.

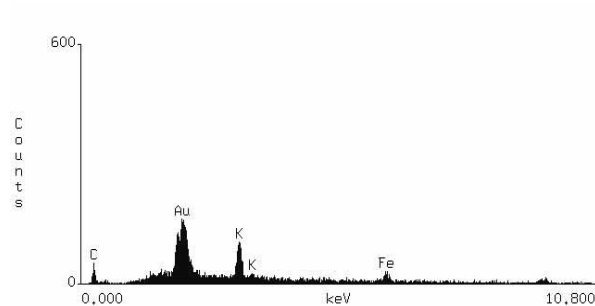


Figura 4. Espectrograma da composição química da região na micrografia anterior.

A micrografia da Figura 5 apresenta regiões com aglomerações mais intensas de leveduras em contraste com placas de deposição que se formam na vizinhança. A micrografia na região 6 amplia a imagem anterior onde fica evidente a forma esférica das leveduras que se agregam produzindo regiões bem compactadas e não colapsadas.

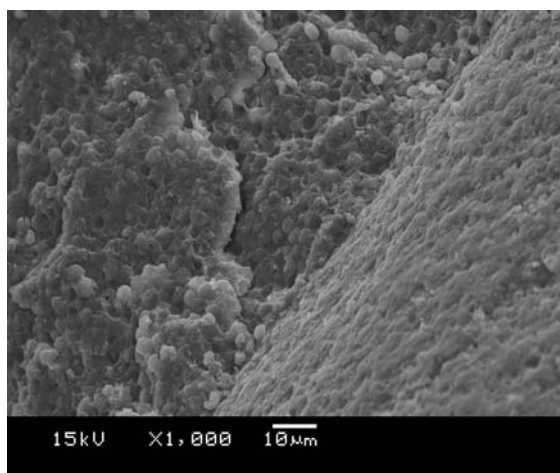


Figura 5. Micrografia destacando duas regiões adjacentes de diferentes aglomerados de levedura.

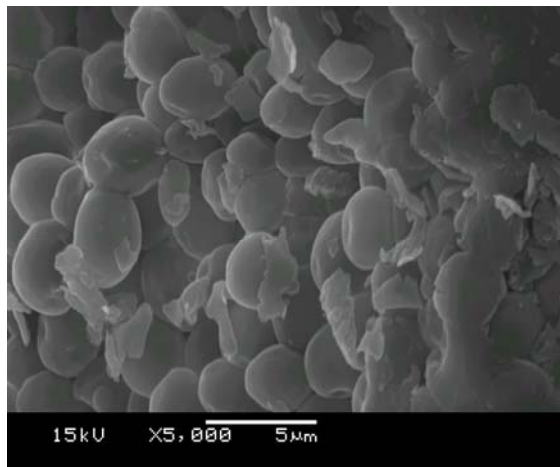


Figura 6. Micrografia destacando a região anterior onde se observa a forma esferóide dos grupamentos de leveduras.

Para as micrografias 7 e 8 observa-se regiões onde há deposição do elemento zinco que fica demonstrado na imagem por elétrons retro espalhados na Figura 7 e a análise da composição elementar confirma no espectrograma na Figura 8.

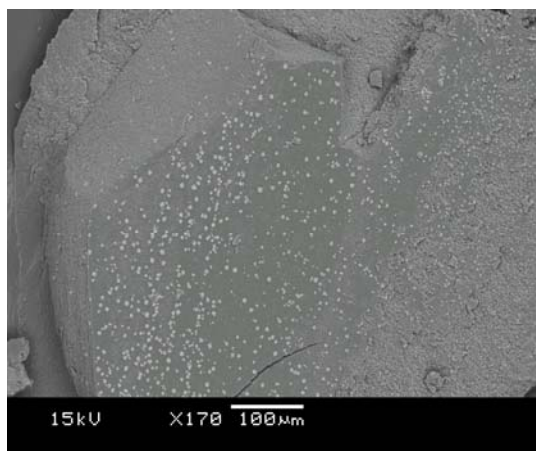


Figura 7. Micrografia destacando região com teores de zinco e adjacências.

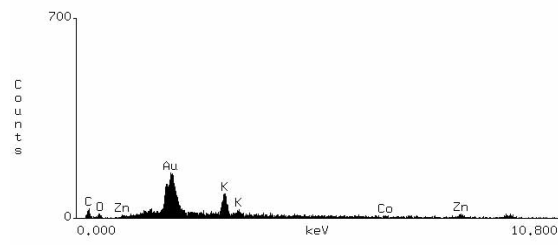


Figura 8. Espectrograma indicando a composição química da região na micrografia anterior.

