

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

EDITH MIER ALBA

**Produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro a partir de subprodutos
agroindustriais**

Lorena
2020

EDITH MIER ALBA

**Produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro a partir de subprodutos
agroindustriais**

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de concentração de Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva

Versão Original

LORENA

2020

NÃO AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, SERÁ DISPONIBILIZADO AUTOMATICAMENTE APÓS 2 ANOS DA PUBLICAÇÃO

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Mier-Alba, Edith

Produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro a partir de subprodutos agroindustriais / Edith Mier-Alba; orientador Silvio Silvério da Silva - Versão Original. - Lorena, 2020.

70 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de Biotecnologia Industrial) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2020

1. Ferro. 2. Levedura enriquecida. 3. Biomassa amilácea. 4. Farelo. I. Título. II. da Silva, Silvio Silvério, orient.

*A mi niña interior que nunca paró de soñar y creer
que daríamos este paso (y muchos otros) juntas.
Te mereces todo lo que puedas soñar.
Continuemos creciendo.*

*A mi madre que es mi soporte, impulso, red y puerto.
Mi motivadora y motivación.
Mi admiradora número uno.
Mi remanso, oráculo y protección.
Mi compañera eterna en todas las jornadas
Te amo por siempre.*

AGRADECIMENTOS

A mi madre, a quien le debo lo que soy. Gracias por tu apoyo, amor, paciencia y permanencia. Gracias por ser la bendición constante más hermosa de mis vidas.

Ao Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva, por me incentivar a persistir, por me dar a confiança e oportunidade de pertencer a seu excelente grupo de pesquisa, pela calidez e constante aprendizado que trabalhar com você tem significado para minha vida profissional e pessoal.

Ao Prof. Dr. Júlio dos Santos, pela disponibilidade, orientação e ânimo que encontrei em você.

Aos professores com quem teve oportunidade de coincidir e aprender.

À Sabrina, pela orientação, confiança, paciência e constante aprendizado.

Ao Prof. Dr. Hélcio José Izário Filho e seu técnico Gabriel Caracciolo, por me permitir trabalhar no seu espaço, sua ajuda, disposição, paciência e calidez.

Ao Prof. Dr. Nagamani Balagurusamy, pela confiança e incentivo desde minha formação como engenheira. Por manter suas portas abertas e compartilhar oportunidades com seus ex-alunos.

Ao Prof. Dr. Alexander de Luna Fors, por ser um dos meus pilares na minha vida profissional.

A minha família sanguínea e família de alma, Ana e Michelle, pelo apoio, motivação, amor e paciência.

A Salvador, pelo apoio e companhia constante e incondicional, pelas aportações ao projeto, por compartilhar seu conhecimento, tempo, oportunidades e qualquer coisa que fosse necessária. Obrigada.

A todos meus colegas do laboratório, pela ajuda, aportações, companheirismo, paciência, sorrisos e todos os aprendizados e momentos ao longo desse caminho. Muito obrigada a todos e cada um de vocês.

Aos funcionários e colegas do DEBIQ, pela ajuda e por fazer desses anos uma ótima experiência.

À CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro e à CONACYT e SENER, pela bolsa de estudos.

RESUMO

MIER-ALBA, E. **Produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro a partir de subprodutos agroindustriais.** 2020. 70 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

O ferro é um elemento abundante na natureza e essencial para o metabolismo da maioria dos organismos, já que participa em diversos processos metabólicos como transporte de elétrons, respiração celular e síntese de macromoléculas. O consumo de biomassa de levedura enriquecida com ferro contribui ao incremento na ingestão de ferro pelo organismo e diminui os efeitos colaterais do consumo de fontes inorgânicas de ferro e por tanto, pode ser empregada na prevenção e tratamento da deficiência de ferro. A produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro empregando subprodutos agroindustriais como meio de cultivo pode ser uma alternativa inovadora e de baixo custo. Nesse contexto, o presente trabalho estuda a tolerância da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de Fe^{+2} e o uso de hidrolisado ácido de farelo de soja, milho e trigo. A levedura apresentou tolerância a concentrações de 15, 30 e 45 mg L^{-1} de Fe^{+2} , porém, o crescimento celular diminui em concentrações maiores a 15 mg L^{-1} de Fe^{+2} . A produção de biomassa de levedura foi realizada em fermentação submersa empregando meio sintético YPG e hidrolisado ácido de cada farelo, suplementados com 15 mg L^{-1} de Fe^{+2} na forma de Fe_2SO_4 . O crescimento celular não foi afetado na presença de Fe^{+2} nos meios avaliados, obtendo 10,91 g L^{-1} célula seca e 0,26 mg de Fe^{+2} intracelular por grama de célula seca no meio YPG- Fe^{+2} . A maior concentração celular foi obtida empregando hidrolisado ácido de soja como meio de cultivo, entre tanto, a maior incorporação de ferro foi de 3,18 mg de ferro intracelular por grama de célula seca empregando o hidrolisado ácido de farelo de milho. A produção de biomassa enriquecida com ferro a partir de hidrolisados amiláceos é um processo inovador que apresentou potencial para futuras pesquisas orientadas à saúde humana e animal empregando métodos de produção de baixo custo com menor impacto ambiental.

Keywords: Ferro. Levedura enriquecida. Biomassa amilácea. Farelo.

ABSTRACT

MIER-ALBA, E. **Iron-enriched yeast biomass production from industrial byproducts**. 2020. 70 p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2020.

Iron is an abundant element in nature and essential for the metabolism of most organisms, as it participates in multiple metabolic processes such as electron transport, cellular respiration, and macromolecule biogenesis. Consumption of iron-enriched yeast biomass contributes to increased uptake of iron by the body and reduces the side effects of inorganic iron sources and can therefore be used for the prevention and treatment of iron deficiency. The production of iron-enriched yeast biomass employing agro-industrial byproducts as a culture medium can be an innovative and low-cost alternative. In this context, the present work studies the tolerance of bakery yeast *Saccharomyces cerevisiae* to different Fe^{+2} concentrations and the use of soybean bran, corn bran, and wheat bran acid hydrolysates in the iron enriched biomass production. Yeast presented tolerance to Fe^{+2} at concentrations of 15, 30, 45 mg L^{-1} , but its cellular growth decreased at concentrations above 15 mg L^{-1} of iron. Yeast biomass production was performed by submerged fermentation in YPG medium and acid hydrolysate of each bran, supplemented with 15 mg L^{-1} as Fe_2SO_4 . Yeast growth was not affected by the presence of iron in any of the evaluated culture medium, yielding 10.91 g L^{-1} of dry cell and 0.26 mg of intracellular iron per gram dry cell in YPG- Fe^{+2} medium. The hydrolysate which get the highest biomass production was soybean bran hydrolysate with 7.9 g L^{-1} dry cell and the largest incorporation of total iron was in the cell biomass produced from corn bran hydrolysate, which had 3.18 mg of iron per gram of dry cell. The production of iron-enriched biomass from starchy hydrolysates is an innovative process, presenting the potential for further research aimed at human and animal health through low cost production methods with lower environmental impact.

Keywords: Iron. Enriched yeast. Starchy biomass. Bran.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de aditivos agregados a biomassa de levedura empregada como suplemento alimentar.....	23
Figura 2 - Fluxograma do processo simplificado de produção de biomassa de levedura enriquecida. .24	
Figura 3 - Estrutura de amilose e amilopectina	29
Figura 4 - Fluxograma do processo industrial de obtenção dos farelos de trigo, soja e milho.....	31
Figura 5 - Fluxograma de etapas desenvolvidas no presente trabalho.....	33
Figura 6 - Crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio YMA-Fe ⁺² a 30 °C durante 72 horas. (Controle) meio YMA sem adição de ferro; (A) método de preparo com meio YMA-Fe ⁺² autoclavado; (F) método de preparo com meio autoclavado e adição de solução de ferro sem filtrar; (15, 30 e 45) indicam a concentração em mg L ⁻¹ de Fe ⁺² presente no meio.....	42
Figura 7 - Microscopia óptica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> crescida em ágar YMA-Fe+2 (15, 30 e 45 mg L ⁻¹ de Fe ⁺² respectivamente) a 30 °C durante 72 horas com aumento de 400X. (Controle) meio YMA sem adição de Fe ⁺² ; (A15, A30 e A45) método de preparo com meio YMA-Fe ⁺² autoclavado; (F15, F30 e F45) método de preparo com meio autoclavado e adição de solução de ferro filtrada; (SF15, SF30 e SF45) método de preparo com meio autoclavado e adição de solução ferrosa sem filtrar.....	43
Figura 8 - Tolerância da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a diferentes concentrações de Fe ⁺² em diferentes tempos de cultivo.....	44
Figura 9 - Crescimento celular e consumo de açúcares por <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio YPG e YPG-Fe ⁺² , contendo 15 mg L ⁻¹ de Fe ⁺²	45
Figura 10 - Concentração celular e ferro total intracelular em células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> após 24 horas de cultivo em meio YPG-Fe ⁺²	46
Figura 11 - Viabilidade celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> nos diferentes meios testados durante 72 horas de cultivo.....	51
Figura 12 - Crescimento celular, consumo de açúcares e ferro intracelular em <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em YPG (A), HAFS (B), HAFM (C) e HAFM (D).....	53
Figura 13 - Comparação entre a concentração celular e o ferro total intracelular da biomassa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> cultivada em meios elaborados com HAFS, HAFM e HAFM após 24 horas de cultivo.....	54
Figura 14 - Gráfico de temperatura de comparação da produção de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e incorporação de ferro em HAFS, HAFM e HAFT após 24 horas de cultivo.	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dose diária recomendada e consumo de ferro em diferentes grupos	19
Tabela 2 - Composição e produção de soja, milho e trigo no Brasil e o mundo.....	30
Tabela 3 - Viabilidade celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio sintético YPG-Fe ⁺² em função do tempo de cultivo.....	46
Tabela 4 - Composição (%) de farelos amiláceos.....	48
Tabela 5 - Composição dos hidrolisados ácidos de farelo de soja, milho e trigo utilizados em processo fermentativo.....	59
Tabela 6 - Concentração de glicose e etanol em g L ⁻¹ em função do tempo de cultivo em hidrolisado ácido de farelo de soja, milho e trigo, com e sem adição de ferro.....	56

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Importância do ferro na saúde	17
2.1.1 Patologias associadas à deficiência de ferro	18
2.2 Desafios da suplementação de ferro em seres humanos	19
2.3 Leveduras na nutrição.....	21
2.4 Leveduras enriquecidas com ferro	23
2.4.1 Incorporação de metais por leveduras.....	24
2.6 Métodos de pré-tratamento da biomassa vegetal	27
2.7 Materiais amiláceos.....	28
2.7.1 Farelos amiláceos.....	29
3 OBJETIVOS	32
3.1 Geral.....	32
3.2 Específicos	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Microrganismo.....	33
4.2 Ativação da levedura e preparo do inóculo	33
4.2.1 Ativação.....	33
4.2.2 Preparo do inóculo	34
4.3 Avaliação do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na presença de ferro	34
4.4 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em frascos Erlenmeyer.....	35
4.5 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio sintético enriquecido com ferro.....	35
4.6 Teste de adsorção de ferro na parede celular da levedura.....	35
4.7 Caracterização dos farelos de soja, milho e trigo.....	36
4.8 Hidrólise e caracterização dos hidrolisados dos farelos de soja, milho e trigo.....	36
4.9 Avaliação do uso dos hidrolisados na produção de leveduras enriquecidas com ferro	36
4.10 Métodos analíticos.....	37
4.10.1 Determinação da concentração celular	37
4.10.2 Determinação de viabilidade celular	38
4.10.2 Determinação do teor de umidade.....	38
4.10.3 Determinação de açúcares redutores	38
4.10.4 Determinação de concentrações de açúcares, compostos inibidores e subprodutos de processos fermentativos	39
4.10.5 Determinação de proteínas totais	39
4.10.6 Determinação do pH.....	39

4.10.7 Determinação de ferro total (IPCL)	40
4.11 Determinação da incorporação de ferro na levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Avaliação do crescimento da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na presença de ferro	41
5.2 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio sintético enriquecido com ferro.....	44
5.3 Teste de adsorção de ferro na parede celular da levedura.....	47
5.4 Caracterização dos farelos e hidrolisados de farelos de soja, milho e trigo.....	47
5.5 Avaliação do uso dos hidrolisados na produção de biomassa de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> enriquecida com ferro.....	50
5.5.1 Viabilidade celular durante o cultivo	50
5.5.2 Crescimento celular e incorporação de ferro	52
5.5.3 Consumo de substrato durante o cultivo	55
5.5.4 Rendimento da produção de biomassa de levedura enriquecida	57
6 CONCLUSÕES	60
7 PERSPECTIVAS FUTURAS	61
REFERÊNCIAS	62
ANEXO	69

1 INTRODUÇÃO

O ferro é um elemento abundante na natureza e essencial para o metabolismo da maioria de organismos, pois participa de múltiplos processos metabólicos, como o transporte de elétrons, reações de oxido-redução e biossíntese de importantes macromoléculas como o DNA e proteínas. Em organismos superiores, o ferro participa do transporte de oxigênio, sínteses de eritrócitos, funcionamento do sistema nervoso e imunológico e, em humanos, também contribui para o desenvolvimento cognitivo e fisiológico. No entanto, devido a sua baixa biodisponibilidade, a deficiência desse mineral é o principal problema de desnutrição no mundo e um fator de risco no desenvolvimento de múltiplas doenças, como por exemplo, a anemia ferropriva, que pode ocorrer tanto em animais quanto em humanos.

A deficiência de ferro se apresenta quando há um desbalanço entre a perda e a absorção deste mineral. Na população humana, existem grupos que apresentam maior risco de desenvolver deficiência de ferro, dentre os quais destacam-se as mulheres em idade reprodutiva e crianças. Outro grupo de risco que tem crescido nas últimas décadas são as pessoas com regime alimentar vegetariano e vegano.

Para a prevenção e tratamento desta deficiência, é recomendada a ingestão de suplementos alimentares contendo sais de ferro, porém estes possuem baixa biodisponibilidade por serem inorgânicos e podem causar efeitos colaterais durante seu consumo. Os suplementos de origem biológica, como por exemplo, a biomassa de levedura, aumentam a biodisponibilidade do ferro, melhorando a absorção deste mineral. A biomassa de levedura é utilizada na alimentação humana, na ração animal e em cultivos microbianos devido a sua fácil obtenção e alto valor nutricional por ser rica em proteínas e vitaminas. Além disso, o enriquecimento mineral desta biomassa contribui com as propriedades nutricionais intrínsecas das leveduras, somando os benefícios nutricionais do mineral empregado, o que possibilita que a biomassa de levedura enriquecida com ferro seja um produto industrial de grande potencial.

O enriquecimento das leveduras com minerais é realizado mediante a adição do mineral específico ao meio de cultura, ocasionando sua incorporação pelas células. Com essa incorporação, o mineral aumenta sua biodisponibilidade, com consequente facilidade de assimilação e absorção ao ser consumido e, portanto, com maiores benefícios nutricionais.

Atualmente, a produção industrial de biomassa de levedura é baseada apenas em meios de cultura sintéticos. Na literatura consultada não foi encontrado até o momento nenhum estudo destacando a produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro a partir de subprodutos agrícolas.

Devido à ampla produção de grãos no Brasil, foram escolhidos os farelos de soja, milho e trigo provenientes do processo de beneficiamento agrícola para o desenvolvimento do presente projeto. Esses farelos foram tratados por hidrólise ácida para seu posterior uso como meios de cultivo em fermentação submersa da levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae*.

Aproveitando a experiência obtida em trabalhos anteriores desenvolvidos no Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis com a produção de levedura enriquecida com selênio para alimentação animal, o presente trabalho tem como objetivo o estudo da produção de biomassa enriquecida com ferro utilizando subprodutos agroindustriais como meio de cultura alternativo, para uma produção sustentável e de baixo custo, apresentando assim uma nova opção de aproveitamento de subprodutos agrícolas na obtenção de um produto de destacado valor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância do ferro na saúde

Muitos metais são essenciais para os organismos vivos, atuando em reações metabólicas e participando como cofatores de diversas enzimas. Entretanto, quando estão presentes em concentrações superiores às toleradas pelo organismo, podem ser tóxicos, sendo denominados “metais pesados” ao invés de “micronutrientes” (RENGEL, 2004). Alguns desses principais metais são ferro, cobre, zinco, molibdênio, magnésio, níquel e cobalto. Segundo Garay *et al.* (2016) o ferro é um dos mais importantes, pois participa de uma ampla variedade de processos metabólicos importantes.

O ferro é um metal representado pelo símbolo Fe (do latim: *ferrum*) e com número atômico igual a 26. Esse elemento químico pertence à primeira série de transição e ao grupo 8 da tabela periódica, com peso atômico $55,845 \text{ g mol}^{-1}$.

Como mostrado nas equações 1 e 2, esse metal recebe e doa elétrons com facilidade e, portanto, essa capacidade de oxido – redução é usada no metabolismo dos organismos vivos para múltiplos processos bioquímicos. Porém, conforme Toxqui *et al.* (2010), em função dessa característica, o ferro produz espécies de íons férricos e espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais essas últimas podendo danificar as macromoléculas biológicas.



Sabe-se que o ferro é um micronutriente essencial para praticamente todos os organismos (WEINBERG, 1997). Este mineral participa da síntese de hemoglobina e transporte de oxigênio em animais, e atua como cofator em reações de oxidação em processos metabólicos, incluindo o ciclo do ácido cítrico e o transporte de elétrons, gerando energia por meio da respiração celular (MARTÍNEZ-GARAY *et al.*, 2016). Também participa da biogênese de importantes macromoléculas como DNA, proteínas, lipídeos, vitaminas, na replicação celular (ABBASPOUR *et al.*, 2014), na síntese de neurotransmissores, síntese de eritrócitos, funcionamento do sistema nervoso (ZHUKOVSKAYA *et al.*, 2019), funcionamento do sistema imunológico (GASCHE *et al.*, 2004), síntese de colágeno e no funcionamento hepático e renal

(PONKA, 1999). Em humanos, tem um papel fundamental no equilíbrio do organismo e na manutenção e desenvolvimento fisiológico e cognitivo (NIH, 2001).

Embora o ferro ferroso seja biologicamente relevante, foi reportado por Halliwell; Gutteridge (1984) que o íon ferroso é instável em condições aeróbicas. Além disso, Martínez-Garay *et al.* (2016) reportaram que o ferro férrico (Fe^{+3}) possui baixa solubilidade em pH fisiológico e, portanto, a sua disponibilidade para os organismos vivos é limitada. Esses fatos sustentam a existência de uma discrepância entre o ferro disponível e as necessidades celulares desse metal em ambientes aeróbicos, anteriormente reportado por Hersman *et al.* (2000). Apesar do ferro ser abundante no planeta, a demanda fisiológica deste mineral é difícil de satisfazer devido a sua baixa biodisponibilidade e torna a deficiência de ferro o transtorno nutricional mais importante em nível mundial (MARTÍNEZ-GARAY *et al.*, 2016).

O ferro, por ser um micronutriente essencial, necessita ser adquirido por meio da alimentação, especialmente porque é perdido principalmente durante a menstruação, descamação epitelial e por perdas de sangue devido a outros fatores (ABBASPOUR *et al.*, 2014). Assim, é de extrema importância manter o equilíbrio entre o consumo e a perda desse micronutriente, o que representa um desafio mundial na área da saúde, uma vez que a deficiência de ferro acarreta em múltiplos problemas de saúde pública, que vão desde a fadiga e baixa produtividade até desnutrição, problemas neurais e óbito (WHO, 2018; NIH, 2019).

2.1.1 Patologias associadas à deficiência de ferro

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2018) o ferro um dos principais micronutrientes cuja deficiência constitui problemas de saúde de nível global e é considerada uma das principais formas de desnutrição no mundo devido à sua prevalência na população, principalmente em países em desenvolvimento (STOLTZFUS, 2003; HARE *et al.*, 2013). Também é o principal problema nutricional em mulheres em idade reprodutiva, grávidas e crianças, além de estar associada a dietas pobres, problemas na absorção de nutrientes, perda de sangue (NIH, 2012), presença de parasitas gastrointestinais e enteropatias (AGGETT *et al.*, 2012; NIH, 2019). Essa deficiência pode levar o indivíduo a uma baixa produtividade, transtornos cognitivos, fadiga e fraqueza muscular, além de representar risco de mortalidade materna, perinatal, infantil e anemia ferropriva severa (STOLTZFUS, 2003) ou anemia relacionada a outras patologias (NIH, 2001; NIH, 2019).

