

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**Otimização estatística de variáveis da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae*  
para maior produção de biomassa com capacidade adsorvente de micotoxinas**

LAURANNE ALVES SALVATO

BELO HORIZONTE  
2019

**LAURANNE ALVES SALVATO**

**OTIMIZAÇÃO ESTATÍSTICA DE VARIÁVEIS DA FERMENTAÇÃO DE  
*Saccharomyces cerevisiae* PARA MAIOR PRODUÇÃO DE BIOMASSA COM  
CAPACIDADE ADSORVENTE DE MICOTOXINAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Ciência Animal.

**Área de concentração:** Medicina Veterinária Preventiva

**Orientadora:** Profa. Dra. Kelly Moura Keller

**Co-orientador:** Prof. Dr. Marcos Xavier Silva

Belo Horizonte  
Escola de Veterinária da UFMG  
2018

S182o Salvato, Lauranne Alves, 1990-  
Otimização estatística de variáveis da fermentação de *Saccharomyces cerevisiae* para maior produção de biomassa com capacidade adsorvente de micotoxinas / Lauranne Alves Salvato. – 2018.  
59 p. : il.

Orientadora: Kelly Moura Keller

Co-orientador: Marcos Xavier Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.  
Inclui bibliografia

1. *Saccharomyces cerevisiae* – Teses. 2. Micotoxinas – Teses. 3. Aflaxotina – Teses.  
4. Levedura – Teses. 5. Microorganismos – Teses. I. Keller, Kelly Moura. II. Silva, Marcos Xavier. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. IV. Título.

CDD – 616.01

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**LAURANNE ALVES SALVATO**

Dissertação submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de MESTRE em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.

Aprovada em 09 de Fevereiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

*Kelly Moura Keller*

Prof<sup>a</sup>. Kelly Moura Keller  
Presidente - Orientador

*Marcos Xavier Silva*

Prof. Marcos Xavier Silva  
Escola de Veterinária - UFMG

*Sorala de Araújo Diniz*

Dr<sup>a</sup>. Sorala de Araújo Diniz  
Pós Doutorado - UFMG

*Maria Isabel de Azevedo*

Prof<sup>a</sup>. Maria Isabel de Azevedo  
Escola de Veterinária - UFMG

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida e pela proteção concedida todo dia a mim e a minha família.

À minha mãe, meu pai e minha irmã, pelo amor incondicional, pelo apoio, afeto, carinho, conversas e pelos momentos de descontração.

À minha vó, pelo exemplo de luta e perseverança, pela paciência, apoio e amor ao longo de mais essa jornada.

Ao meu namorado e melhor amigo, Sérgio, pelo amor, carinho, companheirismo conselhos e por me fazer sorrir sempre.

À minha orientadora Kelly, pela orientação, “puxões de orelha”, pela amizade e por ser meu exemplo e guia durante todo o mestrado.

À professora Maria Isabel, por todo carinho, apoio, experiência e valores passados.

Aos Professores Marcos e Soraia pelas “conversas de corredor” e ensinamentos.

À toda equipe LAMICO por toda ajuda e apoio que me deram.

Aos meus amigos, pela torcida e pelas longas conversas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada, essa vitória também é de vocês.

“O que prevemos raramente  
ocorre; o que menos esperamos  
geralmente acontece.”

Benjamim Disraeli

## RESUMO

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por certos fungos. Destas, as que mais se destacam são as aflatoxinas, por apresentarem efeito carcinogênico e mutagênico. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado na adsorção de micotoxinas, por ser considerado grau GRAS (*Generally Recognized As Safe*) e sua capacidade probiótica. A produção industrial dessa levedura deve ser cuidadosa para manter sua viabilidade e suas atividades probióticas, além de ser economicamente viável. A utilização de desenhos experimentais viabiliza o processo de produção industrial por selecionar as variáveis relevantes e ao nível ótimo de cada uma, de forma a aumentar a produção de biomassa. Este trabalho teve como objetivo realizar planejamento experimental de forma a aumentar a produção de biomassa de duas cepas de *S. cerevisiae* com capacidade probiótica e adsorvente de micotoxina. Para tal foram utilizadas as cepas *S. cerevisiae* LL74 e LL83. Os modelos utilizados, Plackett-Burman e Box-Behnken, se mostraram eficientes para otimização, melhorando estatisticamente a produção de biomassa quando comparado às condições padrão descritas na literatura (meio YPD, a 30°C e 150 rpm). O modelo foi estatisticamente significativo com intervalo de confiança de 95% e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) indicou precisão aceitável. A condição otimizada para maior produção de biomassa da cepa *S. cerevisiae* LL74 apresentou economia de até 80% quando comparada ao meio padrão YPD e apresentou um aumento de 14,5% na produção de biomassa. Ao passo que, mesmo apresentando aumento de 6,3% na produção de biomassa, a levedura *S. cerevisiae* LL83 requereu uma quantidade de insumos para sua produção ótima de biomassa até 119% maior quando comparado ao meio padrão YPD. A utilização de desenhos experimentais se mostrou eficiente para otimização da produção de biomassa de *S. cerevisiae*, melhorando estatisticamente o processo produtivo.