4.3 AVALIAÇÃO DO PERÍODO DE ARMAZENAMENTO DE CÉLULAS VIÁVEIS

Um lote de grãos de milho, obtido no comércio local, foi homogeneizado e amostras foram retiradas para determinação de umidade e de atividade de água (a_w) (Tabela 19 e 20).

Tabela 19 - Determinação do teor de umidade em grãos de milho.

Subamostra 1	Subamostra 2	Amostra média
11,36%	11,30%	11,3%

Tabela 20 - Determinação da atividade de água em grãos de milho.

Subamostra 1	Subamostra 2	Subamostra 3	Média
0,697	0,690	0,694	0,694
26,5°C	27,3°C	27,8°C	

Posteriormente, os grãos de milho foram submetidos à irradiação gama (Cobalto 60), em dosagem de 4, 8 e 12 kGy para alterar ao mínimo as suas características físico-químicas e torná-los estéreis.

O material após o processo de irradiação, foi avaliado quanto à presença de contaminantes microbiológicos (fungo, bactéria e levedura).

A avaliação de fungo foi realizada utilizando-se o método de plaqueamento direto, com contagem da incidência de fungo nos grãos de milho, expressa em porcentagem. Os grãos que não sofreram irradiação (dosagem de 0 kGy), apresentaram fungos em todos os grãos avaliados, sendo que, com o aumento das

dosagens de irradiação, a incidência de milhos contaminados decresceu, apresentando na dose de 4 kGy, 57% de grãos contaminados e na dose de 8 kGy, 36% de grãos contaminados. Na dose de 12 kGy, a incidência foi de 34%, demonstrando uma situação muito semelhante a dose de 8 kGy (Figura 9).

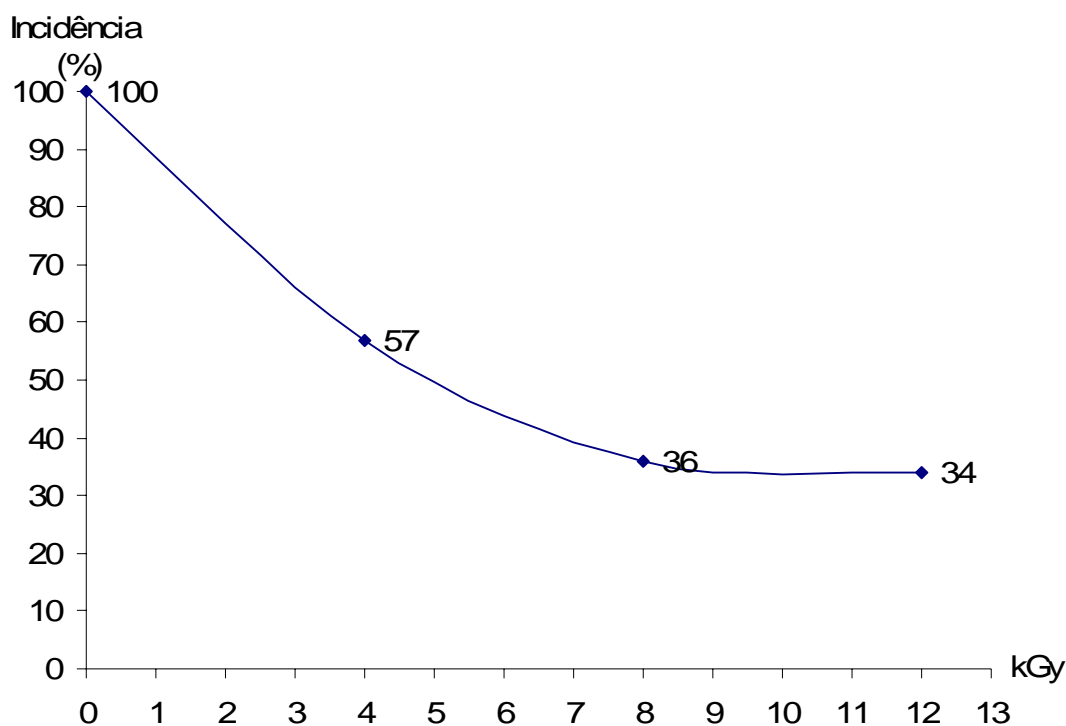


Figura 9. Incidência de fungos em grãos de milho.