Os sintomas e consequências da deficiência de ferro são causados e até intensificados por diversas condições fisiológicas, doenças, estilo de vida e a gravidade da deficiência (WHO, 2018; NIH, 2019). As principais consequências e transtornos relacionados são a anemia e insuficiências cardíacas e neurais (CLARK, 2008; VANNELLA L et al., 2008; KOCYIGIT; GÜRSES, 2016; NIH, 2019; ZHUKOVSKAYA *et al.*, 2019). Além disso, algumas evidências indicam que os efeitos da deficiência de ferro e anemia no início da vida persistem até a idade adulta (AGGETT *et al.*, 2012; NIH, 2019).

2.2 Desafios da suplementação de ferro em seres humanos

Para manter uma boa saúde e evitar a deficiência de ferro, a dose diária recomendada de ferro para adultos e crianças com idade superior a 4 anos é de 18 mg (NIH, 2019), o que equivale a 100% do ferro consumido na dieta diária (FDA, 2019). Porém, a ingestão média de ferro por diferentes grupos populacionais é geralmente menor que a dose diária recomendada (Tabela 1) (NIH, 2019), o que mostra a necessidade de suplementação de ferro na população em geral.

Tabela 1 - Dose diária recomendada e consumo de ferro em diferentes grupos

Grupo	Dose diária recomendada (mg/dia)	Consumo médio diário (mg/dia)	Consumo diário vs Dose diária recomendada (%)	Deficiência de ferro em indivíduos do grupo (%)	Uso de suplementos com ferro por indivíduos do grupo (%)
Mulheres em idade reprodutiva	18	12,6 -13,5	70 - 75	>40	16**
Gestantes	27	14,7	54,44	18	72
Lactantes	15	12,6 -13,5	84 - 90	>18*	60
Crianças	(<6 meses)	0,27			
	(7 a 12 meses)	11	11,5 - 13,7	63,33 - 76,11	>6
	(1 a 3 anos)	7			8
	(>4 anos)	18			
Adolescentes e jovens	18	15,1	83,88	4	6
Homens	18	16,3 - 18,2	90,55 - 101,11	4	16**

*a anemia gerada durante a gravidez geralmente é mantida após da gestação

** taxa de utilização de suplementos que contenham ferro na população adulta em geral

Fonte: ANVISA, 2005; INSTITUTE OF MEDICINE, 2001; INSTITUTE OF MEDICINE, 2019; KOMINIAREK, 2017; LE, 2016; NIH, 2019.

Existem grupos que apresentam maior risco de saúde ao obter quantidades insuficientes de ferro na dieta devido as suas condições fisiológicas, socioeconômicas ou estilo de vida, dentre os quais se destacam as mulheres, crianças e pessoas de baixa renda (WHITTAKER *et al.*, 2001). Os principais grupos com risco de apresentar deficiência de ferro são:

- Mulheres em idade fértil (BLACK *et al.*, 2011; MARKOVA *et al.*, 2015; AHMADI *et al.*, 2016; NIH, 2019)
- Bebês e crianças (AGGETT *et al.*, 2012; NIH, 2019)
- Doadores de sangue (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001; WHO, 2001; CABLE *et al.*, 2011; NIH, 2019)
- Pacientes com câncer e portadores de doenças hemorrágicas (WHO, 2001; NIH, 2019).
- Pessoas com problemas gastrointestinais ou insuficiência cardíaca (CABLE *et al.*, 2011; NIH, 2019).
- Vegetarianos e veganos (CRAIG, 1994; INSTITUTE OF MEDICINE, 2001; HUNT, 2003; LÖNNERDAL, 2009).
- Atletas e praticantes de atividades físicas (ROSSI, 2005; SINCLAIR *et al.*, 2005; CLÉNIN *et al.*, 2015; PARKS *et al.*, 2017).

Em todos os casos mencionados acima, o tratamento da deficiência de ferro ocorre mediante a combinação de acompanhamento dietético e terapia oral com ferro, sendo utilizado o ferro intravenoso apenas nos casos mais urgentes ou graves (CLÉNIN *et al.*, 2015). A utilização de suplementos de ferro ou multivitamínicos geralmente leva a um aumento de sua ingestão diária de 7,95% em crianças e adolescentes e 37,55% em mulheres (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001) com uma taxa de absorção variando de 5% a 35% (ABBASPOUR *et al.*, 2014). Esse fato sugere que, devido a sua baixa solubilidade e biodisponibilidade, mesmo com uma ingestão suficiente de ferro, ainda existe a possibilidade deste mineral não ser absorvido e utilizado pelo organismo na sua totalidade, variando de acordo com as circunstâncias e tipo de ferro consumido. Além disso, doses elevadas de ferro suplementado (superiores a 45 mg por dia) podem causar problemas gastrointestinais, como náuseas e constipação (INSTITUTE OF MEDICINE, 2001) o que dificulta o aumento da dose.

Por outro lado, embora o ferro seja considerado como insolúvel, as formas frequentemente utilizadas em suplementos incluem sais de ferro ferroso e férrico, como o

sulfato ferroso, gluconato ferroso, citrato férrico e sulfato férrico. O ferro ferroso presente em suplementos dietéticos é mais biodisponível para o organismo do que o ferro férrico, pois apresenta uma solubilidade mais elevada (ATKINS *et al.*, 2010; INSTITUTE OF MEDICINE, 2019). Outras formas de ferro em suplementos, como polissacarídeos, aminoácidos ou polipeptídeos complexados com ferro, apresentam menores efeitos colaterais gastrointestinais quando comparados a sais férricos ou ferrosos devido ao aumento da biodisponibilidade por serem provenientes de biomoléculas (BAKER ; GREER, 2010; NIH, 2019).

Com base nos desafios nutricionais para uma ingestão saudável de ferro, é vantajoso introduzir o uso de suplementos e alimentos que possuam uma biodisponibilidade mais eficiente do que os sais de ferro, possibilitando, desse modo, uma melhor absorção do mineral e, conseqüentemente, uma dieta mais saudável. Entre as alternativas, destaca-se o consumo de leveduras enriquecidas com ferro, um produto que pode ser empregado tanto como suplemento alimentar quanto como componente na fabricação de alimentos e bebidas. Este produto apresenta potencial para evitar a deficiência e auxiliar no tratamento da reposição de ferro no organismo, e pode ser acessível para os principais grupos de risco.

2.3 Leveduras na nutrição

As leveduras são fungos unicelulares que se reproduzem assexuadamente por brotamento, sendo classificadas em Ascomycetos ou Basidiomycetos. São consideradas como o primeiro grupo de microrganismos utilizado pela humanidade, uma vez que desde a antiguidade têm sido empregadas na elaboração de pães e bebidas alcoólicas e, atualmente, atuam como organismos modelos no desenvolvimento de diversas pesquisas, com ênfase no desenvolvimento de produtos biotecnológicos (MATTANOVICH *et al.*, 2014; TÜRKER, 2014).

As leveduras são fontes de nutrientes e possuem propriedades prebióticas e probióticas. Esses microrganismos são utilizados em uma extensa variedade de aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica devido a sua versatilidade e efeitos benéficos para a saúde. A biomassa e o extrato de levedura são amplamente utilizados como fontes de nitrogênio em cultivos microbianos e na nutrição de animais e humanos. Um exemplo disso é o uso das leveduras como suplemento alimentar devido a seu alto valor nutricional (TÜRKER, 2014; LI *et al.*, 2020).

Segundo Jach (2015) e Garay *et al.* (2016), a composição da biomassa de levedura apresenta diversos nutrientes biodisponíveis: proteínas, minerais, vitaminas (principalmente do complexo B), glucanas, mananas, lipídeos e baixo teor de sódio. Além de auxiliar na absorção de nutrientes e beneficiar o sistema imunológico, contribui para a regulação das atividades intestinais. Também pode ser usada no tratamento de acne e problemas relacionados e na redução nos níveis lipídicos no corpo, e, portanto, diminuir o risco de doenças cardiovasculares e obesidade.

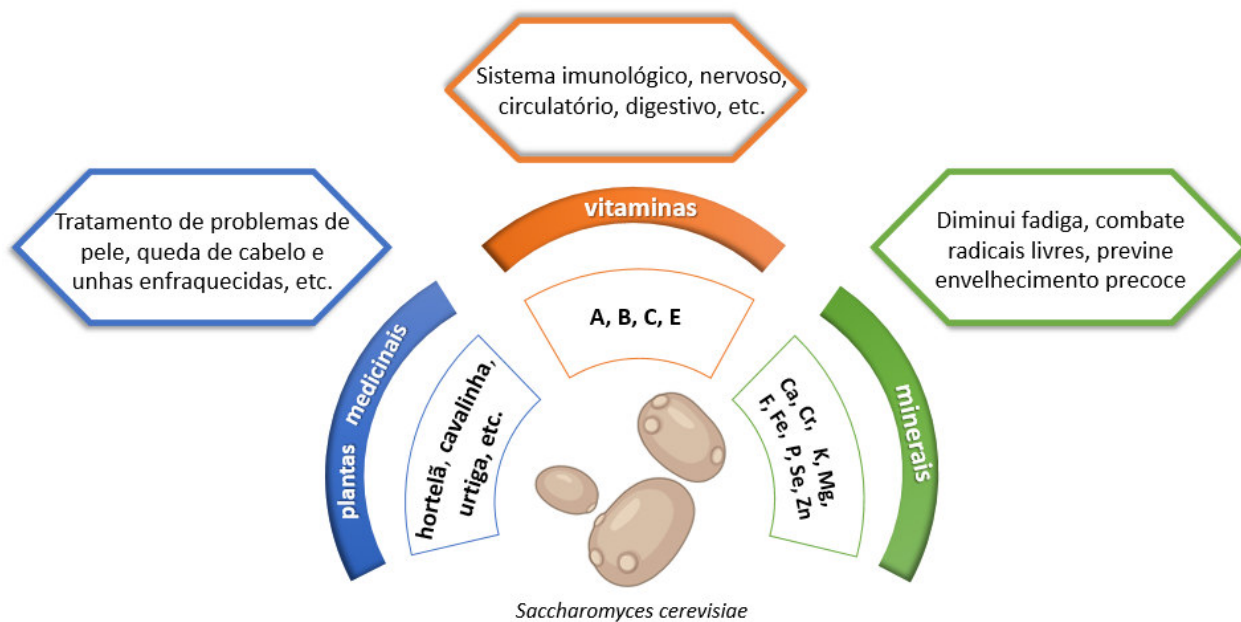
Devido a sua composição, a biomassa de levedura é um suplemento recomendado para vegetarianos e veganos, por conter vitaminas do complexo B (presentes principalmente em carnes) de difícil obtenção nesse tipo de dieta. É recomendada especialmente para adolescentes, pois contribui para o ganho de massa muscular e manutenção do peso corporal, sendo benéfica, inclusive, para pessoas com alergias e/ou sensibilidades alimentares devido à ausência de compostos derivados de leite e glúten (LI *et al.*, 2020).

No mercado existem suplementos alimentares de biomassa de levedura em diferentes formatos que variam desde pó ou flocos para se adicionar aos alimentos e bebidas, até cápsulas e comprimidos. Além disso, podem ser adicionados ingredientes derivados de plantas medicinais, vitaminas ou sais minerais para potencializar os benefícios à saúde mencionados acima (Figura 1); porém a levedura enriquecida com ferro é apenas um potencial produto em desenvolvimento. (JACH *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2020).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é a espécie mais utilizada na panificação e fermentação alcoólica desde a antiguidade. De acordo com a *Food and Drug Administration (FDA)*, possui classificação “GRAS” (*Generally Recognized As Safe*) e, portanto, é considerada como segura para uso consumo humano. Diversos estudos têm sido realizados com essa espécie visando à obtenção de produtos para uso alimentício e farmacêutico, tais como pães, bebidas alcoólicas ou enzimas, e enriquecimento com minerais como suplementos alimentares (FERREIRA *et al.*, 2010; JACH *et al.*, 2015; LI *et al.*, 2020).

O Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios), sob coordenação do Prof. Dr. Silvio Silvério da Silva tem desenvolvido pesquisas envolvendo a utilização de subprodutos agrícolas na produção de bioprodutos por diferentes espécies de levedura e também de biomassa de levedura com potencial uso na alimentação animal (MARTINIANO, 2017), com destaque para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.

Figura 1 - Exemplos de aditivos agregados a biomassa de levedura empregada como suplemento alimentar.



Fonte: JACH *et al.* (2015).

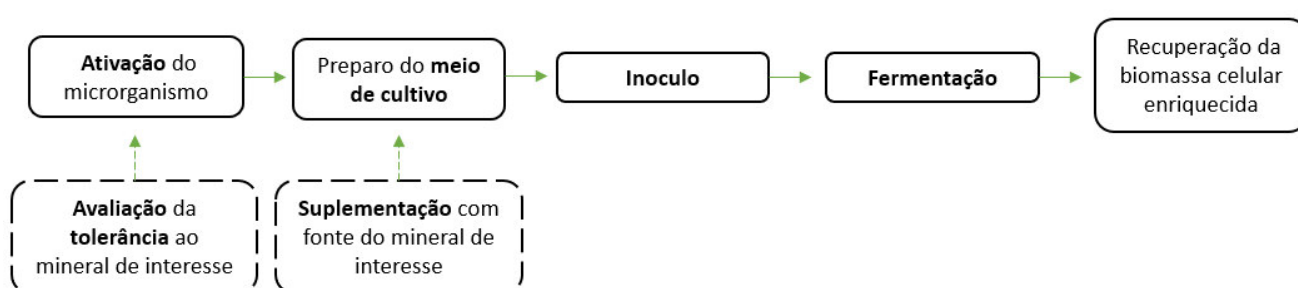
2.4 Leveduras enriquecidas com ferro

A biomassa de levedura, além de ser rica em proteínas e vitaminas, contém micronutrientes essenciais para o metabolismo humano e, entre esses elementos, destacam-se o ferro, magnésio e zinco. Além disso, as leveduras possuem a capacidade de acumular minerais em pouco tempo (TÜRKER, 2014). Essa característica é atualmente estudada na área alimentícia, farmacêutica e de biorremediação, sendo essa última para a remoção de metais pesados em águas e esgotos (FERREIRA *et al.*, 2010; JOHNSON ; ERASUN, 2011; TÜRKER, 2014; LI *et al.*, 2020).

O enriquecimento da biomassa de leveduras com minerais é uma tendência atual, já que os efeitos benéficos do mineral são somados as propriedades nutricionais desses microrganismos. Mediante um processo simples (Figura 2), a produção de biomassa de levedura enriquecida com minerais aproveita a capacidade de assimilação do microrganismo e seu rápido crescimento como vantagem comercial (MARTINIANO, 2017).

Para esse processo, geralmente são usados meios sintéticos elaborados com componentes como glicose, extrato de levedura e peptona, que possuem maior custo. No entanto, também podem ser utilizados meios de cultura produzidos a partir de subprodutos agroindustriais de origem amilácea, reduzindo os custos do processo e também a competição com os alimentos, além de serem fontes ricas em açúcares (MARTINIANO, 2017; MARTINIANO et al., 2020).

Figura 2 - Fluxograma do processo simplificado de produção de biomassa de levedura enriquecida.



Fonte: Autoria própria

Estudos realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* comercial mostraram que, além de ser uma fonte rica em nutrientes, a biomassa de levedura enriquecida com ferro potencializa a biodisponibilidade desse mineral (KYYALI *et al.*, 2015), mantém suas capacidades fermentativas (GAENSLY, 2010) e pode ser usada na fabricação de alimentos e bebidas ou como aditivo nutricional e de sabor (FERREIRA *et al.*, 2010). Também tem sido demonstrado que a ingestão de biomassa de levedura enriquecida com ferro apresenta maior efetividade no tratamento da deficiência de ferro do que o uso de fontes de ferro inorgânicas (como os sais minerais) devido ao aumento na biodisponibilidade do mineral, e auxilia na recuperação dos tecidos danificados por esta deficiência em mamíferos (KYYALI *et al.*, 2015).

2.4.1 Incorporação de metais por leveduras

Para que ocorra uma produção eficiente de leveduras enriquecidas com minerais é necessário fornecer um meio de cultura suplementado com o mineral de interesse por meio do uso de compostos inorgânicos como os sais em concentrações adequadas de acordo com a levedura empregada (MARTINIANO, 2017; LI *et al.*, 2020).

Quanto maior é a concentração do mineral, maior é sua acumulação intracelular, porém, no caso do ferro, a produção de espécies reativas de oxigênio devido a altas concentrações inibe o crescimento celular (RAMOS-ALONSO *et al.*, 2018). Portanto, o ferro deve estar presente no meio de cultivo em concentrações toleradas pela levedura para que a célula consiga assimilá-lo sem diminuir a produção de biomassa (JACH, 2015).

Os sais utilizados para a suplementação do meio de cultivo podem ser férricos ou ferrosos, no entanto, os sais ferrosos são aproveitados pela célula com maior facilidade. Foi reportado por Gaensly (2010) que o sulfato e o cloreto ferroso são incorporados em maior concentração intracelular pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, quando comparados com sais férricos, como citrato e EDTA. Uma vez dentro da célula, ocorre uma biotransformação do mineral, que pode estar presente em vacúolos e mitocôndrias ou incorporados aminoácidos e outras biomoléculas, além da possibilidade de ser adsorvido na parede celular (GAESLY *et al.*, 2014; RAMOS-ALONSO *et al.*, 2018).

Segundo Mrvicic (2007), as células de levedura realizam um processo de bioadsorção dos metais com dupla valência na parede celular devido as proteínas de superfície com grupos amino, hidroxila, fosfato, carboxila e hidrossulfato livres e também graças a presença de fosfomananas. O processo de bioadsorção atinge o ponto máximo no primeiro período de cultivo da biomassa que pode corresponder com a fase de adaptação ou fase exponencial do cultivo, após o qual se observa um processo de bioacumulação que significa uma ligação lenta do mineral às estruturas intracelulares, no caso do ferro, em mitocôndria e vacúolos principalmente (PARK *et al.*, 2013).

Esta incorporação do metal a moléculas orgânicas como polissacarídeos, aminoácidos ou polipeptídeos contribui ao aumento da biodisponibilidade do mineral já que as biomoléculas são facilmente assimiladas no aparelho digestório de humanos e animais e apresentam menos efeitos colaterais quando consumidas em concentrações elevadas (BAKER ; GREER, 2010; NIH, 2019).

Além disso, como mencionado anteriormente, a produção de biomassa de levedura é geralmente realizada utilizando meio de cultivo sintético ou elaborado com fontes de carbono ricas em açúcares, como melaço de cana-de-açúcar (GAENSLY, 2010). No entanto, o uso de meios de cultivos alternativo e a utilização de subprodutos agroindustriais no processo representa novidade, além de vantagens econômicas e ambientais.

Em trabalhos anteriores realizados no Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios) foi possível desenvolver um bioprocessos de produção de levedura enriquecida com selênio que resultou no depósito da patente

registrada sobre nº BR102016024902-3, relacionada à produção de levedura enriquecida com minerais com possível aplicação na alimentação animal (USP, 2016).

2.5 Subprodutos agroindustriais como substrato em processos fermentativos

Os processos fermentativos são amplamente empregados no setor industrial, pois são a base para a elaboração de diversos produtos nas áreas alimentícia, agroindustrial e farmacêutica. Conforme a AGEITEC (2012), o termo “processo fermentativo” não é limitado ao antigo conceito de fermentação, o qual não requer a presença de oxigênio nas reações metabólicas. Considera-se processo fermentativo o processo em que um microrganismo gera um bioproduto a partir de seu crescimento em uma fonte apropriada de nutrientes em condições anaeróbicas ou aeróbicas.

Os processos fermentativos são constituídos por três etapas principais que são: (1) o preparo do meio de cultura, (2) a fermentação e (3) a obtenção e purificação do produto. Dependendo do processo é o tipo de matéria prima empregada na primeira etapa, geralmente, os meios de cultura são sintéticos. Essa primeira parte do processo pode corresponder a até 70% do custo do produto final (AGEITEC, 2012). Nesse contexto, quanto mais barata a matéria prima, maior será o custo-benefício da produção.

Os principais tipos de matéria prima empregada nos meios de cultivo são as fontes sintéticas e a biomassa vegetal. No entanto, no caso da biomassa vegetal, dependendo da fração vegetal empregada, seu uso pode competir com a produção de alimentos (por exemplo, no caso da cana-de-açúcar, utilizada na produção de açúcar e de etanol 1G), o que pode contribuir, conseqüentemente, ao aumento de preço dos alimentos. Porém, o uso de subprodutos derivados das indústrias sucroalcooleiras, de papel, alimentícias, entre outras, assim como das etapas de beneficiamento de cultivos vegetais, como ocorre com os grãos e a cana-de-açúcar, não compete diretamente com o fornecimento de alimento à população (MARCELINO, 2016; MARTINIANO, 2017).