A avaliação de bactéria foi realizada utilizando-se o método de plaqueamento por superfície, com contagem de bactéria na solução de milho, expressa em unidade formadora de colônia (UFC) por mL de solução. Nas doses de 0, 4, 8 e 12 kGy não se observou crescimento de colônias de bactéria.

A avaliação de levedura foi realizada utilizando-se o método de plaqueamento por superfície, com contagem de levedura na solução de milho, expressa em UFC por mL de solução. O grãos de milho que não receberam dose de irradiação (0 kGy), apresentou uma contagem de $6,20 \times 10^6$ UFC, sendo que, com aumento da dose de

irradiação, tem-se um decréscimo de contagem de colônias, obtendo-se na dose 4 kGy, $1,89 \times 10^5$ UFC, e menos acentuada nas doses de 8kGy, $9,00 \times 10^4$ UFC, e na dose de 12 kGy, $4,70 \times 10^4$ UFC.

Tabela 21 – Valores médios de colônias de leveduras em solução de milho.

Dose de 0 kGy	Dose de 4kGy	Dose de 8 kGy	Dose de 12 kGy
$6,20 \times 10^6$	$1,89 \times 10^5$	$9,00 \times 10^4$	$4,70 \times 10^4$

O fungo e levedura mesmo recebendo irradiação de até dose 12 kGy, demonstraram ainda incidência em grãos de milho, a que provavelmente se deva estar relacionado com a resistência da espécie, características de sobrevivência, e tipo de substrato infestado ou/e infectado. A bactéria não foi visualizada nas doses avaliadas, isto se deva possivelmente, pela sua ausência no lote de grãos de milho, ou não sobrevivência na umidade e a_w de condição de armazenamento.

Visando manter ao máximo as características físico-químicas do substrato e obter maior redução da taxa de contaminantes microbianos, definiu-se a dose de 8 kGy a mais adequada para ser utilizada na etapa de avaliação do período de armazenamento de células viáveis.

Os grãos de milho, novamente foram submetidos a determinação de sua umidade e a_w (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22 - Determinação do teor de umidade em grãos de milho.

Subamostra 1	Subamostra 2	Amostra média
12,56%	12,78%	12,7%

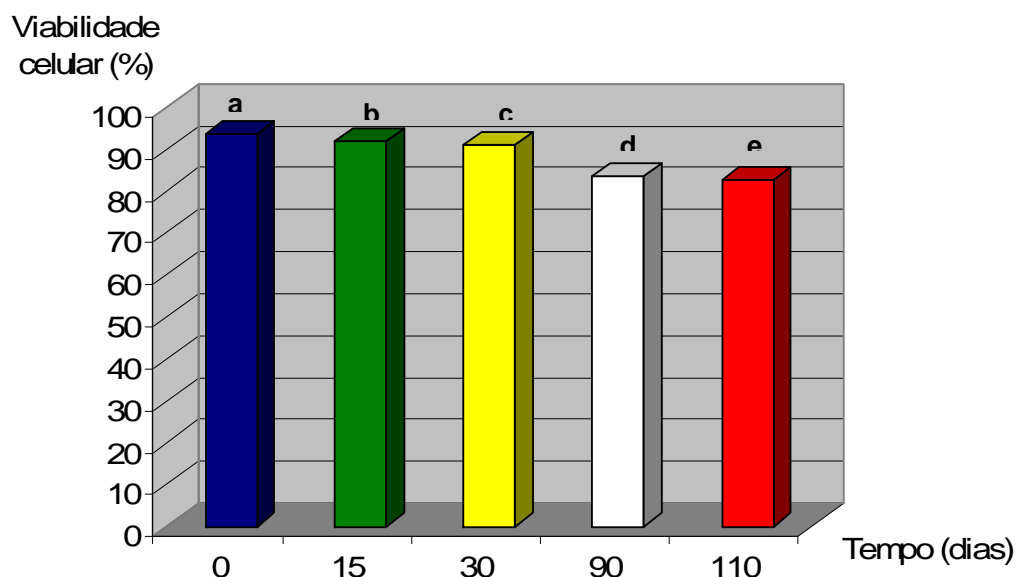
Tabela 23 - Determinação da atividade de água em grãos de milho.

Subamostra 1	Subamostra 2	Subamostra 3	Média
0,711	0,711	0,707	0,710
19,5°C	19,6°C	19,9°C	

O substrato após ser submetido a uma irradiação de 8 kGy, para redução da taxa de microrganismos presentes e manter as características físico-químicas, recebeu uma solução de sacarose 0,5% (p/p), para servir de veículo de adesão e alimento para a levedura e obtenção de umidade em torno de 14%. Em seguida, foram adicionadas células de levedura com concentração (1%) suficiente para cobrir superficialmente todo o substrato, o qual foi uniformizado e homogeneizado, e transferido para acondicionamento em frascos com tampas vedadas, caracterizando cinco períodos: 0, 15, 30, 90 e 110 dias após a inoculação, apresentando 6 repetições por período de coleta, para análise de viabilidade celular.

A viabilidade celular no início da investigação (0 dias após a inoculação) apresentou um valor de 93,65%, sofrendo um decréscimo aos 15 dias para 91,82%, chegando a 91% aos 30 dias. Apesar da diminuição da viabilidade celular durante o decorrer dos 30 dias após a inoculação, a mesma apresentou sempre acima dos 90%. Aos 90 dias, a viabilidade celular foi de 83,55%, demonstrando-se a continuidade do decréscimo com o passar do tempo, alcançando um valor ainda inferior (82,53%) aos 110 dias (Figura 10). A provável explicação para este fato, é que apesar da diminuição da taxa de microrganismo através da irradiação, ainda estes tornam-se potenciais competidores naturais para a levedura, e também o fato de que possa ter ocorrido um esgotamento dos carboidratos de reserva, com destaque para a trealose, que segundo Belluco (2001), observou valor de 11,61 mg

100 mg⁻¹ de trealose na levedura Y904 após ser retirada do invólucro sobre vácuo. Está hipótese é alicerçada por Suomalainen e Pfaffli (1961), que verificaram, que leveduras de panificação, durante período de armazenamento, mantiveram sua viabilidade celular, devido a trealose. Nos processos de desidratação-hidratação e congelamento-descongelamento, tem-se modelos que explicam o efeito de proteção da trealose na membrana da célula de levedura. O modelo que merece destaque é o de Crowe, Crowe e Chapman (1984), que aponta uma interação entre trealose e grupos polares das cadeias fosfolipídicas existentes na membrana. Neste caso, a água ligada aos terminais polares dos fosfolípidios em condições favoráveis, seria substituída pela trealose, em uma situação de estresse. Com esta substituição seria evitada as separações laterais dos componentes das membranas, pois não haveria assim alterações do espaçamento entre os fosfolípidios. Devido à substituição das moléculas de água pela de trealose, não teríamos a passagem de fase fluída para fase gel da membrana e desta forma, se manteria a integridade e a fluidez da membrana, conseqüentemente, a viabilidade celular.



Letras distintas diferem entre si, estatisticamente, ao nível de significância de 5%, perante ao Teste de Tukey.

Figura 10. Viabilidade das células das leveduras durante a investigação.

A viabilidade celular das leveduras ao serem adicionadas em um substrato irradiado para redução da taxa de microrganismos, e contendo cerca de 14% de umidade, e submetidas a um armazenamento de 110 dias, ao serem comparadas com o experimento de Baptista (2001), que avaliou a viabilidade celular das leveduras, que foram adicionadas em substratos não irradiados contendo umidades de 16% e 20%, nos mesmos períodos de 110 dias, ambas demonstraram uma queda no decorrer do tempo (Figura 11). No primeiro, passados 90 dias, a viabilidade celular era de 83,55%, contra 74,74% do segundo; e aos 110 dias, 82,53% contra 70,74%, respectivamente. Um fator importante observado por Baptista (2001), é que as concentrações celulares utilizadas de 1% e 2% para as duas umidades (16% e 20%), não influenciaram na viabilidade celular, entretanto, a

umidade pode influenciar, sendo que a média geral dos tratamentos com 16% de umidade foi de 85,58%, valor este estatisticamente superior aos tratamentos com 20% de umidade (82,04%), enquanto que no presente trabalho, a média geral foi de 88,51% de viabilidade celular.