É assim como os subprodutos agroindustriais começaram a ser considerados como uma opção viável para ser integrados a processos fermentativos como substratos devido a seu baixo custo e alto valor nutricional, além de não competir diretamente com o fornecimento de alimento (BELTRÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2019; PHILIPPINI *et al.*, 2020). Ademais, muitos dos subprodutos provenientes das agroindústrias são descartados incorretamente devido a seu acúmulo, trazendo consigo problemas ambientais (AYOO; BONDI-ANKOMAH, 2019). É por

isso que seu aproveitamento em diversos processos fermentativos pode ajudar a aliviar o dano ambiental, além de diminuir o custo total da produção de produtos de valor agregado e aumentar o benefício econômico do processo ao ser integrados em um esquema sustentável de biorefinerías (BELTRÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2019; PHILIPPINI *et al.*, 2020).

Os principais tipos de subprodutos agroindustriais que podem ser empregados como meio de cultivo são a biomassa lignocelulósica proveniente de plantas como a cana-de-açúcar, árvores e gramas, composta principalmente por celulose, hemicelulose e lignina; e a biomassa amilácea, proveniente de cultivos como os grãos, composta principalmente de amido, além de fibra, lipídeos, proteína e minerais (ROSTAGNO *et al.*, 2011; PHILIPPINI *et al.*, 2020).

Um exemplo do aproveitamento de subprodutos agrícolas na geração de bioprodutos de valor agregado é a tecnologia de produção de etanol de segunda geração (2G). A palha e o bagaço da cana-de-açúcar são submetidos a processos químicos e enzimáticos de sacarificação para serem aproveitados como substrato na geração de etanol 2G (JUNQUEIRA *et al.*, 2017). Porém, o aproveitamento industrial dos subprodutos agroindustriais como substrato continua sendo pesquisado assim como as vantagens e processos necessários para seu aproveitamento na área biotecnológica (BELTRÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2019; PHILIPPINI *et al.*, 2020; SHIRAHIGUE ; CECCATO-ANTONINI, 2020).

Nesse contexto o Laboratório de Bioprocessos e Produtos Sustentáveis (LBios) tem focado suas pesquisas no desenvolvimento de bioprodutos de elevado valor agregado a partir de biomassa vegetal de subprodutos agrícolas, evitando a competição com a produção de alimentos e, ao mesmo tempo, contribuindo a diminuição do impacto ambiental e reduzindo os custos dos processos fermentativos. Atualmente o grupo de pesquisa tem conseguido com sucesso a produção de etanol 2G, asparaginase, biopolímeros, biosurfactantes, biopigmentos, biomassa de levedura enriquecida com minerais e outros produtos a partir de subprodutos lignocelulósicos e amiláceos (MARTINIANO, 2017; PHILIPPINI, 2017; DUSSÁN *et al.*, 2019; CACHUMBA *et al.*, 2019; MARCELINO *et al.*, 2019; PHILIPPINI *et al.*, 2020).

2.6 Métodos de pré-tratamento da biomassa vegetal

A biomassa vegetal é formada por biopolímeros de polissacarídeos. Sua estrutura é baseada principalmente em monômeros de açúcares fermentescíveis. No entanto, para que esses açúcares possam ser empregados como substrato em processos biotecnológicos é necessário liberá-los da matriz polimérica.

Para cumprir com esse objetivo é realizada uma etapa de pré-tratamento da biomassa vegetal. Os tratamentos empregados podem ser físicos, químicos, físico-químicos ou biológicos. A escolha do tipo de pré-tratamento, assim como as condições deste, são dependentes do tipo de biomassa e do produto a ser obtido (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

Dentro da classificação dos tratamentos químicos, o pré-tratamento ácido tem sido amplamente estudado. O ácido sulfúrico (H_2SO_4) é usado como catalizador na solubilização e obtenção dos açúcares, o que permite sua utilização em meios de cultura para serem metabolizados pelos microrganismos. O pré-tratamento ácido é geralmente realizado sob temperatura e pressão elevadas e pode ser acompanhado por hidrólise enzimática por amilases. (ADEL *et al.*, 2010; PHILIPPINI, 2017).

De acordo com Wang e Copeland (2015), a hidrólise ácida em materiais amiláceos modifica o tamanho e a estrutura dos grânulos de amido, melhora sua solubilidade e modifica suas propriedades. Esse pré-tratamento além de liberar monômeros e oligômeros de açúcares redutores, também libera outros componentes como proteínas, ácido acético e compostos fenólicos, esses últimos classificados como inibidores do crescimento microbiano liberados a partir de materiais lignocelulósicos (MARTINIANO, 2017).

Após do pré-tratamento ácido, o hidrolisado é separado da biomassa por centrifugação e/ou filtração para ser usado como substrato ou como um dos componentes do meio de cultura no processo fermentativo (PHILIPPINI, 2017; MARTINIANO, 2017).

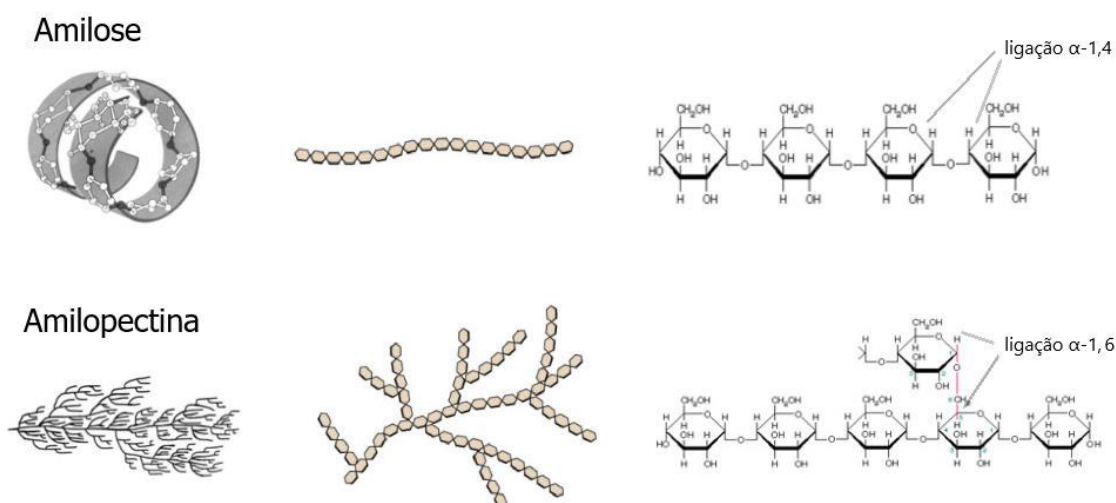
2.7 Materiais amiláceos

São considerados como materiais amiláceos os grãos, as raízes e os tubérculos. Os primeiros constituem uma base alimentar para a humanidade, pois toda a civilização fundamenta sua alimentação em pelo menos um tipo de grão, sendo os mais consumidos no mundo o milho, o trigo, a soja e o arroz. Além do seu alto teor de amido, também possuem proteínas, minerais, lipídeos e fibras (PAES, 2006; ROSTAGNO *et al.*, 2011; PHILIPPINI, 2017).

O amido é um biopolímero que funciona como reserva energética em vegetais e está presente na forma de grânulos. Possui importante aplicação na indústria alimentícia e também está presente na elaboração de produtos não alimentícios, como embalagens, fármacos, entre outros produtos com finalidades variadas (MICULESCU *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2017; SANYANG *et al.*, 2018). Esse biopolímero é constituído pelos polissacarídeos amilopectina e

amilose em proporções variadas, dependendo do vegetal de origem. Como mostrado na Figura 2, esses polissacarídeos são formados por monômeros de D-glicose unidos de forma linear por ligações α -1,4 formando a estrutura helicoidal da amilose. No caso da amilopectina, apresenta ramificações com ligações α (1 \rightarrow 6) em sua estrutura (VARNADEVAN ; BERTOFT, 2014). Devido a que o amido é constituído por monômeros de glicose, este pode ser aproveitado como substrato para diversos bioprocessos uma vez liberada a glicose do complexo amiláceo (MARTINIANO *et al.*, 2020).

Figura 3 - Estrutura de amilose e amilopectina



Fonte: ROSTAGNO *et al.*, 2011; A LEVEL BIOLOGY, 2020

2.7.1 Farelos amiláceos

A soja, o milho e o trigo são parte dos principais cultivos agrícolas do Brasil e os principais cultivos amiláceos. (Tabela 2), ao igual que o arroz. O milho é o segundo grão mais produzido no Brasil, após da soja, e o trigo ocupa a quarta posição (CONAB, 2017b; CONAB, 2019). Portanto, no Brasil a quantidade de subprodutos disponíveis destes grãos é abundante e constitui uma potencial matéria-prima para o desenvolvimento de processos biotecnológicos devido a sua composição.

Tabela 2 - Composição e produção de soja, milho e trigo no Brasil e o mundo.

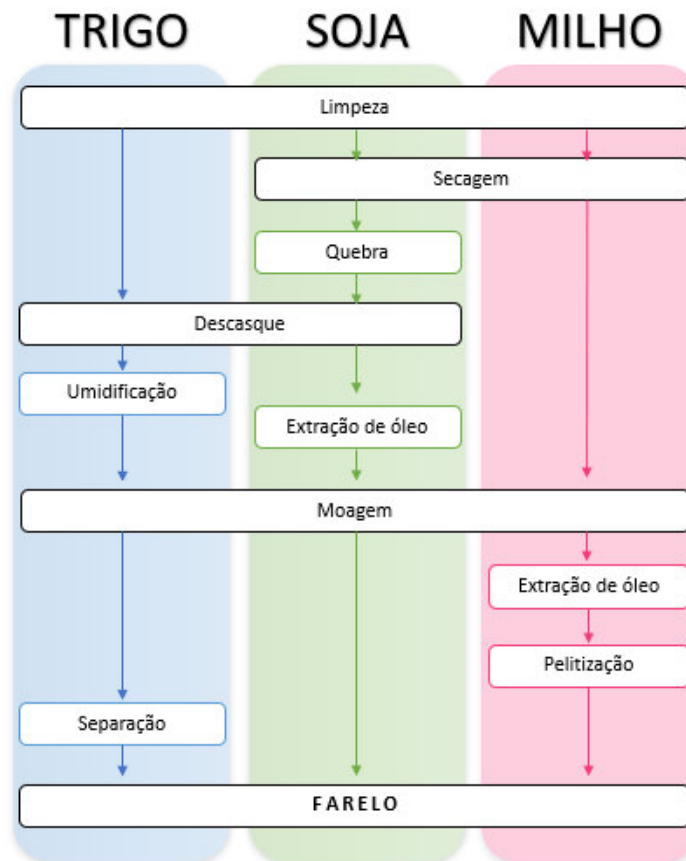
Fonte de farelo	Composição do farelo					Produção do grão		Uso comercial
	Amido (%)	Proteína (%)	Fibra (%)	Lipídeos (%)	Ferro (mg kg ⁻¹)	Safra Mundial 2019-2020 (milhões de toneladas)	Safra Nacional 2019-2020 (milhões de toneladas)	
Soja (<i>Glycine max</i>)	3 – 14	39 – 48	4-6	1-2	181-198	337,28	120,93	Alimentação animal Extração de óleo Alimentação humana
Milho (<i>Zea mays</i>)	15–22	8 – 17	1-13	1-6	56-132	1.112,40	102,14	Alimentação animal Extração de óleo e amido Alimentação humana
Trigo (<i>Triticum spp</i>)	26 -35	12 - 17	8-11	3-4	98 -160	764,10	6,83	Alimentação animal Extração de amido e glúten Alimentação humana

Fonte: EMBRAPA, 1983; NUNES *et al.*, 2001; EZEQUIEL *et al.*, 2006; PAES *et al.*, 2006; ZAMBOM *et al.*, 2008; ROSTAGNO *et al.*, 2011; TAKEITI *et al.*, 2012; WESENDOK *et al.*, 2013; AGROPECUARIA, 2019; CONAB, 2019; CONAB, 2020; EMBRAPA, 2020; EPM-UNIFESP, 2020; USDA, 2020a; USDA, 2020b.

Durante o processamento industrial de beneficiamento de grãos, ocorre a geração dos farelos, um subproduto rico em amido, proteínas, minerais, óleos, vitaminas e fibras, que é posteriormente utilizado na alimentação animal (PAES, 2006; ROSTAGNO *et al.*, 2011; WESENDONCK, 2012). O farelo de cada cultivo amiláceo é obtido de diferentes partes do grão o do processo industrial (EMBRAPA, 1983). Por exemplo, do ponto de vista tecnológico, o grão é dividido em casca, farelo, endosperma e germe. O farelo de trigo então, corresponde á película fina que reveste o grão (~14% do grão) e se encontra embaixo da casca. No caso do grão de soja, o farelo é o resíduo do grão após a extração do óleo que é posteriormente moído (com possível adição de casca), enquanto o farelo de milho é o grão de milho moído, que pode ou não ser submetido à extração de óleo ou xarope (EMBRAPA, 1983; WESENDONCK, 2012). A Figura 4 mostra um fluxograma simplificado do processo de obtenção dos farelos de trigo, soja e milho.

Por ser um subproduto de alto valor nutricional, os farelos apresentam potencialidade para ser empregados como substratos em processos fermentativos. Como mostrado em pesquisas anteriores do LBios, os hidrolisados obtidos a partir dos farelos de soja e de milho possibilitaram a produção de levedura enriquecida com selênio, sem adição de nenhum outro nutriente (MARTINIANO *et al.*, 2020), sendo possível a produção de biomassa microbiana enriquecida com outros minerais, como o ferro, utilizando diferentes concentrações de açúcares e proteínas.

Figura 4 - Fluxograma do processo industrial de obtenção dos farelos de trigo, soja e milho.



Fonte: Autoria própria

Neste contexto, aproveitando a experiência adquirida nos estudos anteriores, o presente trabalho tem como objetivo estudar a produção de levedura enriquecida com ferro a partir de subprodutos amiláceos como matérias-primas, uma vez que a biomassa de levedura representa uma opção viável como suplemento alimentar ou como aditivo em alimentos, auxiliando na prevenção e no tratamento da deficiência de ferro e suas consequências, tanto em humanos, quanto em animais (PAS *et al.*, 2008; KYALI *et al.*, 2015).

Os resultados servirão como subsídios para o desenvolvimento de tecnologia sustentável de produção de um importante produto biotecnológico.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral:

Produzir biomassa de levedura enriquecida com ferro a partir de subprodutos agroindustriais com possibilidade de uso na alimentação animal e humana.

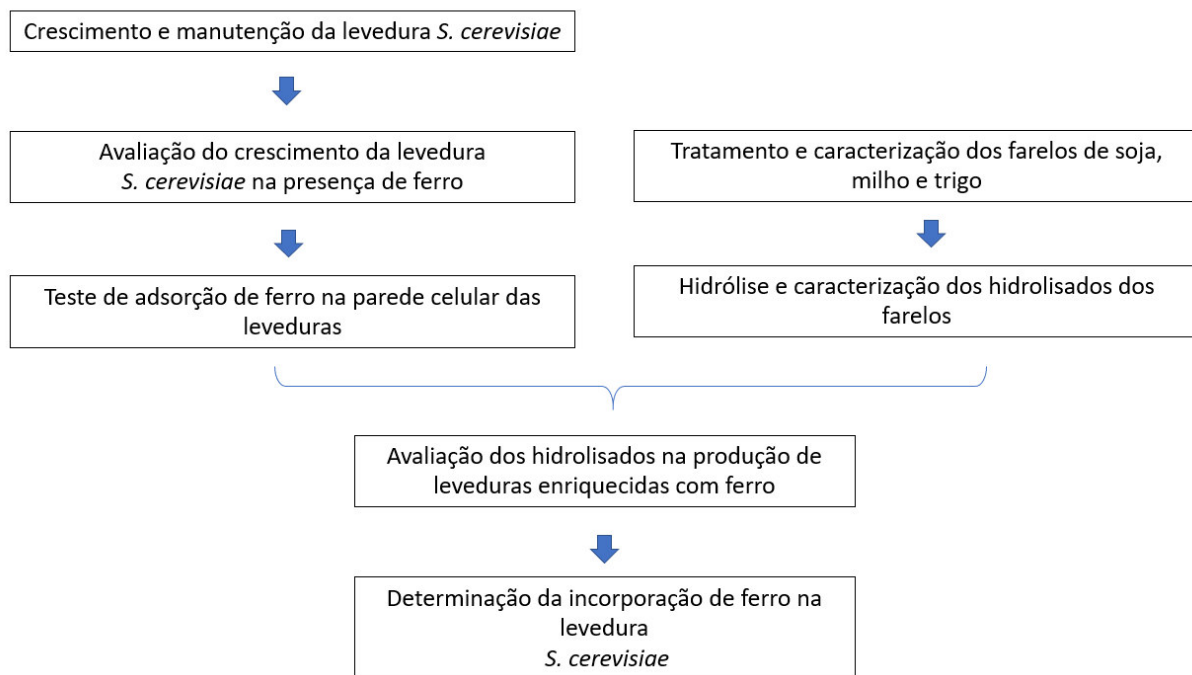
3.2 Específicos:

- Avaliar a tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de ferro e seu efeito no crescimento celular;
- Avaliar a composição dos farelos de trigo, soja e milho e dos seus respectivos hidrolisados, obtidos por pré-tratamento ácido;
- Estudar a utilização de hidrolisados provenientes de biomassa amilácea como fontes de carbono e de nitrogênio em processos fermentativos para a produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 5 apresenta o fluxograma das principais etapas experimentais utilizadas para o desenvolvimento do presente trabalho.

Figura 5 - Fluxograma de etapas desenvolvidas no presente trabalho.



Fonte: Autoria própria

4.1 Microrganismo

Utilizou-se uma linhagem comercial de *Saccharomyces cerevisiae* (Saf-Instant® - Lesaffre), empregada comercialmente para a produção de pães e massas.

4.2 Ativação da levedura e preparo do inóculo

4.2.1 Ativação

Para a ativação do microrganismo, transferiu-se assepticamente uma alíquota das células para 50 mL de meio YPG (10 g L⁻¹ de extrato de levedura, 20 g L⁻¹ de peptona e 30 g L⁻¹ de

glicose), previamente esterilizado a 121 ° C por 15 minutos, sendo cultivado em incubadora de bancada com agitação de 200 rpm e temperatura de 30 ° C durante 24 horas. Após este período, as células foram recuperadas por centrifugação a 3000 rpm por 15 minutos, lavadas com água destilada estéril, centrifugadas novamente e suspensas em água destilada. A partir dessa suspensão celular foram inoculadas placas de Petri a partir da transferência de 100 µL da suspensão celular para o meio YMA previamente esterilizado (3 g L⁻¹ de extrato de levedura, 3 g L⁻¹ extrato de malte, 5 g L⁻¹ de peptona, 10 g L⁻¹ de glicose e 20 g L⁻¹ de ágar). As placas foram incubadas a 30 ° C por 48 horas até o aparecimento das colônias. As placas inoculadas foram mantidas sob refrigeração para o posterior uso no preparo de pré-inóculo.

A manutenção da levedura ocorreu nas mesmas condições, porém com a transferência das colônias por meio de alça de platina, sendo o repique realizado a cada trimestre.

4.2.2 Preparo do inóculo

O preparo do pré-inóculo para processos fermentativos ao longo do presente trabalho foi realizado por meio da transferência de uma alçada das colônias presentes nas placas de Petri para meio de cultivo YPG. Posteriormente foram realizadas suspensões celulares com concentração celular conhecida a partir do pré-inóculo de acordo com as condições citadas no item 4.2.1 para ser usadas como inóculo dos processos fermentativos. A concentração celular foi determinada por contagem celular por microscopia óptica em câmara de contagem como descrito no item 4.9.1.

4.3 Avaliação do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na presença de ferro

Realizou-se um teste de tolerância ao ferro na forma de sulfato ferroso (FeSO₄·7H₂O) pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, baseando-se na avaliação do crescimento do microrganismo na presença de ferro (Fe⁺²) em diferentes concentrações: 15, 30 e 45 mg L⁻¹.

Essa análise foi realizada em placas de Petri contendo meio YMA sem adição de ferro como controle e meio com adição de ferro (ágar YMA-Fe⁺²) preparados por três diferentes métodos: (1) ágar YMA autoclavado ao qual foi adicionada uma solução de ferro filtrada em membrana Whatman de nylon com diâmetro de poro de 0.2 µm; (2) ágar YMA autoclavado,

adicionando-se uma solução de ferro sem autoclavar; e (3) ágar YMA acrescido da solução de ferro e posteriormente autoclavado.