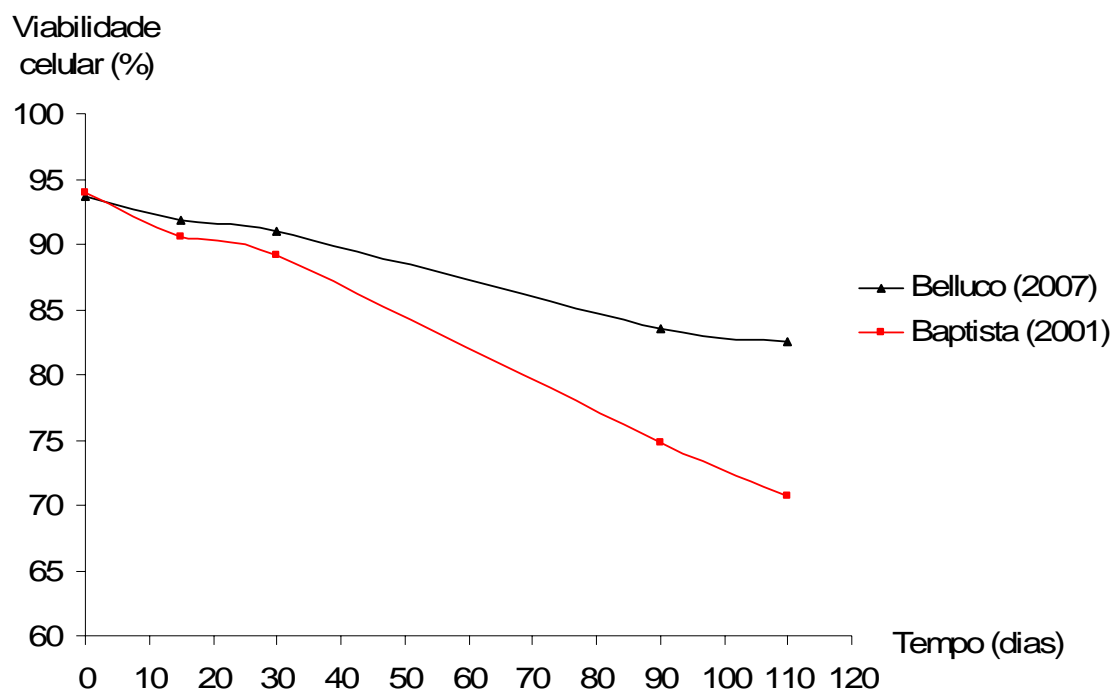


Figura 11. Comparação das viabilidades celulares durante o armazenamento.

5 CONCLUSÕES

Para as condições em que foram conduzidos os experimentos desta pesquisa, pode se concluir o que se segue:

1. A concentração de 300 mg L^{-1} de ferro, pode ser considerada a mais adequada para ser utilizada no processo fermentativo com adição de fonte de ferro.
2. A concentração de 300 mg L^{-1} de zinco, mostra-se mais adequada para utilização no processo fermentativo com adição de fonte de zinco.
3. A levedura apresenta capacidade de acumular ferro durante os ciclos fermentativos, alcançando no final do sexto ciclo 8883 mg kg^{-1} de matéria seca.
4. A levedura demonstra uma capacidade de acumular zinco durante os ciclos fermentativos, apresentando no final do sexto ciclo 7452 mg kg^{-1} de matéria seca.
5. A dose de 8 kGy é a mais adequada para ser utilizada na etapa de avaliação do período de armazenamento de células viáveis.
6. A inoculação da levedura em grãos de milho armazenados, com o intuito de utilização como probiótico, é uma técnica viável.
7. A viabilidade celular das leveduras decresce durante todo o tempo de investigação, apresentando um valor de $82,53\%$ aos 110 dias.

A presente pesquisa teve como intuito investigar maneiras de utilização da levedura excedente de fermentações alcoólicas industriais, servindo assim como uma porta aberta para novos estudos, referentes a toxicidade química e microbiológica das leveduras obtidas de fermentações alcoólicas industriais, tolerância ao consumo de leveduras vivas ou mortas, dosagens de consumo visando utilização como suplemento nutricional e probiótico, etc., para posteriormente e finalmente servir como alimentação de animais e seres humanos. Desta forma, este trabalho **NÃO RECOMENDA** a utilização da levedura como alimentação principalmente de seres humanos, apenas mostra um provável horizonte futuro, que poderemos ter um alimento saudável e a preço acessível.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ANDERSON, J. J. B. Minerais. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 106-145.

BAPTISTA, A. S. **Saccharomyces cerevisiae em milho armazenado e o efeito na redução de aflatoxicoses**. 2001. 81 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BELLUCO, A. E. S. **Alterações fisiológicas e de composição em Saccharomyces cerevisiae sob condições não proliferantes**. 2001. 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

BERTO, D. A. Uso da levedura desidratada na alimentação de suínos. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p. 85-109.

BLANK, G.; CORRIGAN, D. Comparison of resistance of fungal spores to gamma-beam and electron-beam radiation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 26, n. 3, p. 269 - 277, Aug. 1995.