4.4 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em frascos Erlenmeyer

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer contendo 40 % de seu volume preenchidos com meio de cultivo. Os cultivos foram mantidos sob agitação de 200 rpm a 30 ° C durante 72 horas em shaker de bancada. Os cultivos foram realizados em triplicata e calculado o desvio padrão a partir dela; os controles de cada ensaio foram realizados em meio de cultura sem adição de Fe^{+2} .

Durante o cultivo foram retiradas alíquotas que foram tratadas como descrito no item 4.2 para a separação do meio de cultivo e a biomassa celular para as posteriores análises de ferro total, crescimento celular e viabilidade, pH, açúcares redutores e produção de subprodutos, como descrito nos itens 4.9 e 4.10.

4.5 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético enriquecido com ferro

Inicialmente, o cultivo para enriquecimento de *Saccharomyces cerevisiae* com Fe^{+2} foi realizado em meio YPG acrescido de 15 mg L⁻¹ de Fe^{+2} , concentração escolhida de acordo com resultados prévios no teste de tolerância em placas de Petri. Para a suplementação do metal foi utilizada uma solução padrão de 1000 mg L⁻¹ de Fe^{+2} utilizando sulfato ferroso hepta-hidratado ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) como fonte de Fe^{+2} .

Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 40 % de seu volume preenchidos com meio de cultivo, utilizando-se dois meios de cultivo: YPG (sem adição de ferro) e YPG- Fe^{+2} (com adição de 15 mg L⁻¹ de Fe^{+2}).

4.6 Teste de adsorção de ferro na parede celular da levedura

Para verificar se o ferro é apenas adsorvido à parede celular das leveduras foi realizado um teste com células inativas de levedura em meio YPG- Fe^{+2} . O inóculo foi preparado como descrito nos itens 4.2 e esterilizado a 121 ° C por 15 minutos com o objetivo de inativar os microrganismos. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer, contendo 40 % de seu volume de meio, mantidos sob agitação de 200 rpm, 30 ° C por 72 horas.

Após esse processo, as leveduras foram centrifugadas e lavadas com água destilada, conforme descrito no item 4.2, e armazenadas sob refrigeração para posterior análise de ferro.

4.7 Caracterização dos farelos de soja, milho e trigo

Os farelos de soja, milho e trigo, após terem seu teor de umidade determinado (item 4.9.2), foram submetidos à determinação de extrativos por etanol em aparelho Soxhlet durante 6 horas e determinação de cinzas em mufla a 500 ° C durante 24 horas. A biomassa restante após a extração foi submetida à hidrólise ácida com H₂SO₄ 72% m/v durante 1 hora em banho termostático a 30 ° C e posteriormente em autoclave durante 1 hora à 1 atmosfera (atm) de pressão. A determinação de lignina solúvel e insolúvel foi realizada por gravimetria após separação por filtração usando cadinhos de vidro com disco poroso e a determinação de celulose e hemicelulose foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com cromatógrafo Shimadzu LC-10AD, com um detector de índice de refração e coluna Bio Rad (Hercules, CA) Aminex HPX-87 H. (MOSIMANN ; CASSEMIRO, 2017).

4.8 Hidrólise e caracterização dos hidrolisados dos farelos de soja, milho e trigo

Os farelos de trigo, milho e soja, foram submetidos à hidrólise ácida em frascos Erlenmeyer com 1 % H₂SO₄ (m/v) e relação sólido:líquido com 20 % de teor de sólidos, com base em massa seca tendo seu teor de umidade previamente determinado. Após hidrólise ácida a 121 ° C por 15 minutos, cada hidrolisado foi filtrado para separação das partículas sólidas, o pH foi ajustado para 5,5, e os hidrolisados foram centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. Alíquotas foram armazenadas sob refrigeração para análises posteriores dos açúcares, pH, proteínas e compostos fenólicos. Com a finalidade de empregar concentrações similares de fonte de carbono nos processos com os hidrolisados como meio de cultivo, a concentração de açúcares redutores foi ajustada mediante diluição.

4.9 Avaliação do uso dos hidrolisados na produção de leveduras enriquecidas com ferro

Para avaliar a utilização dos hidrolisados de subprodutos vegetais no cultivo de leveduras enriquecidas com ferro, foi realizado um teste preliminar empregando hidrolisados de farelo de trigo, farelo de milho e farelo de soja. Todos os hidrolisados tiveram seu pH inicial ajustado para 5,5 e teor de açúcares redutores ajustado para 12 g L^{-1} , valor próximo ao teor mínimo de açúcares obtido após a hidrólise ácida dos farelos. Em seguida, os hidrolisados foram suplementados com ferro para se obter uma concentração aproximada de 15 mg L^{-1} de Fe^{+2} e inoculados com aproximadamente $1 \times 10^8 \text{ cél mL}^{-1}$.

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio, em agitador orbital de bancada a 30° C , 200 rpm por 72 horas, com retirada periódica de amostras. Ao final do processo, as células foram centrifugadas e lavadas com água destilada como descrito no item 4.2 e armazenadas sob refrigeração para análises posteriores da incorporação de ferro.

4.10 Métodos analíticos

4.10.1 Determinação da concentração celular

A concentração celular das leveduras foi determinada pelos seguintes métodos:

4.10.1.1 Quantificação em câmara de contagem

O preparo das alíquotas para a determinação celular por microscopia óptica foi realizado como descrito no item 4.4. O número de células foi quantificado em câmara de contagem Agasse Lafont-R (Laboroptik, Reino Unido) e o cálculo da concentração celular das soluções obedece à seguinte equação:

$$\frac{\text{células}}{\text{mL}} = \left(\frac{\text{número de células contadas}}{6,25 \times 10^{-6}} \right) \times \text{factor de diluição}$$

Sendo o “número de células contadas” a média da quantidade de células contadas por quadrante.

4.10.1.2 Densidade óptica

O segundo método para a determinação da concentração celular foi baseado na obtenção de uma curva de peso seco correlacionada com densidade óptica da suspensão celular. A partir da solução concentrada de células obtida como descrito no item 4.2, realizou-se o cálculo de peso seco em cadinhos de porcelana previamente tarados e colocados em estufa a 60 ° C até peso constante; simultaneamente, diluições seriadas desde 1:10 até 1:2000 foram preparadas e analisadas em espectrofotômetro a 600 nm para obter a leitura dos valores de densidade óptica.

4.10.2 Determinação de viabilidade celular

Para o preparo do inóculo e o monitoramento da viabilidade celular durante o cultivo, realizou-se diluições com as células previamente lavadas, conforme descrito no item 4.2. A viabilidade celular das leveduras foi determinada pela coloração das células com o corante azul de metileno (OLIVEIRA, 2006). Nessa metodologia, as células viáveis permanecem incolores, enquanto as células mortas se coram em azul. Para isso, preparou-se uma solução 1:1 de suspensão celular e corante 0,01 %, a mistura foi homogeneizada e uma alíquota foi pipetada em câmara de contagem Agasse Lafont - R para ser observada por microscopia óptica sob aumento de 40X. O cálculo de viabilidade celular foi realizado pela subtração da quantidade de células mortas das células vivas e calculando a porcentagem total das células vivas.

4.10.2 Determinação do teor de umidade

A determinação do teor de umidade do bagaço de cana-de-açúcar e dos farelos de trigo, milho e soja foi realizada em balança analítica Marte, modelo ID50, por exposição do material à radiação infravermelha sob temperatura de 105 °C.

4.10.3 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método do DNS (ácido-2,5-dinitrosalicílico) (MILLER, 1959). Para isso, foi adicionado 0,5 mL de reativo de DNS a cada 0,5 mL de amostra e a solução foi mantida em banho de água fervente por 10 minutos. Após

esse período, o volume foi completado para 4,5 mL com água destilada. A absorbância foi lida em espectrofotômetro a 540 nm, com água destilada como branco. A curva de calibração foi realizada a partir de uma solução estoque de glicose de 1000 µg mL⁻¹.

4.10.4 Determinação de concentrações de açúcares, compostos inibidores e subprodutos de processos fermentativos

Para a determinação das concentrações de açúcares, ácido acético, e etanol as amostras, previamente diluídas, foram filtradas em filtro *Sep-Pak* C18 (WATERS C18 CLASSIC). As análises foram realizadas por CLAE em cromatógrafo *Agilent Technology*, equipado com coluna aminex HPX-87H (BIORAD) (300 x 7,8 mm), a 45 °C, utilizando uma solução de H₂SO₄ 0,01N como eluente, com fluxo de 0,6 mL min⁻¹, detecção por índice de refração (RID6A) e injeção de 20 µL de amostra (MARTINIANO, 2017).

4.10.5 Determinação de proteínas totais

A concentração de proteínas totais foi determinada com base no método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Foram utilizados três reativos específicos, a partir dos quais foi preparada uma mistura reativa no momento do uso, e, depois, adicionado o reativo de Folin-Ciocalteu. Para cada 200 µL de amostra foi adicionado 1 mL da mistura reativa, permanecendo em repouso sob o abrigo da luz por 10 minutos. Posteriormente, adicionou-se 100 µL de reativo de Folin-Ciocalteu diluído 1:3 (v/v) e, decorridos 10 minutos em escuro, a absorbância foi lida em espectrofotômetro a 660 nm.

As proteínas totais foram determinadas de acordo com uma curva de calibração elaborada a partir de uma solução estoque de 1000 µg mL⁻¹ de soroalbumina bovina, sendo o branco realizado com água destilada em substituição à amostra, com leitura de absorbância a 660 nm em espectrofotômetro.

4.10.6 Determinação do pH

O pH das amostras foi determinado em aparelho pH-metro Hanna HI221 previamente calibrado com soluções tamponantes de pH 4 e 10.

4.10.7 Determinação de ferro total (IPCL)

Para a degradação da matéria orgânica, as amostras foram misturadas com H_2SO_4 numa relação em frasco Erlenmeyer com funil de vidro para fechar o sistema e evitar a evaporação da amostra. Os frascos Erlenmeyer foram colocados sob aquecimento constante sem ferver em chapa de aquecimento durante aproximadamente 1 hora ou até ter equilíbrio nas fases líquida e gasosa do sistema. Posteriormente, foi adicionado H_3NO_4 e colocadas novamente sob aquecimento constante sem ferver em uma chapa de aquecimento aproximadamente 2 horas ou até obter equilíbrio no sistema, apresentando-se como uma solução límpida e transparente (MARTINS *et al.*, 2008).

A solução digerida, após resfriamento à temperatura ambiente, foi transferida para balão volumétrico e o volume foi aferido com água deionizada. As amostras tratadas foram transferidas para frascos de vidro para posterior análise de ferro total.

Após a digestão das amostras com H_2SO_4 e H_3NO_4 , foi realizada a análise de ferro total e outros minerais por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) em espectrômetro marca Perkin Elmer modelo Optima 8000 no Laboratório de Absorção Atômica do Departamento de Química da Escola de Engenharia de Lorena, lendo-se a amostra a uma longitude de onda de 259.943nm e com potência de 1400 watts. A curva padrão de ferro foi realizada com padrão comercial com concentração de 1000 mg L⁻¹.

4.11 Determinação da incorporação de ferro na levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A determinação da incorporação de ferro na biomassa da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada mediante a relação dos dados da análise de ferro total, calculados em mg L⁻¹, por espectrometria de emissão óptica, conforme descrito no item 4.9.8, e o cálculo da concentração celular em g L⁻¹ como descrito no item 4.9.1, tendo como resultado mg ferro total por grama de célula em massa seca.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação do crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* na presença de ferro

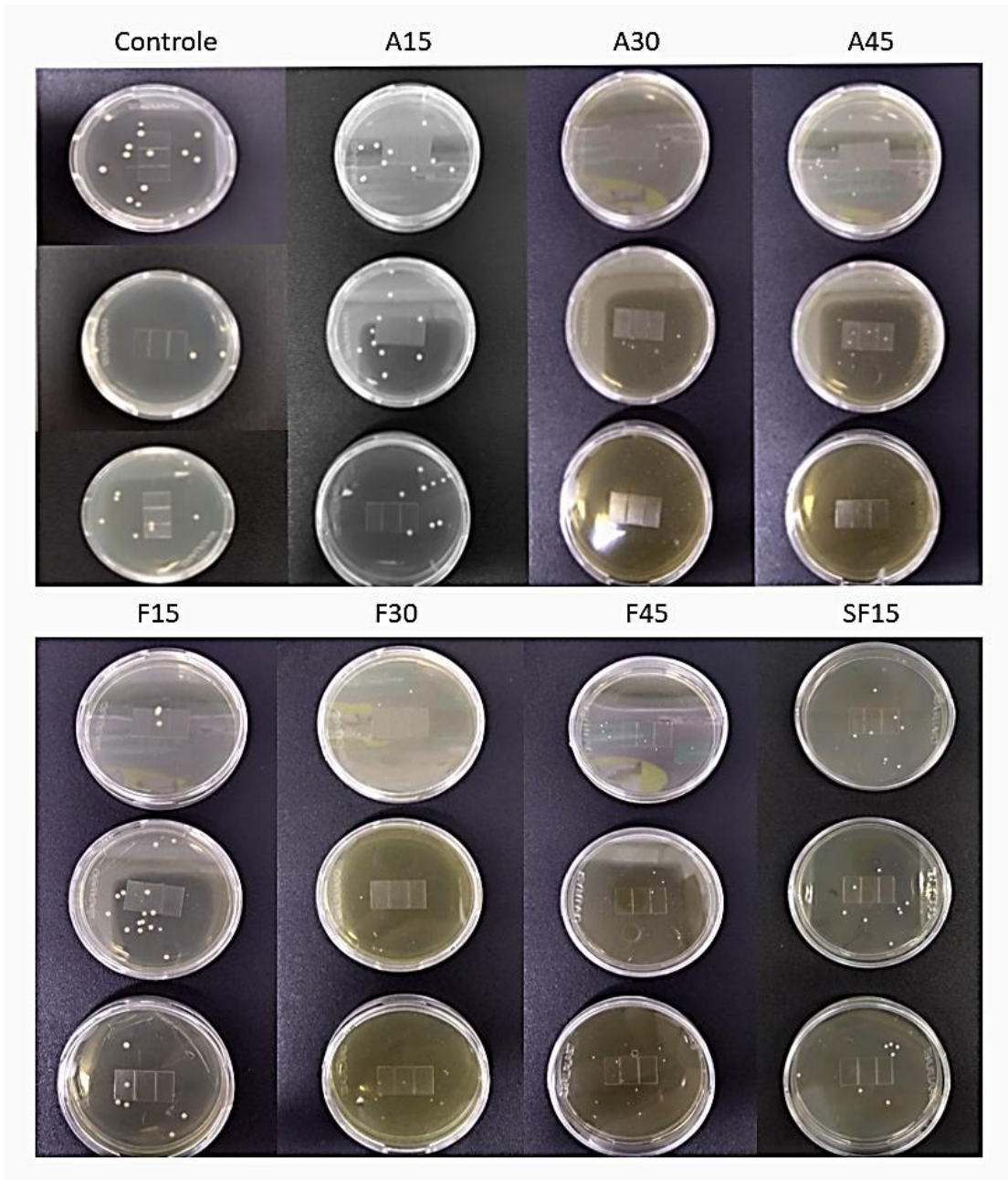
Os compostos de ferro apresentam baixa solubilidade em água e, além disso, tem sido reportado na literatura que o processo de esterilização do meio de cultura contendo ferro utilizando calor úmido sob pressão pode contribuir ao incremento dessa baixa solubilidade (GAENSLY, 2010). Desse modo, foram avaliados três métodos de preparação de meio de cultura utilizando Fe_2SO_4 como fonte de ferro no meio de cultivo: (1) ágar YMA (F) autoclavado ao qual foi adicionada uma solução de ferro filtrada; (2) ágar YMA (SF) autoclavado, adicionando-se uma solução de ferro sem autoclavar; e (3) ágar YMA (A) acrescido da solução de ferro e autoclavado.

Durante o processo de preparo das placas, não foi observada variação na solubilidade do Fe_2SO_4 nos diferentes métodos de preparo do meio de cultura, caso contrário com o incremento de concentração pois quanto maior a concentração, do sal, maior foi a formação de precipitado. Além disso, os cultivos preparados com adição de solução de ferro filtrada e sem filtrar foram mais propensos à contaminação por fungo.

Conforme os resultados, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi capaz de crescer em meio YMA sólido contendo 15, 30 e 45 mg L^{-1} de Fe^{+2} , além de não ser detectada mudança na coloração ou formato das colônias. Porém, foi observado que a presença deste mineral em concentrações superiores a 15 mg L^{-1} no meio de cultivo retardou seu crescimento e dificultou a visualização das colônias (Figura 6). Também foi observado escurecimento na cor do ágar e precipitação do sal de ferro na placa de Petri.

As placas de Petri contendo diferentes concentrações de Fe^{+2} foram mantidas em cultivo até 96 horas para possibilitar a visualização do crescimento das colônias, porém não foi possível detectar um aumento de tamanho das colônias, permanecendo razoavelmente estável após 72 horas de cultivo.

Figura 6 - Crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio YMA-Fe⁺² a 30 °C durante 72 horas. (Controle) meio YMA sem adição de ferro; (A) método de preparo com meio YMA-Fe⁺² autoclavado; (F) método de preparo com meio autoclavado e adição de solução de ferro sem filtrar; (15, 30 e 45) indicam a concentração em mg L⁻¹ de Fe⁺² presente no meio.

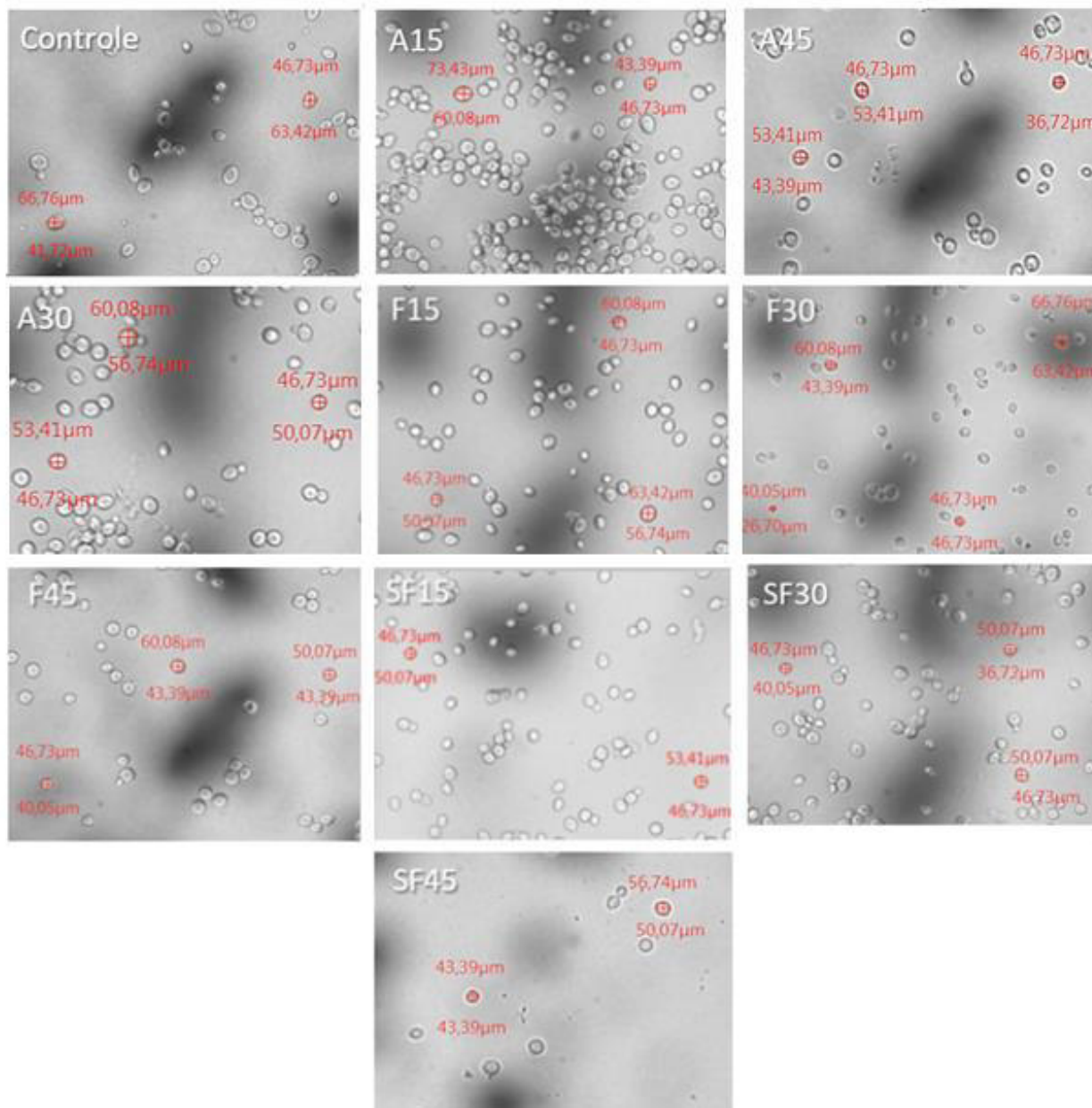


* Os cultivos SF30 e SF45 apresentaram contaminação por fungo (dados não apresentados).