BLUMER, S. A. G. **Enriquecimento com ferro em levedura Saccharomyces cerevisiae**. 2002. 53 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BRADBURN, N.; BLUNDEN, G.; COKER, R. D.; JEWERS, K. Aflatoxin contamination of maize. **Tropical Science**, v. 33, n. 4, p. 418-428, 1993.

BRADY, D.; DUNCAN, J. R. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, n. 1, p. 149-154, 1994.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: 1992. 365p.

BUTOLO, J. E. Uso da levedura desidratada na alimentação de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p. 51-84.

CABALLERO CÓRDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces sp.*) e determinação do valor nutritivo da proteína em células integras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 102-106, mai./ago. 1997.

CAZES, R. L.; SOARES, A. Minerais orgânicos na nutrição de eqüinos. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE EQUINOS, 1., 2004, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2004. p. 61-74.

COONEY, D. O. **Activated charcoal**: antidotal and other medical uses. New York: Marcel Dekker, Inc, 1980.

COSTA, M. C.; SGARBIERI, V. C. Uso de levedura integral e de derivados de levedura em alimentação humana. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p. 129-149.

CROWE, J. H.; CROWE, L. M.; CHAPMAN, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. **Science**, v. 223, n. 4637, p. 701-703, Feb. 1984.

DESMONTS, R. Utilização do levedo na alimentação da criança. **Pediatria Prática**, v. 39, n. 7, p. 7-18, jul. 1968.

EDDY, A. A. Aspects of the chemical composition of yeast. In: COOK, A. H. **The chemistry and biology of yeasts**. New York: Academic Press, 1958. p. 157-249.

ELLIS, W. O.; SMITH, J. P.; SIMPSON, B. K.; OLDHAM, J. H. Aflatoxins in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 30, n. 3, p. 403-439, 1991.

ETTINGER, S. Macronutrientes: carboidratos, proteínas e lipídeos. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 30-64.

FAO. **Prevención de las micotoxinas**. Roma: FAO, 1979. 61 p.

FRANKMANN, C. B. Terapia clínica nutricional na doença neoplástica. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 838-858.

FRISVAD, J. C.; THRANE, U. Mycotoxin production by food-borne fungi. In: SAMSON, R. A.; HOEKSTRA, E. S.; FRISVAD, J. C.; FILTENBORG, O. **Introduction to food-borne fungi**. 4. ed. Netherlands: Centraalbureau voor Schimmelcultures Baar Delft, 1995. p. 251-260.

GAUDREAU, H.; TOMPKINS, T. A.; CHAMPAGNE, C. P. The distribution of iron in iron-enriched cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Alimentaria**, v. 30, n. 4, p. 355-361, 2001.

GHIRALDINI, J. A.; ROSSELL, C. E. V. Caracterização e qualidade de levedura desidratada para a alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p. 27-49.

HARRISON, J. S. Yeast production. **Progress in Industrial Microbiology**, v. 10, p. 129-177, 1971.

HEGÓCZKI, J. Production of yeasts enriched with micro-elements. **Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica**, v. 41, p. 356-357, 1994.

JARDIM, W. R. **Alimentos e alimentação do gado bovino**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres LTDA., 1976. 338p.

JELINEK, C. F. Distribution of mycotoxins - an analysis of world wide commodities data, including data from FAO/WHO/UNEP food contamination monitoring programme. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MYCOTOXINS, 1987, Bangkok. **International...** Roma: FAO / WHO / UNEP, 1988. p. 49.

KASDAN, T. S. Terapia clínica nutricional para anemia. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 756-774.

KIHLBERG, R. The microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**, v. 26, p. 427-466, 1972.

KRUMMEL, D. Nutrição na doença cardiovascular. In: MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Krause alimentos, nutrição & dietoterapia**. 10. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 539-575.

LACEY, J. Prevention of mould growth and mycotoxin production through control of environmental factors. In: INTERNATIONAL IUPAC SYMPOSIUM ON MYCOTOXINS AND PHYCOTOXINS, 7., 1988, Tokio. **Mycotoxins and phycotoxins '88**. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B. V., 1989. p. 161-168.

LAHR FILHO, D.; GHIRALDINI, J. A.; ROSSELL, C. E. V. Estudos de otimização da recuperação de biomassa de levedura em destilarias. In: "WORKSHOP" PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE LEVEDURA: UTILIZAÇÃO EM ALIMENTAÇÃO HUMANA E ANIMAL, 1996, Campinas. **Workshop...** Campinas: Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1996. p. 59-67.

LIMA, G. J. M. M. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana de açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação**. 1983. 139 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1993.

LUCCA FILHO, O. A. Metodologia dos testes de sanidade de sementes. In: SOAVE, J.; WETZEL, M. M. V. S. **Patologia de sementes**. Campinas: Fundação Cargill, 1987. p. 276-298.

MACHADO, P. F. Uso da levedura desidratada na alimentação de ruminantes. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1997, Campinas. **Anais**. Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 1997. p. 111-128.

MARTIN, V. F. **Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras.** 1987. 190 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1987.

MATIAZI, H. J. **Efeito de agentes estressantes sobre o teor de trealose em *Saccharomyces cerevisiae*.** 1995. 70 f. Piracicaba, 1995. 70 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995.

MOREIRA, J. R. A. **Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana de açúcar em rações isocalóricas para suínos em crescimento e acabamento.** 1984. 107 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 1984.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrients requirements of beef cattle.** Washington: National Academy of Science, 1996.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of horses.** 5. ed. National Academy Press, 1989.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirement of swine.** Academy Press, 1998

NASCIMENTO FILHO, V. F. Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF). Disponível em: <<http://web.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/cen-5723/EDXRF-TXRF.doc>>. Acesso em: 19 ago. 2006.

PATTINSON, I.; CROWTHER, P.; NOUBEY, H. EL. The separation of aflatoxin infected groundnut kernels. **Tropical Science**, London, v. 10, n. 3, p. 212-221, 1968.

PIERCE, J. S. Measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 442-443, 1970.

SILVA, D. J. **Análise de alimentos.** 2. ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 165 p.

STANLEY, V. G.; OJO, R.; WOLDESENBET, S.; HUTCHINSON, D. H.; KUBENA, L. F. Environment and health: the use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. **Poultry Science**, v. 72, n. 10, p. 1867-1872, oct. 1993.

SULLIVAN, T. W.; KUHL JR, H. J.; HOLDER, D. P. Evaluation of brewers dried grains and yeast in turkey diets. **Poultry Science**, v. 57, n. 5, p. 1329-1336, sep. 1978.

SUOMALAINEN, H.; PFAFFLI, S. Changes in the carbohydrate reserves of baker's yeast during growth and on standing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 67, p. 249-254, 1961.

UNICA. Disponível em: <<http://portalunica.com.br/portalunica/>>. Acesso em: 03 abr. 2006.

USDA. **Recommended dietary allowances**. 10. ed. Washington, DC.: National Academy Press, Food and Nutrition Board, 1989.

USDA. **Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids (Macronutrients)**. Washington, DC: National Academy Press, Food and Nutrition Board, 2005. p. 1322-1323.

VIEIRA, S. L. Minerais quelatados na nutrição animal. In: SIMPÓSIO SOBRE NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 3., 2005, Cascavel. **Anais...** Cascavel: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2005. p. 153-172.

WASLIEN, C. I. Unusual sources of proteins for man. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 77-151, 1975.

WHITE, J. **Yeast technology**. London: Chapman and Hall, 1954. 432 p.

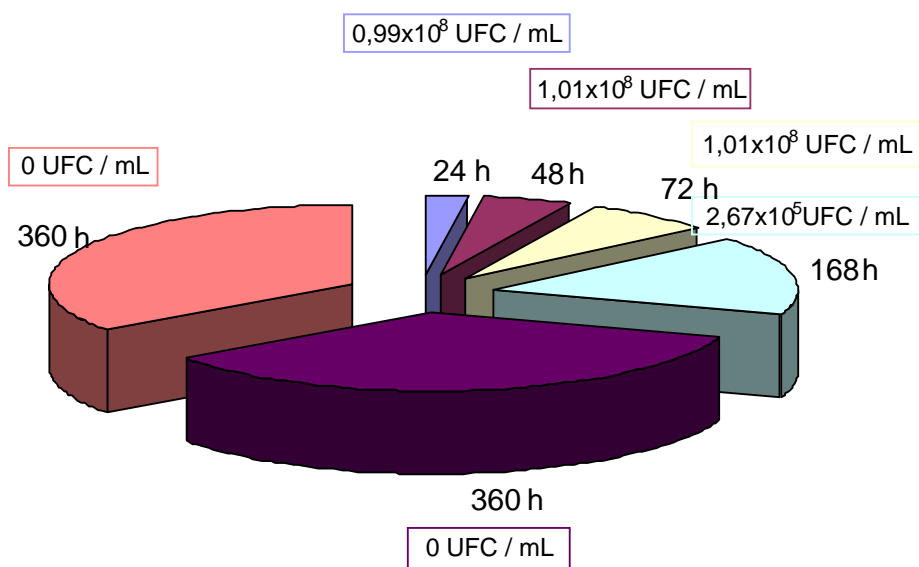
WIENDL, F. M. Irradiação de alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 45, p. 3-25, set. 1978.