Fonte: Autoria própria

Foi observado que quanto maior a concentração de Fe⁺² agregada ao meio, a formação de colônias demorou mais tempo. Porém, quando visualizadas sob microscopia óptica, não foi possível detectar mudanças morfológicas nas células (Figura 7).

Figura 7 - Microscopia óptica de *Saccharomyces cerevisiae* crescida em ágar YMA-Fe⁺² (15, 30 e 45 mg L⁻¹ de Fe⁺² respectivamente) a 30 °C durante 72 horas com aumento de 400X. (Controle) meio YMA sem adição de Fe⁺²; (A15, A30 e A45) método de preparo com meio YMA-Fe⁺² autoclavado; (F15, F30 e F45) método de preparo com meio autoclavado e adição de solução de ferro filtrada; (SF15, SF30 e SF45) método de preparo com meio autoclavado e adição de solução ferrosa sem filtrar.

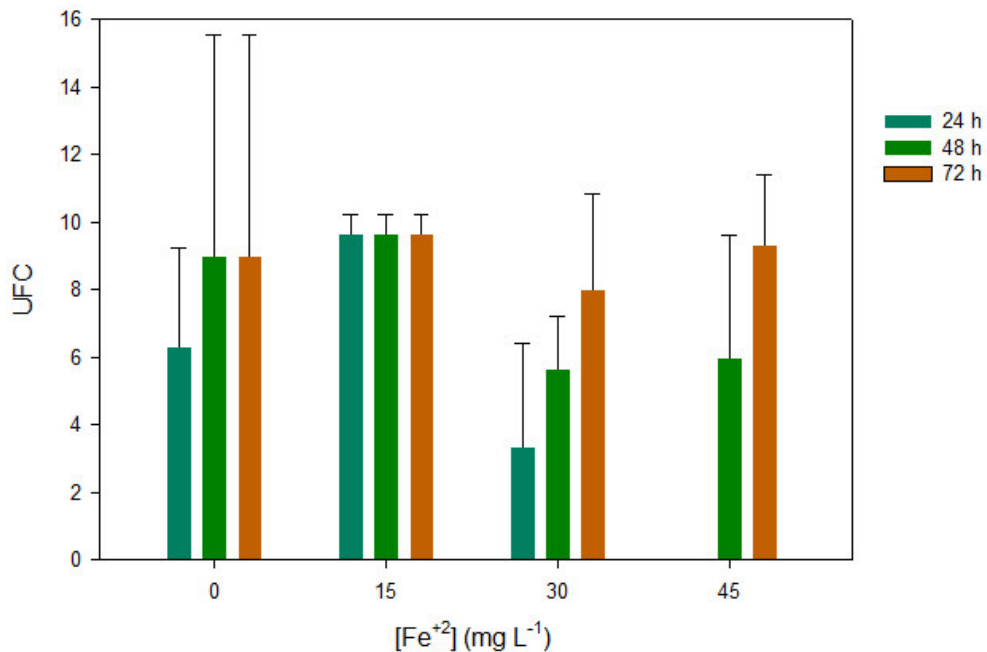


Fonte: Autoria própria

Na concentração de 15 mg L⁻¹ de Fe⁺² o tempo para o crescimento das colônias foi de 24 horas, similar ao observado no meio controle sem adição de ferro, e foi observada mais estabilidade no número de colônias (Figura 8), confirmando que o crescimento celular não é

afetado quando as células são expostas a concentrações iguais a 15 mg L^{-1} de Fe^{+2} na forma de Fe_2SO_4 , conforme reportado por Gaensly (2010).

Figura 8 - Tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* a diferentes concentrações de Fe^{+2} em diferentes tempos de cultivo.



Fonte: Autoria própria

Foi demonstrado durante essa avaliação que a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pode sobreviver a variações da disponibilidade de ferro no meio de cultivo, como reportado por Philpott e Protchenko (2008). No entanto, é necessário que, além da tolerância ao ferro ao meio, este microrganismo também apresente um crescimento celular acentuado para a produção de biomassa celular. Por esse motivo, foi escolhida a concentração de 15 mg L^{-1} de Fe^{+2} empregando o método de preparo de meio autoclavado (3), como a condição mais viável para a realização das etapas posteriores.

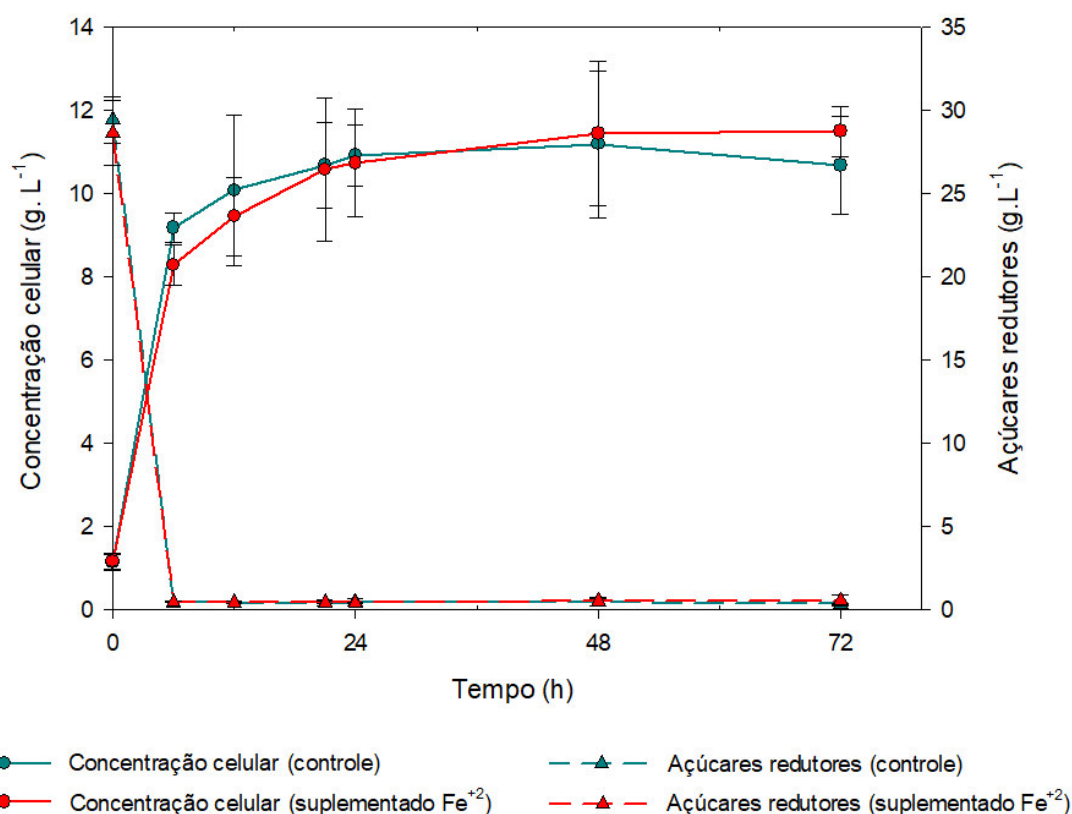
5.2 Cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético enriquecido com ferro

Inicialmente, o processo fermentativo para enriquecimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* com Fe^{+2} foi realizado em meio sintético YPG acrescido de 15 mg L^{-1} de Fe^{+2} (YPG-

Fe⁺²), concentração escolhida de acordo com resultados prévios no teste de tolerância em placas de Petri (item 5.1).

Conforme observado na Figura 9, a levedura apresentou crescimento semelhante em ambas as condições, obtendo após 24 horas 10,91 e 10,74 g L⁻¹ de célula seca em meio YPG e YPG-Fe⁺² respectivamente. Não houve alteração no comportamento de crescimento e consumo de substrato no meio suplementado. Além disso, a viabilidade celular foi mantida ao longo do processo (Tabela 3), a qual confirma a tolerância dessa levedura à concentração de Fe⁺² escolhida.

Figura 9 - Crescimento celular e consumo de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae* em meio YPG e YPG-Fe⁺², contendo 15 mg L⁻¹ de Fe⁺².



Fonte: Autoria própria.

A viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada é uma característica importante, uma vez que indica a porcentagem de células vivas e, com isso, o potencial de utilização dessa biomassa em outros processos biotecnológicos. A utilização das células vivas enriquecidas com ferro pode ser destacada, por exemplo, na produção de

probióticos e na fabricação de alimentos como pão, e alimentos e bebidas fermentados, aumentando o valor nutricional desses produtos.

Os resultados apresentados na Tabela 3 indicam que a levedura continua viável após 72 horas de cultivo em meio YPG-Fe⁺².

Tabela 3 - Viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio sintético YPG-Fe⁺² em função do tempo de cultivo.

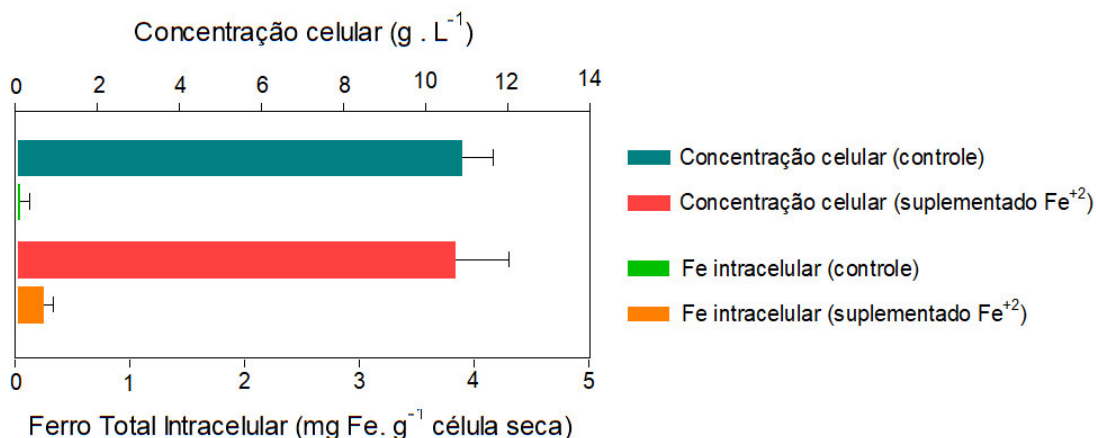
Meios	Tempo de cultivo (horas)			
	0	24	48	72
YPG	95,88% ± 2,86	86,16% ± 4,88	92,73% ± 1,61	95,27% ± 2,92
YPG-Fe ⁺²	95,88% ± 2,86	96,95% ± 2,90	92,71% ± 3,09	97,89% ± 1,83

Fonte: Autoria própria.

O teor de ferro total intracelular foi calculado para a biomassa celular após 24 horas de tempo de cultivo, tempo no qual foi atingido o ponto máximo de crescimento, correspondendo ao início da fase estacionária.

Observou-se que o acúmulo de ferro total na biomassa celular foi duas vezes maior no meio adicionado com Fe⁺², atingindo uma concentração de 0,203 ± 0,25 mg de ferro total intracelular por grama de célula seca (Figura 10).

Figura 10 - Concentração celular e ferro total intracelular em células de *Saccharomyces cerevisiae* após 24 horas de cultivo em meio YPG-Fe⁺².



Fonte: Autoria própria

Entretanto, esses valores correspondem a 10% do teor de ferro total intracelular reportado por Gaensly (2010) após 24 horas de cultivo, usando a mesma concentração de sulfato ferroso no meio cultivo. Apesar de ambos os trabalhos terem sido desenvolvidos com leveduras comerciais de panificação e sob condições fermentativas semelhantes, a variação genética das linhagens empregadas pode ser a principal causa dos diferentes fenótipos encontrados (GARAY *et al.*, 2016).

Conforme reportado por Garay *et al.* (2016) a resposta do fenótipo de crescimento celular na presença de ferro em células de *S. cerevisiae* é variada e dependente da linhagem utilizada. Também é observado que as cepas de padaria empregadas na pesquisa de Garay apresentaram uma taxa de crescimento menor em presença de altos teores de ferro, o que corresponde aos resultados apresentados no item 5.1 sobre a avaliação do crescimento da levedura quando exposta a diferentes concentrações de Fe^{+2} no meio de cultura.

5.3 Teste de adsorção de ferro na parede celular da levedura

A parede e membrana celular das leveduras são usadas na biorremediação como adsorventes de metais, pois os metais interagem com a membrana de acordo com sua polaridade (KORDIALIK-BOGACKA, 2011; TÜRKER, 2014). Para descartar a possibilidade da membrana adsorver o Fe^{+2} e não a célula, ou conseguir diferenciar o Fe^{+2} adsorvido na parede do Fe^{+2} incorporado na célula, foi realizado um teste de adsorção do Fe^{+2} na parede celular da levedura. Neste teste foi observado que, durante a separação da biomassa do meio de cultura, permaneceu uma camada de Fe_2SO_4 na amostra, a qual não foi possível ser retirada por meio de centrifugação.

Ao ser analisada a quantidade ferro total nas células inativadas mantidas em meio adicionado com Fe^{+2} foram detectados 4,5 mg de ferro total por cada grama de célula seca, antes e após o período de incubação, valor equivalente a 30% do Fe^{+2} adicionado ao meio de cultura. Esses resultados podem estar relacionados à precipitação do sal de ferro e à incapacidade de separar o sal da biomassa celular durante o processo de centrifugação. Com isso, é necessária a avaliação de métodos alternativos para a determinação da adsorção de ferro na parede celular da levedura.

5.4 Caracterização dos farelos e hidrolisados de farelos de soja, milho e trigo

Os farelos de soja, milho e trigo foram caracterizados gravimétrica e espectrofotometricamente quanto aos teores de lignina e cinzas; enquanto a celulose e a hemicelulose foram quantificadas por cromatografia líquida de alta eficiência, e cujas concentrações são apresentadas na Tabela 4. O teor de umidade foi de 8,54%, 15,55% e 15,08% para o farelo de soja, milho e trigo respectivamente.

Os materiais lignocelulósicos podem conter teores de celulose, hemicelulose e lignina superiores a 20%, 20% e 10%, respectivamente, e não ocorre a presença de amido (MATHEWS *et al.*, 2015). A hemicelulose é composta principalmente por xilose e arabinose, sendo calculada pela soma desses dois açúcares. Nos três farelos empregados, foi detectada a presença de arabinose, porém apenas nos farelos de soja e de trigo foi detectada xilose. Os teores de hemicelulose similares ao material lignocelulósico podem estar relacionados à etapa de beneficiamento, pois a casca dos grãos pode estar presente na composição dos farelos, justificando a presença de hemicelulose e lignina na composição dos farelos e de seus respectivos hidrolisados (SANTOS *et al.*, 2010; MARCELINO, 2016).

Tabela 4 - Composição (%) de farelos amiláceos.

Farelo	Celulose	Hemicelulose	Lignina insolúvel	Lignina solúvel	Lignina Total	Cinzas	Total
SOJA	11,10	17,26	2,43	10,25	12,68	3,11	44,16
	± 1,12	± 1,01	± 0,41	± 0,37	± 0,46	± 0,00	± 4,02
MILHO	87,55	3,88	1,18	6,66	7,85	3,29	102,57
	± 3,95	± 0,39	± 0,73	± 0,31	± 0,48	± 0,01	± 4,02
TRIGO	31,07	23,13	7,13	15,87	23,00	3,16	80,37
	± 2,11	± 2,24	± 0,54	± 1,19	± 1,14	± 0,00	± 1,54

Fonte: Autoria própria

Devido a sua rica composição em nutrientes, os hidrolisados ácidos de farelos (HAF) apresentam maior liberação de proteínas em comparação com os hidrolisados lignocelulósicos. Essa liberação de açúcares e proteínas contribui para a relação açúcar : proteína e é dependente da composição da biomassa empregada e essa relação favorece o emprego de cada hidrolisado como meio de cultura, de acordo com o tipo de processo biotecnológico.

Por outro lado, de acordo com a Tabela 5, o farelo de milho liberou maior quantidade de açúcares redutores após a etapa de hidrólise ácida. O farelo de milho, contém cerca de 87%

de açúcares, dos quais cerca do 60% é amido, enquanto os farelos de soja e trigo apresentam 11% e 31% respectivamente (ROSTAGNO, 2011; MARTINIANO, 2017).

Após a caracterização, os farelos de soja, milho e trigo foram sometidos à hidrólise ácida para a liberação de açúcares e nutrientes. Posteriormente, os teores de açúcares foram ajustados e os hidrolisados foram filtrados para a separação de partículas sólidas, conforme o item 4.7. Os hidrolisados foram caracterizados em relação ao teor de açúcares, proteínas e minerais, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 - Composição dos hidrolisados ácidos de farelo de soja, milho e trigo utilizados em processo fermentativo.

HIDROLISADO	SOJA		MILHO		TRIGO	
	<i>In Natura</i>	Tratado	<i>In Natura</i>	Tratado	<i>In Natura</i>	Tratado
Açúcares redutores (g L ⁻¹)	13,71 ± 0,15	12,01 ± 0,13	62,33 ± 0,05	9,95 ± 0,01	16,32 ± 0,49	13,13 ± 0,39
Glicose (g L ⁻¹)	2,75	2,41	5,68	1,09	1,39	1,02
Xilose (g L ⁻¹)	1,21	1,06	4,03	0,77	0,10	0,07
Arabinose (g L ⁻¹)	-	-	9,76	1,88	5,76	4,23
Glicerol (g L ⁻¹)	1,71	1,49	0,50	0,09	0,18	0,13
Ácido acético (g L ⁻¹)	-	-	0,22	0,04	0,63	0,13
Proteína (g L ⁻¹)	12,80	11,21	11,53	1,84	15,80	12,72
Fe total (mg L ⁻¹)	9,87 ± 8,95	8,65 ± 7,84	5,13 ± 0,03	0,82 ± 0,14	5,47 ± 0,42	4,40 ± 0,34
Cr total (mg L ⁻¹)	-	-	-	-	-	-
Ca total (mg L ⁻¹)	149,91 ± 56,90	131,31 ± 49,84	18,93 ± 8,89	3,02 ± 1,42	13,85 ± 1,09	11,15 ± 0,88
Mg total (mg L ⁻¹)	486,35 ± 167,41	426,01 ± 146,64	111,97 ± 29,66	17,88 ± 4,73	538,72 ± 16,97	433,61 ± 13,66
Mn total (mg L ⁻¹)	1,18 ± 1,96	1,04 ± 1,72	-	-	12,03 ± 0,37	9,68 ± 0,29
K total (mg L ⁻¹)	4.908,25 ± 1.423,76	4.299,29 ± 1.247,12	463,37 ± 77,96	73,99 ± 12,45	1.794,62 ± 234,58	1.444,48 ± 188,81
Na total (mg L ⁻¹)	10,90 ± 11,63	9,55 ± 10,19	-	-	2.288,6 ± 505,44	1842,08 ± 406,82
Se total (mg L ⁻¹)	0,32 ± 0,11	0,28 ± 0,09	0,050 ± 0,03	0,01 ± 0,00	0,45 ± 0,03	0,36 ± 0,03

- Não detectado

Fonte: Autoria própria.

Destaca-se que o farelo de milho apresentou menor liberação de proteínas que os farelos de soja e trigo, sendo o hidrolisado ácido de soja (HAFS) aquele hidrolisado com maior quantidade de nitrogênio orgânico, com teor de 18,13 g L⁻¹ de proteína, seguido pelo hidrolisado de farelo de trigo (HAFT), com 15,25%. Uma tendência similar foi obtida por Martiniano (2017), com teor de proteína 57% maior do farelo de soja em relação ao farelo de milho.

Realizou-se também análise por ICP-OES do teor de ferro total e de outros minerais importantes no metabolismo celular que participam de reações metabólicas como cofatores enzimáticos ou no transporte de elétrons. Conforme relatado por Rostagno (2011), o farelo de soja é uma fonte rica de aminoácidos. Além disso, hidrolisado ácido de soja apresentou os maiores teores de proteína e os minerais analisados, sendo igual a 75%, em comparação com os hidrolisados de farelo de milho e trigo. Por outro lado, os teores mais elevados de sódio e selênio foram apresentados nos hidrolisados de farelo de trigo e de milho, respectivamente (Tabela 5).

A composição dos hidrolisados pode ser determinante para o processo fermentativo e o crescimento celular. O hidrolisado ácido de farelo de milho (HAFM) apresenta baixa quantidade de minerais, quando comparado com HAFS e HAFT, mas é rico em açúcares, o que favorece a fonte de carbono nesse meio, no entanto, grande parte desse açúcar está em forma de amido, além de apresentar o menor teor de proteínas, que podem ser usadas como fonte de nitrogênio pelos microrganismos. Em alternativa, o farelo de soja é rico em proteínas e minerais, porém seu teor de açúcares é menor, atingindo uma relação carboidrato:proteína (C:N), 1:1 no HAFS tratado, semelhante ao HAFT, o que favorece o crescimento celular ao fornecer fontes de nutrientes suficientes para o metabolismo.

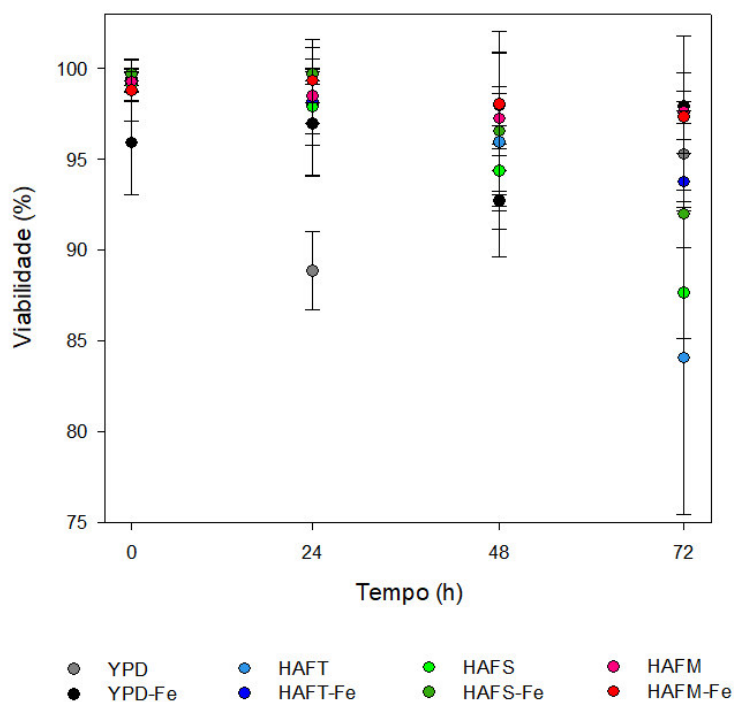
5.5 Avaliação do uso dos hidrolisados na produção de biomassa de levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ferro.

5.5.1 Viabilidade celular durante o cultivo

Após a avaliação da produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro em meio de cultura sintético (item 5.2), foram realizados cultivos empregando os HAF obtidos. Durante estes processos foram avaliados a viabilidade celular, crescimento celular, consumo de açúcar, e o teor de ferro total intracelular na biomassa da levedura produzida a partir dos HAF.

Favoravelmente, a levedura foi capaz de crescer nos três HAF empregados. Foi observado que a viabilidade celular foi mantida acima do 80% (células vivas) ao longo do processo, porém foi diminuindo depois das 24 horas, sendo que os cultivos em HAF mantiveram mais 95% de viabilidade durante as primeiras 24 horas e apresentaram maior estabilidade quando comparados com o meio sintético (Figura 11). Porém, depois de 72 horas os cultivos em HAFS e HAFT caíram a valores menores a 90%, enquanto seus cultivos enriquecidos (HAFS-Fe e HAFT-Fe) apresentaram viabilidade levemente maior, sugerindo que a suplementação de Fe^{+2} poderia contribuir em alguns casos à manutenção da viabilidade celular da levedura. Contudo, os resultados indicam que para obter levedura enriquecida com ferro que possa ser utilizada em processos posteriores, o cultivo deve permanecer por um tempo próximo as 24 horas para garantir a viabilidade das células.

Figura 11 - Viabilidade celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* nos diferentes meios testados durante 72 horas de cultivo.



Fonte: Autoria própria.

5.5.2 Crescimento celular e incorporação de ferro

O comportamento de crescimento foi similar ao observado no cultivo com meio sintético, atingindo o ponto máximo de concentração de biomassa perto das 24 horas de cultivo, no entanto, a concentração de biomassa produzida, consumo de açúcar e incorporação de Fe^{+2} foram diferenciados em cada hidrolisado, como mostrado na Figura 12. Por exemplo, foi observado que a concentração celular após 24 horas de cultivo foi de 7,89, 3,20 e 4,62 g L^{-1} de célula seca para HAFS, HAFM e HAFT, respectivamente. Esses resultados revelam que a composição de cada HAF exerce influência na produção de biomassa celular.

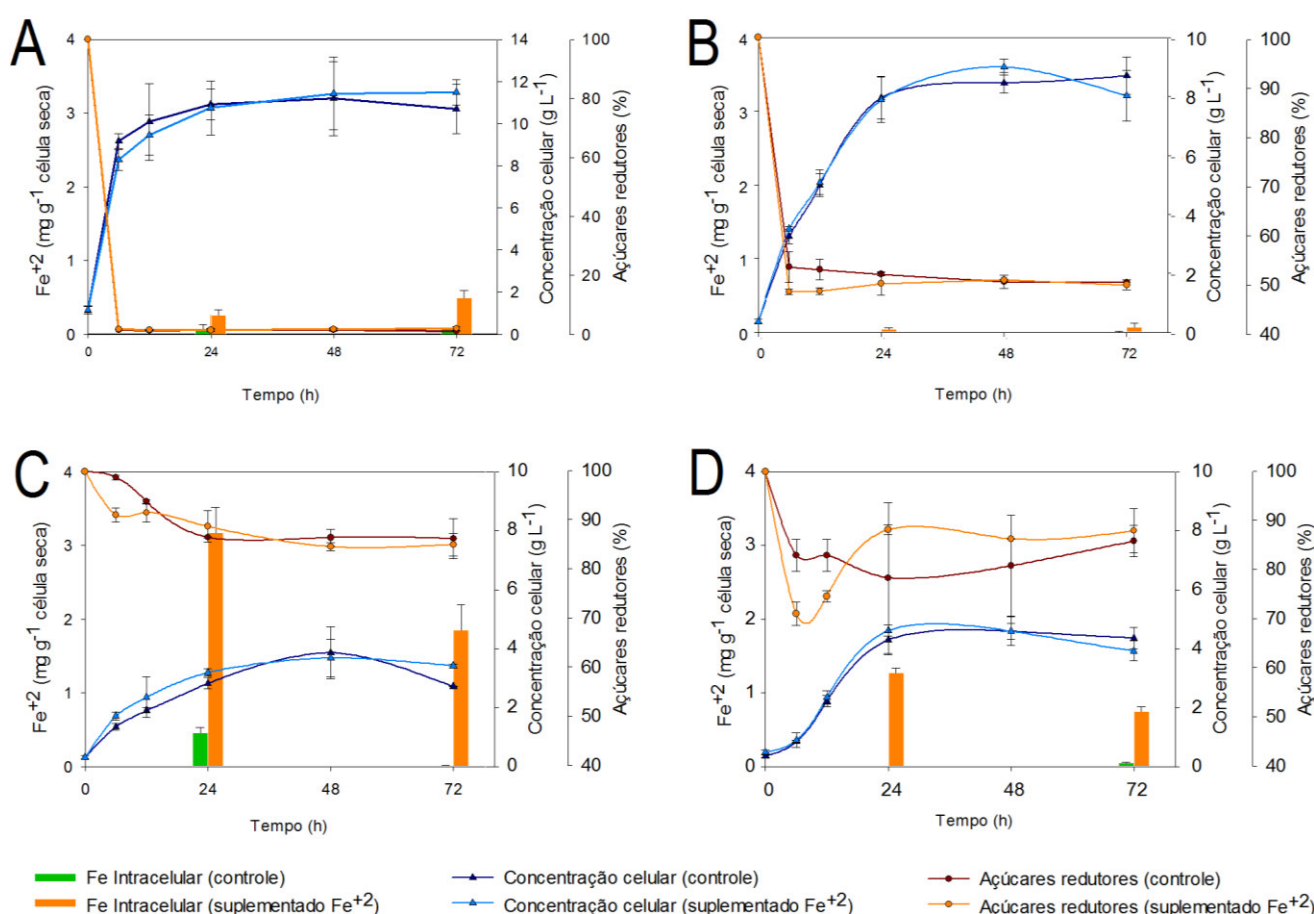
Além disso, as concentrações de ferro total intracelular no mesmo tempo de cultivo foram de 0,04, 3,18 e 1,27 mg de ferro total por grama de célula seca para a biomassa produzida a partir de HAFS, HAFM e HAFT, acrescidos de Fe^{+2} , respectivamente e decresceram ao final do processo.

A maior produção de biomassa ($7,95 \pm 0,77 \text{ g L}^{-1}$) ocorreu com o HAFS (Figura 12B), apresentando 51,83% de consumo dos açúcares redutores presentes. A alta produção de biomassa no HAFS pode estar relacionada ao maior teor de nutrientes, minerais, e a relação carboidratos : proteínas na sua composição (Tabela 5), o que faz este um meio de cultura viável para a produção de biomassa de levedura, de baixo custo e alta disponibilidade na indústria. Porém, no caso da produção de biomassa enriquecida com ferro, ressalta-se o baixo teor de ferro intracelular obtido a partir de HAFS. Apesar de o HAFS possuir o maior teor natural de ferro ($12,72 \text{ mg L}^{-1}$), não foi possível o enriquecimento celular com o mineral, uma vez que os teores de ferro intracelular obtidos foram semelhantes aos atingidos com meio sintético sem adição de ferro (0,04 e 0,05 mg Fe total por grama célula respectivamente). Esses resultados sugerem que provavelmente, os minerais disponíveis foram empregados pela célula apenas para a produção de biomassa. Além disso, é possível que algum componente presente no HAFS esteja atuando como quelante, reagindo com o Fe^{+2} e inibindo a incorporação do metal pela célula o que torna o HAFS um meio inviável para a produção de levedura enriquecida com ferro, nas condições estudadas na presente pesquisa.

Segundo Lönnerdal (2009), os vegetais possuem na sua composição inibidores da absorção de ferro em humanos, entre esses inibidores estão os fitatos, a fibra e o cálcio. O HAFS possui elevados teores de cálcio na sua composição ($147,69 \text{ mg L}^{-1}$) (Tabela 5), o que poderia explicar o baixo teor de ferro assimilado pela levedura. Com isto, seria importante avaliar em futuras pesquisas se os componentes mencionados, em particular o cálcio, estão inibindo a assimilação celular de ferro na levedura empregada.

No caso do HAFM e HAFT, a produção de biomassa foi 65% e 42%, respectivamente inferior, que a produção a partir de HAFS. A levedura necessita de fontes de nitrogênio para a formação de proteínas e crescimento celular, porém o HAFM possui a menor concentração de proteínas ($1,84 \text{ g L}^{-1}$) o que altera a relação carboidrato : proteína e pode estar afetando negativamente o crescimento celular. No entanto, a biomassa produzida a partir de HAFM apresentou os teores mais elevados de ferro total intracelular no presente estudo.

Figura 12 - Crescimento celular, consumo de açúcares e ferro intracelular em *Saccharomyces cerevisiae* em YPG (A), HAFS (B), HAFM (C) e HAFM (D).



Fonte: Autoria própria.

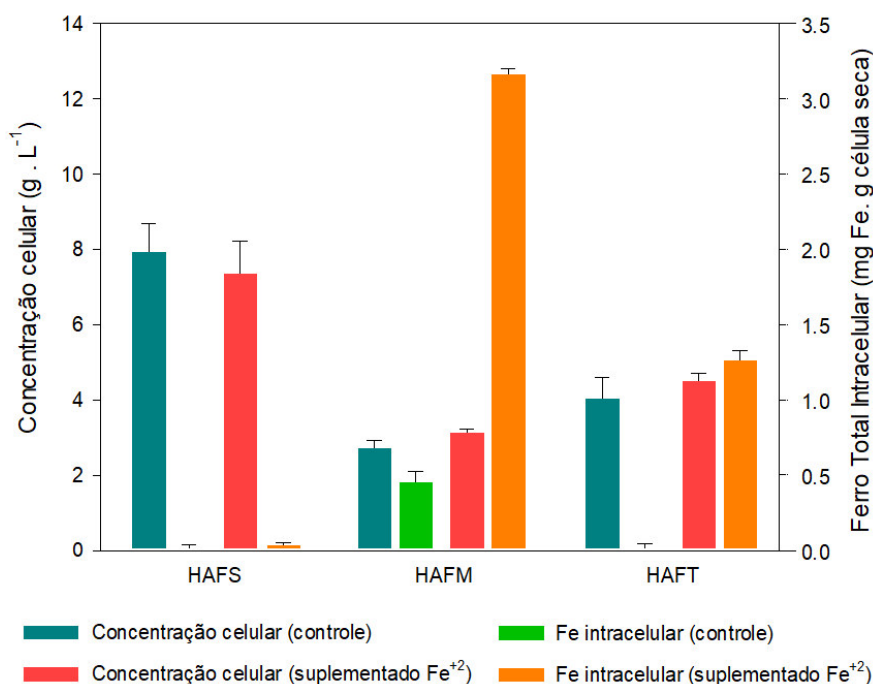
A maior concentração intracelular de ferro ocorreu na biomassa produzida a partir de HAFM-Fe ($3,17 \text{ mg Fe g}^{-1}$ célula seca). Além disso, a incorporação do mineral empregando esse hidrolisado foi eficiente já que o teor de ferro intracelular da biomassa gerada a partir do HAFM sem adição de Fe⁺² ($0,46 \text{ mg Fe/ g célula seca}$) foi maior ao teor de ferro obtido usando meio sintético suplementado com ferro ($0,25 \text{ mg Fe total g}^{-1}$ célula seca). Dessa forma, o HAFM

poderia ser empregado como meio de cultura sem necessidade de suplementação de Fe^{+2} e ainda assim obter resultados similares de enriquecimento de ferro e provavelmente de outros minerais.

Por outro lado, a concentração celular atingida nos cultivos realizados em HAFT foi de $4,45 \text{ g L}^{-1}$ de célula seca, superando a produção de biomassa a partir do HAFM; porém, ainda baixa em comparação ao HAFS e o meio sintético. O HAFT obteve valores intermediários de biomassa e uma boa incorporação de ferro intracelular ($1,27 \text{ mg Fe} \cdot \text{g}^{-1}$ célula seca) em comparação com seu controle e o meio sintético.

De acordo com os resultados de incorporação de ferro na presente pesquisa, resulta importante ressaltar que tem sido reportado que o acúmulo de ferro apresenta uma tendência inversa ao aumento da biomassa celular em meio sintético, uma vez que quanto mais ferro é incorporado, menor é o crescimento celular, reciprocamente (GAENSLY, 2010; MARTÍNEZ-GARAY *et al.*, 2016). Essa tendência pode ser observada na Figura 13, onde o maior teor de ferro total intracelular e menor produção de biomassa foi apresentado no cultivo com HAFM e HAFT, caso contrário do cultivo em HAFS, no qual a maior produção de biomassa foi atingida, embora tenha apresentado o menor teor de ferro intracelular.

Figura 13 - Comparação entre a concentração celular e o ferro total intracelular da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em meios elaborados com HAFS, HAFM e HAFT após 24 horas de cultivo.



Fonte: Autoria própria.

Esse resulta um fenômeno importante a ser levado em consideração durante a produção de biomassa enriquecida com ferro, já que deve ser estabelecido se o objetivo do processo é a geração de biomassa ou a incorporação de ferro, desde que tem sido reportado que são excludentes uma da outra e conseguir a partir disso, otimizar o processo.

Uma tentativa para diminuir a relação biomassa : ferro intracelular pode ser realizada mediante o aumento na concentração de Fe^{+2} do HAFS para diminuir o efeito dos inibidores presentes no hidrolisado e permitir uma maior incorporação de ferro intracelular. No caso do HAFM, este poderia ser suplementado com fontes de nitrogênio complexas, como a peptona, para balancear a relação carboidrato : proteína e contribuir para a formação de biomassa.

5.5.3 Consumo de substrato durante o cultivo

Os hidrolisados empregados possuem teores e proporções diferentes de açúcares redutores e monoméricos em sua composição, o que gera diferentes comportamentos e tendências de consumo do substrato empregando o mesmo microrganismo. No caso da levedura de panificação empregada, observamos que nas primeiras 6 a 12 horas, é consumida a maior parte dos açúcares redutores e depois das 24 horas, o consumo se estaciona.

Quando é empregado meio sintético como substrato, é consumido praticamente em sua totalidade. No entanto, quando empregados os HAF é consumido de 10 (HAFM e HAFT) a 50% (HAFS) dos açúcares redutores disponíveis. Esse fato permite fazer variações ao processo como a suplementação dos hidrolisados ao início do cultivo (fonte de carbono ou nitrogênio) adição de pulsos de substrato ou fed batch em tempos específicos, e a reutilização do meio de cultivo para processos posteriores já que ainda conserva a maioria do substrato. Essas variações permitem o máximo aproveitamento dos recursos disponíveis e integrar o processo ao conceito de biorefinarias, contribuindo à sustentabilidade do processo (BELTRÁN-RAMÍREZ *et al.*, 2019).

Por outro lado, outro fator importante a ser considerado é o teor de amido presente nos hidrolisados. O amido desenvolve um processo irreversível de gelatinização em meio aquoso (VARNADEVAN ; BERTOFT, 2014). Devido a isso, observou-se um aspecto gelatinoso nas amostras de sobrenadante com quantidades relacionadas ao teor de amido teórico de cada farelo (Tabela 2), presente em maior quantidade nas amostras do HAFT já que esse hidrolisado possui a maior concentração teórica de amido devido à composição química do farelo de trigo. Nessas condições, os açúcares presentes no meio em forma de amido não são

disponíveis para o metabolismo celular da levedura. Com isso, durante as análises de açúcares foram retiradas alíquotas do sobrenadante, descartando o gel. No entanto, a presença do gel dificultou a dosagem, principalmente das amostras provenientes do HAFT e pode ser o principal motivo da variação entre medições de consumo de açúcar para este hidrolisado.

Uma alternativa para aumentar o aproveitamento dos monômeros do amido e diminuir a interferência da presença do gel, seria a liberação da glicose presente na matriz amilácea mediante o uso de enzimas específicas (amilases), o qual poderia melhorar a produção de biomassa celular, porém acrescentaria uma etapa ao processo e aumentaria os custos de produção.

Neste contexto, não foi observada uma tendência clara de consumo de açúcares monoméricos, pois foram detectadas concentrações variáveis ao longo das 72 horas. A baixa taxa de consumo de açúcares pode ser devido ao alto conteúdo de amido, dissacarídeos e oligossacarídeos ainda presentes. Entretanto, é observado redução da concentração de glicose e de açúcares redutores no caso do HAFT em 6 horas de fermentação, para, posteriormente, sofrer um aumento em torno de 24 horas (Tabela 6).

Tabela 6 - Concentração de glicose e etanol em g L^{-1} em função do tempo de cultivo em hidrolisado ácido de farelo de soja, milho e trigo, com e sem adição de ferro

Hidrolisado			Tempo (horas)				
			0	6	24	48	72
Farelo de Soja	HAFS	Glicose	1,31 ± 1,54	2,02 ± 0,32	4,14 ± 1,76	6,63 ± 1,08	3,7 ± 3,2
		Etanol	-	2,25 ± 0,79	2,99 ± 1,22	1,01 ± 0,24	0,09 ± 0,09
	HAFS-Fe ⁺²	Glicose	1,31 ± 1,54	2,30 ± 0,32	6,48 ± 0,63	1,12 ± 0,01	2,15 ± 2,57
		Etanol	-	2,79 ± 0,51	3,62 ± 0,21	1,54 ± 0,32	0,25 ± 0,62
Farelo de milho	HAFM	Glicose	1,09 ± 0,70	0,06 ± 0,10	0,10 ± 0,33	0,10 ± 0,02	0,15 ± 0,02
		Etanol	-	0,83 ± 0,66	0,39 ± 0,36	0,04 ± 0,09	0,59 ± 0,78
	HAFM-Fe ⁺²	Glicose	1,09 ± 0,70	0,45 ± 0,03	0,46 ± 0,02	0,17 ± 0,12	0,17 ± 0,09
		Etanol	-	0,605 ± 1,46	-	-	-
Farelo de trigo	HAFT	Glicose	1,69 ± 0,52	-	0,63 ± 0,07	0,72 ± 0,10	0,36 ± 0,31
		Etanol	-	0,52 ± 0,16	-	-	-
	HAFT-Fe ⁺²	Glicose	1,69 ± 0,52	-	0,07 ± 0,13	0,71 ± 0,07	-
		Etanol	-	0,60 ± 0,22	-	-	-

- Não detectado

Fonte: Autoria própria

Comportamento contrário ao apresentado no HAFS onde o teor de glicose incrementa durante as primeiras horas de cultivo para posteriormente diminuir ao final do processo. Além disso, as variações no teor de açúcares ao longo do processo fermentativo poderiam estar

relacionadas à composição dos hidrolisados e à ruptura desses açúcares por parte da levedura para seu posterior consumo ou interferências causadas pelo gel de amido.