WIENDL, F. M. A salubridade dos alimentos irradiados. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 1, p. 48-56, jan./mar. 1984.

ZANETTI, M. A. Suplementação mineral para bovinos de corte. In: SIMPÓSIO GOIANO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE BOVINOS, 3., 2001, Goiânia. **Anais...** Goiânia: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal, 2001. p. 223-242.

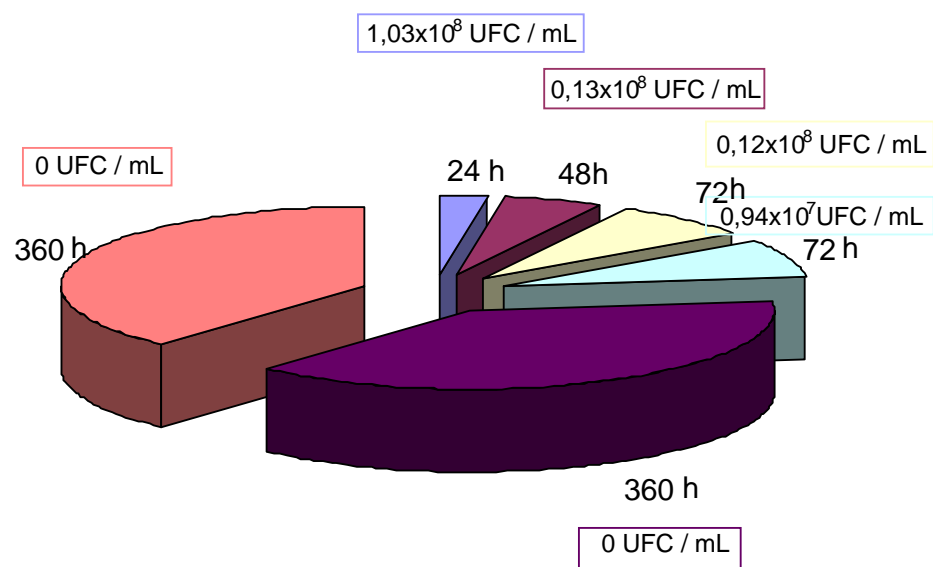
APÊNDICES

APÊNDICE A - Tolerância da levedura Y904 a dosagens crescentes de ferro.



■ 0 mg L⁻¹ de Fe
 ■ 200 mg L⁻¹ de Fe
 ■ 400 mg L⁻¹ de Fe
■ 800 mg L⁻¹ de Fe
 ■ 1000 mg L⁻¹ de Fe
 ■ 1200 mg L⁻¹ de Fe

APÊNDICE B - Tolerância da levedura Y904 a dosagens crescentes de zinco.



■ 0 mg L⁻¹ de Zn
 ■ 200 mg L⁻¹ de Zn
 ■ 400 mg L⁻¹ de Zn
■ 800 mg L⁻¹ de Zn
 ■ 1000 mg L⁻¹ de Zn
 ■ 1200 mg L⁻¹ de Zn

APÊNDICE C - Determinação dos microelementos ferro e zinco em YEED.

	Extrato de levedura (mg kg ⁻¹)	Peptona (mg kg ⁻¹)	Dextrose (mg kg ⁻¹)	Agar (mg kg ⁻¹)	Limite de detecção (mg kg ⁻¹)
Ferro	41,8	17,6	Não detectado	15,3	2,7
Zinco	69,4	6,8	Não detectado	Não detectado	0,6

APÊNDICE D - Quantificação dos microelementos ferro e zinco em YEPD em proporções utilizadas no processo fermentativo.

	Extrato de levedura (mg L ⁻¹)	Peptona (mg L ⁻¹)	Dextrose (mg L ⁻¹)	Total (mg L ⁻¹)
Ferro	0,418	0,176	Não detectado	0,594
Zinco	0,694	0,068	Não detectado	0,762

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Belluco, André Eduardo de Souza

Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótico / André Eduardo de Souza Belluco; orientador Julio Marcos Melges Walder. - - Piracicaba, 2008.

96 f. : fig.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Energia Nuclear na Agricultura) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ferro 2. Irradiação de alimentos 3. Micronutrientes 4. Nutrição 5. Zinco
I. Título

CDU 663.14:612.3