Também foi observada a produção de etanol nos três hidrolisados empregados em 6 horas de cultivo com até 2,79 g L⁻¹ (HAFS-Fe), e seu posterior consumo parcial ou total pela levedura (Tabela 6). Isso pode ser devido a que a célula começa a consumir fontes alternativas de carbono disponíveis como o etanol e outros compostos presentes no meio (provenientes do meio ou do próprio metabolismo da levedura), quando a glicose é consumida e está disponível em baixas concentrações.

5.5.4 Rendimento da produção de biomassa de levedura enriquecida

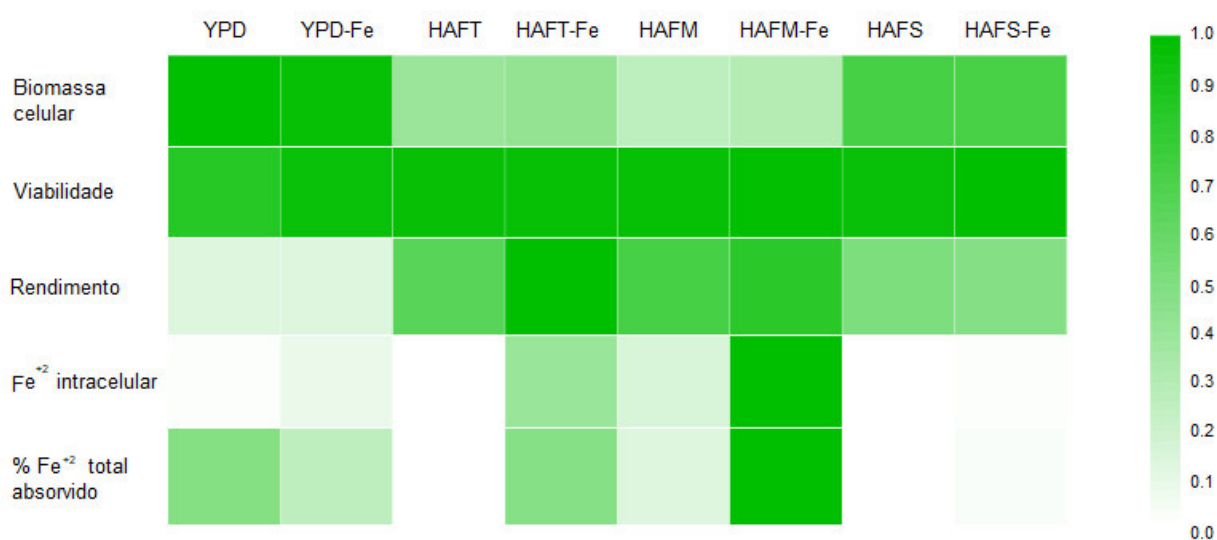
Uma das respostas importantes durante um processo biotecnológico é o rendimento. No presente estudo foi calculado o rendimento da produção de biomassa em relação com o substrato consumido, neste caso, os açúcares redutores, com a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento} = \frac{\Delta \text{ biomassa (g)}}{\Delta \text{ substrato (g)}}$$

Interessantemente, o rendimento na produção de biomassa enriquecida com ferro a partir dos HAF foi de 3,64 a 7,66 vezes maior que o rendimento do cultivo em meio sintético (0,33 g biomassa celular/ g substrato consumido), o que confirma que a rica composição em nutrientes dos hidrolisados empregados favorecem a produção de biomassa.

Considerando que na maioria dos cultivos o ponto máximo de produção de biomassa, viabilidade e incorporação de ferro foi atingido as 24 horas de cultivo, foi realizado um gráfico de temperatura (*heat map*) que mostra o conjunto destas respostas e o rendimento, para uma visualização mais simples dos mesmos nesse tempo (Figura 14). O gráfico de temperatura mostra as diferentes respostas com diferente intensidade (temperatura) de cor, sendo os tons escuros os valores mais altos atingidos e os tons claros, as respostas pouco favoráveis durante o processo, todas sendo expressas com base 1. De modo que o meio empregado que apresente maioria de tons claros será menos favorável para a produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro, e o que apresente maioria de tons escuros será o que obteve resultados mais favoráveis em comparação com o resto.

Figura 14 - Gráfico de temperatura de comparação da produção de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e incorporação de ferro em HAFS, HAFM e HAFT após 24 horas de cultivo.



Fonte: A autoria própria

A Figura 14 mostra visualmente a estabilidade da viabilidade celular (tons similares de cor) de todos os cultivos em 24 horas. Na primeira linha é mostrada a variação da produção de biomassa e como complementação a esses dados, a terceira linha mostra a variação no rendimento da produção da biomassa. Esses resultados indicam que apesar dos cultivos em HAFS e YPG ter produzido a maior concentração de biomassa, seus rendimentos foram os menores, atingindo as menores concentrações de biomassa produzida por grama de substrato consumido, especialmente no meio suplementado com ferro. No entanto, os cultivos a partir de HAF (sem suplementação de Fe^{+2}) atingiram rendimentos similares sendo de $1,32 (\pm 0,14)$, $1,88 (\pm 0,47)$ e $1,68 (\pm 0,49)$ g célula/g substrato consumido para HAFS, HASM e HASFT respectivamente. Porém, nos HAF suplementados com Fe^{+2} o rendimento foi maior empregando HAFT e HAFM, $2,58 (\pm 0,68)$ e $2,16 (\pm 0,05)$ respectivamente.

Além disso, considerando que os meios de cultivo empregados possuem diferentes teores de ferro naturalmente, o gráfico mostra na última linha, a porcentagem de ferro incorporado à biomassa produzida do total de ferro disponível no meio de cultivo considerando o ferro presente naturalmente e o ferro agregado. Neste quesito, foi o HAFM-Fe o meio que mais contribuiu à incorporação de ferro na biomassa celular, incorporando $64,19 \%$ do ferro disponível, o equivalente a $10,15 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe, dos $15,82 \text{ mg L}^{-1}$ de Fe^{+2} disponíveis no meio.

Neste contexto, os meios que favoreceram a produção de biomassa de levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com ferro foi o HAFM-Fe, apresentando maior incorporação de ferro intracelular, porém menor concentração celular, e o HAFT-Fe, apresentando rendimento e produção de biomassa ligeiramente maiores, porém, menor teor de ferro intracelular.

Essa primeira aproximação permite aclarar o panorama do emprego dessas biomassas amiláceas como substrato na produção de biomassa enriquecida com ferro e as perspectivas de pesquisas posteriores. Diversas estratégias podem ser avaliadas em projetos futuros para a otimização do processo proposto no presente trabalho, por exemplo, favorecer a produção de biomassa celular.

Com base nos principais resultados da pesquisa, destacou-se que os HAFM e HAFT foram favoráveis para a incorporação de ferro na célula, enquanto o HAFS favoreceu o crescimento celular sem incorporação de ferro.

6 CONCLUSÕES

A levedura de panificação *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no presente trabalho foi capaz de crescer na presença de ferro no meio de cultivo e apresenta tolerância a concentrações de Fe^{+2} que variam de 15 a 45 mg L^{-1} , sendo que 15 mg L^{-1} possibilitou o melhor crescimento celular.

Os hidrolisados ácidos de material amiláceos são meios de cultivo alternativos para a produção de biomassa enriquecida com ferro, já que sua composição é rica em nutrientes como açúcares, proteínas e minerais. Esse fato permitiu o emprego desses hidrolisados sem suplementação com fontes de carbono ou nitrogênio, nem sais minerais. O hidrolisado ácido de farelo de soja (HFAS) apresentou composição rica em proteínas e nutrientes, o que favoreceu a produção de biomassa ao ser utilizado como meio de cultivo, porém seu emprego não apresentou incorporação de ferro pela levedura. Por outro lado, o hidrolisado ácido de farelo de milho (HAFM) favoreceu a incorporação de ferro pelas células, atingindo 3,18 mg de ferro total intracelular por grama de célula seca, porém houve baixo crescimento celular. Da mesma forma, o hidrolisado ácido de farelo de trigo (HAFT) permitiu a incorporação de ferro intracelular. Foram obtidos valores intermediários de biomassa (4,45 g L^{-1} de célula seca) e uma boa incorporação de ferro intracelular (1,27 mg de ferro total por grama de célula seca).

O emprego de HAFM e HAFT favoreceu a incorporação de ferro intracelular na biomassa de levedura e mostrou rendimento similar na produção de biomassa, o que faz deles uma alternativa interessante para a produção de biomassa de levedura enriquecida com ferro.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Estudar do processo fermentativo em batelada e batelada alimentada, utilizando hidrolisados amiláceos, em biorreator;
- Estudar a suplementação dos HAF com fontes de carbono ou nitrogênio (complexas ou mistura de HAF com composições complementares);
- Caracterizar das propriedades nutricionais da biomassa de levedura enriquecida com ferro (proteínas, minerais, glucana, etc.);
- Realizar ensaios de digestibilidade e biodisponibilidade *in vitro* ou *in vivo* da biomassa de levedura enriquecida com ferro a partir do processo;
- Realizar ensaios de aplicação da biomassa de levedura enriquecida com ferro em processos biotecnológicos para a fabricação de alimentos (ex. panificação);
- Estudar a viabilidade e características da biomassa de levedura após liofilização e encapsulamento.

REFERÊNCIAS

- A LEVEL Biology. **Polysaccharides**. 2020. Disponível em: <https://alevelbiology.co.uk/notes/polysaccharides/> Acesso em: 13 ago. 2020.
- ABBASPOUR, N; HURRELL, R; KELISHADI, R. Review on iron and its importance for human health. **Journal of Research in Medical Sciences**, v. 19, n.2, 2014.
- ADEL, A.M. *et al.* Characterization of microcrystalline cellulose prepared from lignocellulosic materials. Part I. Acid catalyzed hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 101, n.12, p. 4446 – 4455, 2010.
- AGROPECUARIA. **Composición Química de Alimentos – TD Software**. 2019. Disponível em: <https://www.agropecuaria.inf.br/composicao-quimica-de-alimentos/visualizar> Acesso em: 20 out. 2019.
- AGEITEC (AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA). **Fermentação**. 2012. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s4737dnfr3b.html Acesso em: 19 out. 2019.
- AGGETT, P.J.; IRON, I.N.; ERDMAN, J.W.; MACDONALD, I.A.; ZEISEL, S.H.E.D.S. **Present Knowledge in Nutrition**. 10th ed. Washington, DC: Wiley-Blackwell, 2012, p. 506-520.
- AHMADI, R.; ZIAEI, S.; PARSAY, S. Association between Nutritional Status with Spontaneous Abortion. **International journal of fertility & sterility**. v. 10, n.4, p. 337–342, 2017.
- ANAND, I.S.; PANKAJ, G. Anemia and Iron Deficiency in Heart Failure. **Circulation**, v. 138, n.1, p. 80 – 98, 2018.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**. 2005.
- ATKINS, P.; OVERTON T; ROURKE J; WELLER M; AMSTRONG F; HAGERMAN M. **Shriver and Atkins' Inorganic Chemistry**. 5th edition. New York: W. H. Freeman and Company, 2010, p.851.
- AYOO, C.; BONTI-ANKOMAH, S. Economic Impacts of Value Addition to Agricultural Byproducts. **Byproducts from Agriculture and Fisheries: Adding Value for Food, Feed, Pharma, and Fuels**, p. 685-698, 2019.
- BAKER, R.D.; GREER, F.R. Diagnosis and prevention of iron deficiency and iron-deficiency anemia in infants and young children (0-3 years of age). **Pediatrics**, v 126, p. 1040-1050, 2010.
- BELTRÁN-RAMÍREZ, F.; ORONA-TAMAYO, D.; CORNEJO-CORONA, I.; GONZÁLEZ-CERVANTES, J. L. N.; DE JESÚS ESPARZA-CLAUDIO, J.; QUINTANA-RODRÍGUEZ, E. Agro-Industrial waste revalorization: The growing biorefinery. In: **Biomass for Bioenergy-Recent Trends and Future Challenges**. IntechOpen, 2019.
- BLACK, M.M.; QUIGG, A.M.; HURLEY, K.M.; PEPPER, M.R. Iron deficiency and iron-deficiency anemia in the first two years of life: strategies to prevent loss of developmental potential. **Nutr Rev**, v. 69, p. 64-70, 2011.
- BODEK, I.; LYMAN, W. J.; REEHL, W. F.; ROSENBLATT, D.H. Environmental Inorganic Chemistry: Properties, Processes, and Estimation Methods. SETAC Special Publication Series, B.T. **Walton and R.A. Conway, editors**. Pergamon Press. New York. 1988.
- BONNAR, J. Anaemia in obstetrics: an evaluation of treatment by iron-dextran infusion. **Brit. Med. J.**, v. 2, p. 1030-1033, 1965.

CABLE, R.G.; GLYNN, S.S.; KISS, J.E.; MAST, A.E.; STEELE, W.R.; MURPHY, E.L.; WRIGHT, D.J.; SACHER, R.A.; GOTTSCHALL, J.L.; VIJ, V.; SIMON, T.L. NHLBI RETROVIRUS EPIDEMIOLOGY DONOR STUDY-II. Iron deficiency in blood donors: analysis of enrollment data from the REDS-II Donor Iron Status Evaluation (RISE) study. **Transfusion**, v. 51, n.3, p. 511-522, 2011.

CACHUMBA, J.J.M.; HILARES, R.T.; MARCELINO, P.R.; ANTUNES, F.A.F.; DA SILVA, S.S. Extracellular L-asparaginase production in solid-state fermentation by using sugarcane bagasse as support material. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 1, p. 1-6, 2019.

CÂNDIDO, J. **Farinhas. Sabor & Saúde**. 2014. Disponível em: <https://pt.slideshare.net/luizarthurmribeiro/farinhas> Acesso em: 20 out. 2019.

CLARK, S.F. Iron Deficiency Anemia. **Nutr Clin Pract**, v. 23, p. 128-141, 2008.

CLÉNIN, G.; CORDES, M.; HUBER, A.; SCHUMACHER, Y.O.; NOACK, P.; SCALES, J.; KRIEMLER, S. Iron deficiency in sports – definition, influence on performance and therapy. **Swiss Med Wkly**, v. 145, p. 43-44, 2015.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v.4 – Safra 2016 -2017 – Oitavo Levantamento, Brasília, p. 1 – 144, 2017b.

CONAB (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO). **Safra Brasileira de Grãos - Tabela de Levantamento 10/10/19**. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos> Acesso em: 20 de out. 2019.

CONAB. **11º Levantamento - Safra 2019/20**. 2020. Disponível em: <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos> Acesso em: 12 ago. 2020.

CRAIG, W.J. Iron status of vegetarians. **Am J Clin Nutr**, v. 59, n.5, p. 1233 – 1237, 1994.

DOMELLÖF, M. Iron requirements in infancy. **Ann Nutr Metab**, v. 59, p. 59-63, 2011.

DUSSÁN, K.J., JUSTO, O.R., PEREZ, V.H., DAVID, G.F., JUNIOR, E.G.S., DA SILVA, S.S. Bioethanol Production From Sugarcane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate by Immobilized *S. shehatae* in a Fluidized Bed Fermenter Under Magnetic Field. **BioEnergy Research**, v. 12, p. 338-346, 2019.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA) - Centro Nacional de Pesquisa de Suínos e Aves. **Tabela de Composição Química e Valores Energéticos de Alimentos para Suínos e Aves**. 1983.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). **Processamento**. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000gc8yuuj302wx5ok01dx9lcx1g7v3u.html Acesso em: 15 abr. 2020.

EMBRAPA (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA). Composição bromatológica e valor de energia bruta expressos em matéria natural da torta de girassol. 2020. Disponível em: https://www.embrapa.br/documents/1355202/1529289/01+-+Tema+3+-+Qualidade+da+torta+de+girassol_formula%C3%A7%C3%A3o+e+uso+-+Leandro+das+Dores+Ferreira+da+Silva.pdf/05ba2cee-44bc-5807-e60d-9854673f99aa Acesso em: 20 set. 2020.

EPM-UNIFESP. Farelo de trigo, cru. 2020. Disponível em: <http://tabnut.dis.epm.br/alimento/20077/farelo-de-trigo-cru> Acesso em: 12 set. 2020.

EZEQUIEL, J.M.B. Desempenho de novilhos nelore alimentados com casca de soja ou farelo de germen de milho em substituição parcial ao milho moído. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 35, n. 2, p. 569 – 575, 2006.

FANTINI, A.P.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; SOUZA, M.C.; MANSI, D.N. Disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.2, p. 435 – 439, 2008.

FERREIRA, I.M.P.L.V.O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J.G. Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 77-84, 2010.

FOOD and drug administration - FDA. **What's On the nutrition facts label**. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/scripts/InteractiveNutritionFactsLabel/factsheets/Whats_On_The_Nutrition_Facts_Label.pdf Acesso em: 28 ago. 2019.

FRUZIŃSKA, R. Accumulation of iron in the soil-plant system in a metal industry area. **Civil and Environmental Engineering Reports**, p. 59–68, 2011.

GAENSLY, F. **Incorporação de ferro pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* e sua influência na formação de biomassa e na capacidade fermentativa**. 2010. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GAENSLY, F.; BRAND, G.W.D; BONFIM, T.M. Iron enriched *Saccharomyces cerevisiae* maintains its fermentative power and bakery properties. **Food Sci Technol Int**, v. 31, p. 980–983, 2011.

GASCHE, C.; LOMER, M.C.E.; CAVILL, I.; WEISS, G. Iron, anaemia, and inflammatory bowel diseases. **Gut**, v. 53, n.8, p. 1190 – 1197, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical journal**, v. 219, n.1, p. 1, 1984.

HARE, D.; AYTON, S.; BUSH, A.; LEI, P. A delicate balance: Iron metabolism and diseases of the brain. **Front Aging Neurosci**, v. 5, 2013.

HENDRIKS, A.T.W.M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v.100, n.1, p. 10–18, 2009.

HERSMAN, L. E.; HUANG, A.; MAURICE, P. A.; FORSYTHE, J. H. Siderophore production and iron reduction by *Pseudomonas mendocina* in response to iron deprivation. **Geomicrobiology Journal**, v. 17, n.4, p. 261 – 273, 2000.

HUNT, J.R. Bioavailability of iron, zinc, and other trace minerals from vegetarian diets. **Am J Clin Nutr**, v.78, n.3, p. 633 – 639, 2003.

INSTITUTE OF MEDICINE (US) - COMMITTEE ON NUTRITIONAL STATUS DURING PREGNANCY AND LACTATION. **Nutrition During Lactation**, Washington (DC): National Academies Press, 2019. Chapter 9: Meeting Maternal Nutrient Needs During Lactation.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc: A Report of the Panel on Micronutrients. **Food and Nutrition Board**. Washington, DC: National Academy Press, 2001.

IRON DISORDERS INSTITUTE. **Iron disorders**. Disponível em: <http://www.irondisorders.org/iron-deficiency-anemia>. Acesso em: 23 set. 2019.

IRON DISORDERS INSTITUTE. **Iron overload**. Disponível em: <http://www.irondisorders.org/iron-overload>. Acesso em: 05 out. 2019.

JACH, M.E.; SEREFKO, A.; SAJNAGA, E., KOZAK, E. Dietary supplements based on the yeast biomass. **Current Topics in Nutraceutical Research**, v. 13, n.2, p. 83 – 88, 2015.

JOHNSON, E.A.; ECHAVARRI-ERASUN, C. The Yeasts - **Yeast Biotechnology**, v. 1, p.21 – 44, 2011.

KOCYIGIT, D.; GÜRSES, K.M. Iron deficiency and its treatment in heart failure: indications and effect on prognosis. **E-Journal of Cardiology Practice**, v. 14, n.30, 2016.

- KOMINIAREK, M.A. Nutrition Recommendations in Pregnancy and Lactation. **Med Clin North Am**, v. 100, n.6, p. 1199 – 1215, 2017.
- KORDIALIK-BOGACKA, E. Cadmium and lead recovery from yeast biomass. **Cent Eur J Chem**, v. 9, p. 320 – 325, 2011.
- KYYALY, M.A.; POWELL, C.; RAMADAN, E. Preparation of iron-enriched baker's yeast and its efficiency in recovery of rats from dietary iron deficiency. **Nutrition**, v. 31, p. 1155–1164, 2015.
- LE, C.H.H., The Prevalence of Anemia and Moderate-Severe Anemia in the US Population. **PLoS One**, v. 11, n.11, 2016.
- LI, Y.; YIN, Z.; ZHANG, Y.; LIU, J.; CHENG, Y.; WANG, J.; SUN, X. Perspective of Microbe-based Minerals Fortification in Nutrition Security. **Food Reviews International**, p. 1-14, 2020.
- LIU, E.; GU, Z.; HONG, Y.; CHENG, L.; LI, C. Electrospun starch nanofibers: Recent advances, challenges, and strategies for potential pharmaceutical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 95 – 107, 2017.
- LOPEZ, M.D.A.; CACOUB, M.D.P.; MACDOUGALL, M.D.I.C.; PEYRIN-BIROULET, M.D.L.; Iron deficiency anaemia. **The Lancet**, v. 387, p. 907-916, 2016.
- LÖNNERDAL, B. Soybean ferritin: implications for iron status of vegetarians. **Am J Clin Nutr**, v. 89, n.5, p. 1680 – 1685, 2009.
- LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- NUNES, R. V.; BUTERI, C. B.; VILELA, C. G.; ALBINO, L. F. T.; ROSTAGNO, H. S. **Fatores antinutricionais dos ingredientes destinados à alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE INGREDIENTES NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL**, 2001, Campinas. Anais... Campinas, 2001, p. 235-269.
- MANDARINO, J.M.G.; HIRAKURI, M.H.; ROESSING, A.C. Tecnologia para produção do óleo de soja: descrição das etapas, equipamentos, produtos e subprodutos. 2.ed., Londrina: **Embrapa Soja-Documentos** (INFOTECA-E), 2015.
- MARCELINO, P.R.F. **Produção de biossurfactantes de segunda geração por leveduras em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2016.
- MARCELINO, P.R.F.; PERES, G.F.D.; TERÁN-HILARES, R.; PAGNOCCA, F.C.; ROSA, C.A.; LACERDA, T.M.; DOS SANTOS, J.C.; DA SILVA, S.S. Biosurfactants production by yeasts using sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate as new sustainable alternative for lignocellulosic biorefineries. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 212-223, 2019.
- MARKOVA, V.; NORGAARD, A.; JORGENSEN, K.; LANGHOFF-ROOS, J. Treatment for women with iron deficiency anaemia after childbirth. **Cochrane Database of Systematic Reviews**. Cochrane Pregnancy and Childbirth Group, 2015.
- MARTÍNEZ-GARAY, C. A.; DE LLANOS, R.; ROMERO, A. M.; MARTÍNEZ-PASTOR, M. T.; PUIG, S. Responses of *Saccharomyces cerevisiae* strains from different origins to elevated iron concentrations. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 82, n.6, p. 1906-1916, 2016.

MARTINIANO, S. E. **Produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais**. 2017. 118 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

MARTINIANO, S.E.; PHILIPPINI, R.R.; FRANCO-MARCELINO, P.R. *et al.* Effect of selenium uptake on growth metabolism in yeasts for the production of enriched single-cell protein using agro-industrial by-products. **Biomass Conv. Bioref.** 2020.

MARTINS, D. S.R; LEOCÁDIO, L. G; DA SILVERIA, C. L. P. ICP OES Simultaneous determination of Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Na and P in biodiesel by axial and radial inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. **Analytical Letters**, v. 41, p. 1615 – 1622, 2008.

MATHEWS, S.L.; PAWLAK, J.; GRUNDEN, A.M. Bacterial biodegradation and bioconversion of industrial lignocellulosic streams. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 99l, n.7, 2015.

MATTANOVICH, D.; SAUER, M.; GASSER, B. Yeast biotechnology: teaching the old dog new tricks. **Microb Cell Fact**, v. 13, n.1, p. 34, 2014.

MICULESCU, F.; MAIDANIUC, A.; VOICU, S.I.; THAKUR, V.K.; STAN, G.E., CIOCAN, L.T. Progress in Hydroxyapatite – Starch Based Sustainable Biomaterials for Biomedical Bone Substitution Applications. **ACS Sustainable Chem. Eng.** v,5, n.10, p. 8491-8512, 2017.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.

MOSIMANN, F; CASSEMIRO, J. **Caracterização de Biomassa: Carboidratos, lignina e cinza e extrativos**. Metodologias do Laboratório de Bioprocessos e Produtos Industriais. Lorena: USP/EEL, 2017. Material Técnico.

MRVCIC, J.; STANZER, D.; STEHLIK-TOMAS, V.; SKEVIN, D.; GRBA, S. Optimization of bioprocess for production of copper-enriched biomass of industrially important microorganism *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biosci. Bioeng.**, v. 103, n. 4, p. 331-337, 2007.

NIH (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH) Office of Dietary Supplements. **Iron Fact Sheet for Health Professionals**. Disponível <https://ods.od.nih.gov/factsheets/Iron-HealthProfessional/>. Acesso em: 15 ago. 2019.

OLIVEIRA, C.G.R. **Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) rica em organoselênio**. 2006. 77 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

PARK J.; MCCORMICK SP.; CHAKRABARTI M.; LINDAHL PA. The lack of synchronization between iron uptake and cell growth leads to iron overload in *Saccharomyces cerevisiae* during post-exponential growth modes. **Biochemistry**. v.52,n.52,p. 9413-9425, 2013.

PARKS, R.B.; HETZEL, S.J.; BROOKS, M.A. Iron Deficiency and Anemia among Collegiate Athletes: A Retrospective Chart Review. **Med Sci Sports Exerc**, v. 49, n.8, p. 1711 – 1715, 2017

PAS, M.; PISKUR, B.; SUSTARIC, M.; RASPOR, P. Iron enriched yeast biomass-a promising mineral feed supplement. **Bioresour Technol**, v. 98, p. 1622–1628, 2007.

PAES, M.C.D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2006, 6 p. Material técnico.

PHILIPPINI, R.R. **Produção do exopolissacarídeo lasiodiplodana a partir de hidrolisados de subprodutos agrícolas**. 2017.133. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

PHILIPPINI, R.R. *et al.* Agroindustrial Byproducts for the Generation of Biobased Products: Alternatives for Sustainable Biorefineries. **Frontiers in Energy Research**, v. 8, p. 152, 2020.

PHILPOTT, C.C.; PROTCHEKNO, O. Response to Iron Deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n.1, p. 20 – 27, 2008.

PONKA, P. Cellular iron metabolism. **Kidney International**, v. 55, n.69, p. s2 – s11, 1999.

RAAMSDONK, L.M.; DIDERICH, J.A.; KUIPER, A.; VAN GAALEN, M.; KRUCKBERG, A.L.; BERDEN, J.A.; VAN DAM, K. Co-consumption of sugars or ethanol and glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deleted in the HXK2 gene. **Yeast**, v. 18, n.11, 2001.

RAGHAVENDRA. R.; GEORGIEFF, M.M. Iron Therapy for Preterm Infants. **Clin Perinatol**, v. 36, n.1, p. 27 – 42, 2009.

RAMOS-ALONSO, L.; WITTMACK, N.; MULET, I.; MARTÍNEZ-GARAY, C.A.; FITA-TORRÓ, J.; LOZANO, M.J.; ROMERO, A.M.; GARCÍA-FERRIS, C.; PUIG, S. Molecular strategies to increase yeast iron accumulation and resistance. **Metallomics**, v. 10, n.9, p. 1245 – 1256, 2018.

RENGEL, Z. Heavy metals as essential nutrients. *In*: Heavy metal stress in plants. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 271-294, 2004.

ROSSI, E. Hecpudin – the Iron Regulatory Hormone. **Clin Biochem Rev**, v. 26, n.3, p. 47-49, 2005.

ROSTAGNO, H.; TEIXEIRA, A.L.F.; LOPES, D.J.; GOMES, P.C.; OLIVEIRA, R.F.; LOPES, D.C.; FERREIRA, A.S.; DE TOLEDO, B.S.L.; FREDERICO, E.R. **Tabelas Brasileiras Para Aves e Suínos: Composição de Alimentos e Exigências Nutricionais**. 3ª edição. Universidade Federal de Viçosa – Departamento de Zootecnia. 2011.

SANTOS, J.W. *et al.* Farelo de arroz em dietas para ovinos. **Revista Brasileira de Saúde e produção Animal**, v. 11, n.1, p. 193 – 201, 2010.

SANYANG, M.L.; ILYAS, R.A.; SAPUAN, S.M.; JUMAIDIN, R. Sugar Palm Starch - Based Composites for Packaging Applications. **Bionanocomposites for Packaging Applications**. 1st edition, Springer, Cham. p. 125 – 147, 2017.

SHIRAHIGUE, L. D.; CECCATO-ANTONINI, S. R. Agro-industrial wastes as sources of bioactive compounds for food and fermentation industries. **Ciência Rural**, v. 50, n. 4, 2020.

SINCLAIR, L.M.; HINTON, P.S. Prevalence of iron deficiency with and without anemia in recreationally active men and women. **J Am Diet Assoc**, v. 105, n.6, p. 975 -978, 2005.

STOLTZFUS, R.J. Iron deficiency: Global prevalence and consequences. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 24, n.4, p. s99 - s103, 2003.

TAKEITI, C.Y. **Trigo**. AGEITEC (AGÊNCIA EMBRAPA DE INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA), 2012. Disponível em: https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000girlwnqt02wx5ok05vadr1qrnof0m.html Acesso em: 19 out. 2019.

TOXQUI, L.; DE PIERO, A.; COURTOIS, V.; BASTIDA, S.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J.; VAQUERO, M.P. Iron deficiency and overload. Implications in oxidative stress and cardiovascular health. **Nutr Hosp**, v. 25, n.3, p. 350 – 365, 2010.

TÜRKER, M. **Yeast Biotechnology: Diversity and Applications**. 27th *In*: VH YEAST CONFERENCE: ADVANCES IN SCIENCE AND INDUSTRIAL PRODUCTIONS OF BAKER'S YEAST 27.; Istanbul, April 14th – 15th, 2014.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Silvio Silvério da Silva; Sabrina Evelin Martiniano; Rafael Rodrigues Philippini. **Processo de produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais**. BR 10 2016 024902 3, 25 out. 2016.

USDA. **Grain: World Markets and Trade**. 2020a. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/grain-corn-coarsegrains.pdf> Acesso em: 12 ago. 2020.

USDA. **Oilseeds: World Markets and Trade**. 2020b. Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> Acesso em: 12 ago. 2020.

VARNADEVAN, V., BERTOFT, E. Structure-function relationships of starch components. **Starch/Strake**, v. 66, p. 1-14, 2014.

VANNELLA, L.; SPIRITI, M.A.; COZZA, G.; TARDELLA, L.; MONARCA, B.; CUTERI, A. Benefit of concomitant gastrointestinal and gynaecological evaluation in premenopausal women with iron deficiency anaemia. **Aliment Pharmacol Ther**. v. 28, p. 422-30, 2008.

VENTI, C.A.; JOHNSTON, C.S. Modified food guide pyramid for lactovegetarians and vegans. **J Nutr**, v. 132, p. 1050–1054, 2002.

WANG, D. *et al.*, Optimization of extraction and enrichment of steroidal alkaloids from bulbs of cultivated *Fritillaria cirrhosa*. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

WEINBERG, E. D. The Lactobacillus anomaly: total iron abstinence. **Perspectives in biology and medicine**, v. 40, n.4, p. 578 – 583, 1997.

WESENDONCK, W.R. **Valor nutricional de diferentes substratos do trigo para suínos em crescimento**. 2012. 81p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

WHITTAKER, P.; TUFARO, P.R.; RADER, J.I. Iron and folate in fortified cereals. **J Am Coll Nutr**, v. 20, p. 247-254, 2001.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Global Nutrition Report 2018**. Disponível em: https://www.who.int/nutrition/globalnutritionreport/2018_Global_Nutrition_Report.pdf?ua=1 Acesso em: 15 ago. 2019.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Iron Deficiency Anaemia: Assessment, Prevention, and Control**. 2001. Disponível em: https://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf Acesso em: 13 set. 2019.

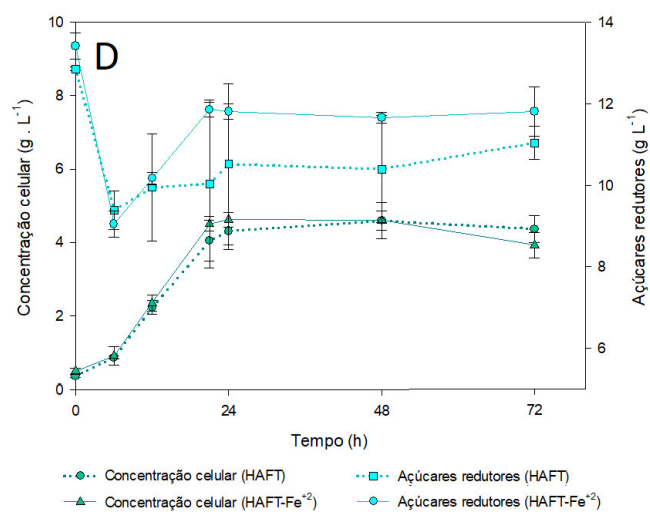
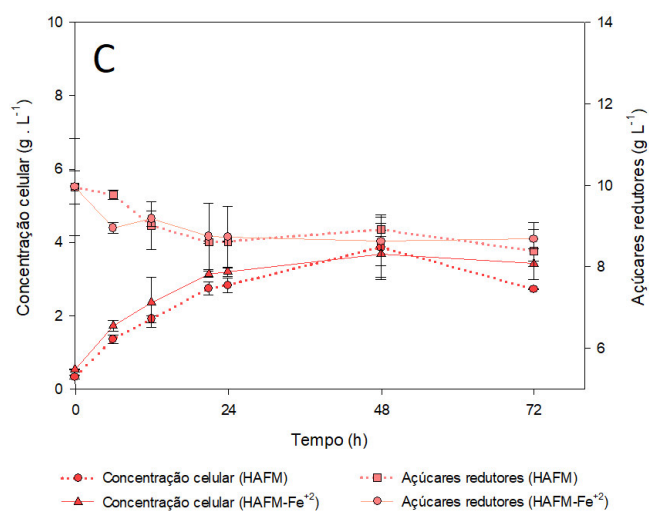
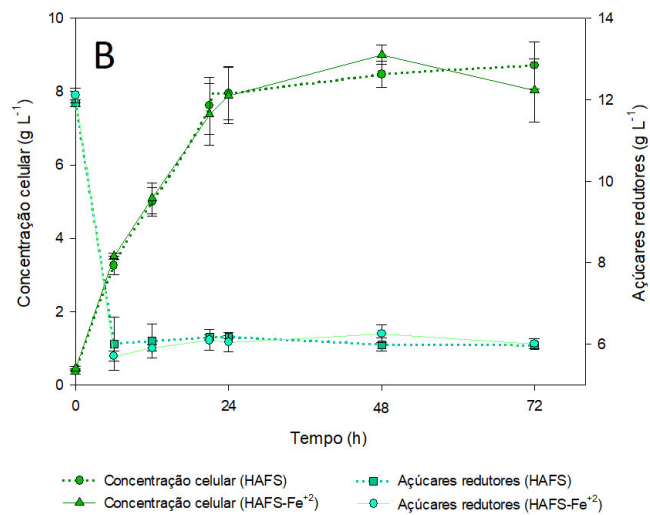
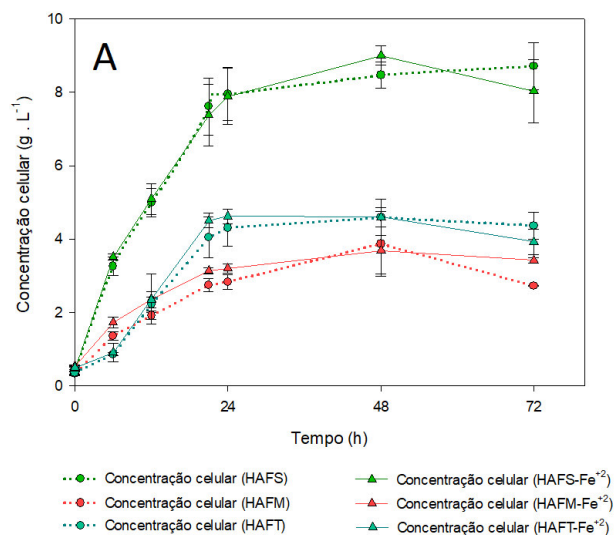
WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **The World Health Report. Geneva: World Health Organization**; 2002. Disponível em: <https://www.who.int/whr/2002/en/> Acesso em: 24 set. 2019.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). **Worldwide Prevalence of Anaemia 1993–2005: WHO Global Database on Anaemia**. World Health Organization, 2008. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43894/9789241596657_eng.pdf;jsessionid=AB579C34751F549050255E4A7784114C?sequence=1 Acesso em: 24 set. 2019.

ZAMBOM, M.A. Valor nutricional da casca do grão de soja, farelo de soja, milho moído e farelo de trigo para bovinos. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, v. 23, p. 937 – 943, 2008.

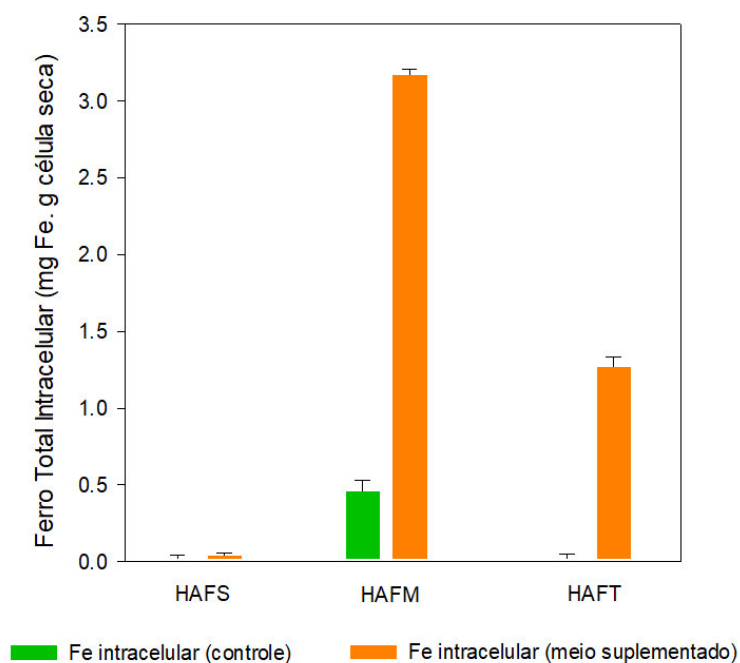
ZHUKOVSKAYA, E.; KARELI, A.; RUMYANTSEV, A. **Iron Deficiency Anemia - Neurocognitive Dysfunctions in Iron Deficiency Patients**, 2019. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/iron-deficiency-anemia/neurocognitive-dysfunctions-in-iron-deficiency-patients> Acesso em: 20 out. 2019.

ANEXO

ANEXO A - Crescimento celular e consumo de açúcares por *Saccharomyces cerevisiae* em HAFS (B), HAFM (C) e HAFM (D), crescimento celular (A)

Fonte: Autoria própria.

ANEXO B - Teor de ferro total intracelular da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* em HAFS, HAFM e HAFT após 24 horas de cultivo.



Fonte: Autoria própria

ANEXO C - Teor de ferro total intracelular (mg Fe g^{-1} célula seca) da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* em HAFS, HAFM e HAFT após 24 horas de cultivo.

Hidrolisados Ácidos	Controle	Adicionado com Fe+2
Farelo de soja (HAFS)	-0,11 ± 0,04	0,04 ± 0,02
Farelo de milho (HAFM)	0,46 ± 0,07	3,17 ± 0,34
Farelo de trigo (HAFT)	-0,038 ± 0,05	1,27 ± 0,06

Fonte: Autoria própria.