**Palavras-chave:** Plackett-Burman, Box-Behnken, Aflatoxina B<sub>1</sub>, Levedura.

## ABSTRACT

Mycotoxins are secondary fungal metabolites produced by some fungi species. Among of these, aflatoxins are the most outstanding, because they have a carcinogenic and mutagenic effect. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the main microorganism used in the adsorption of mycotoxins because it is considered GRAS (Generally Recognized As Safe) and its probiotic capacity. The industrial production of this yeast must be careful to maintain its viability and its probiotic activities, in addition to being economically viable. The use of experimental designs enables the industrial production process by selecting the relevant variables and the optimum level of each one, in order to increase the biomass production. The objective of this work was to carry out experimental planning in order to increase the biomass production of two strains of *S. cerevisiae*, with probiotic and mycotoxin adsorbent capacity. The strains *S. cerevisiae* LL74 and LL83 were used for this purpose. The models used, Plackett-Burman and Box-Behnken, were efficient for optimization, statistically improving the biomass production when compared to the standard conditions described in the literature (YPD medium, at 30°C and 150 rpm). The model was statistically significant with a 95% confidence interval and the coefficient of determination ( $R^2$ ) indicated an acceptable accuracy. The optimized medium condition for higher biomass production of the *S. cerevisiae* LL74 strain presented savings of up to 80% when compared to the standard YPD medium and presented a 14.5% increase in biomass production. Although, the *S. cerevisiae* LL83 strain required a quantity of inputs for its optimum biomass production up to 119% higher when compared to the standard YPD medium, even with a 6.3% increase in biomass production. The use of experimental designs proved to be efficient for the optimization of *S. cerevisiae* biomass production, statistically improving the production process.

**Keywords:** Plackett-Burman, Box-Behnken, Aflatoxin B<sub>1</sub>, Yeast.



---

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1</b> - Estruturas químicas das aflatoxinas B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , G <sub>1</sub> e G <sub>2</sub> .....	04
<b>Figura 2</b> - Parede celular de levedura. As manano-proteínas, $\beta$ -1,3-glucanos, $\beta$ -1,6-glucanos e quitina são sobrepostas. As proteínas conjugadas com manano-proteínas se estendem para além da parede celular.....	08
<b>Figura 3</b> - Curvas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> LL74 nos diferentes meios de cultivo testados para maior produção de biomassa.....	19
<b>Figura 4</b> - Curvas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> LL83 nos diferentes meios de cultivo testados para maior produção de biomassa.....	20
<b>Figura 5</b> - Microscopia 400 $\times$ , campo C da câmara de Neubauer, das leveduras <i>S. cerevisiae</i> LL74 (esquerda) e LL83 (direita).....	22
<b>Figura 6</b> - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das variáveis sobre o crescimento de <i>S. cerevisiae</i> LL74.....	32
<b>Figura 7</b> - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das variáveis sobre o crescimento de <i>S. cerevisiae</i> LL83.....	33
<b>Figura 8</b> - Gráficos de otimização das variáveis para <i>S. cerevisiae</i> LL74.....	35
<b>Figura 9</b> - Gráficos de otimização das variáveis para <i>S. cerevisiae</i> LL83.....	36

---

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1</b> - Valores das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) durante a fase exponencial (4 a 8 h) e tempos de geração para as cepas <i>S. cerevisiae</i> LL74 e LL83 nos diferentes meios de cultivo testados.....	21
<b>Tabela 2</b> - Equações da reta de regressão linear (DO e $\log_{10}$ UFC) com respectivos intervalos de confiança para o crescimento das cepas <i>S. cerevisiae</i> LL74 e LL83.....	22
<b>Tabela 3</b> - Desenho de seleção de Plackett-Burman.....	23
<b>Tabela 4</b> - Matriz Plackett-Burman com dados codificados para as variáveis estudadas e respectivas respostas de <i>S. cerevisiae</i> LL74.....	23
<b>Tabela 5</b> - Matriz Plackett-Burman com dados codificados para as variáveis estudadas e respectivas respostas de <i>S. cerevisiae</i> LL83.....	24
<b>Tabela 6</b> - Resultados <sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Plackett-Burman aplicado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> LL74.....	25
<b>Tabela 7</b> - Resultados <sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Plackett-Burman aplicado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> LL83.....	25
<b>Tabela 8</b> - Desenho de otimização de Box-Behnken.....	26
<b>Tabela 9</b> - Matriz Box-Behnken com as variáveis estudadas e respectivas respostas de <i>S. cerevisiae</i> LL74.....	26
<b>Tabela 10</b> - Matriz Box-Behnken com as variáveis estudadas e respectivas respostas de <i>S. cerevisiae</i> LL83.....	27
<b>Tabela 11</b> - Resultados <sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Box-Behnken aplicado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> LL74.....	29
<b>Tabela 12</b> - Resultados <sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Box-Behnken aplicado para produção de biomassa de <i>S. cerevisiae</i> LL83.....	30
<b>Tabela 13</b> - Condições ótimas para produção de biomassa das cepas <i>S. cerevisiae</i> LL74 e LL83.....	37
<b>Tabela 14</b> - Valores médios <sup>#</sup> das curvas de crescimento de <i>S. cerevisiae</i> LL74 e LL83 em condição otimizada e em caldo YPD convencional.....	38

## LISTA DE ABREVIATURAS

AFB <sub>1</sub>	Aflatoxina B <sub>1</sub>
AFB <sub>2</sub>	Aflatoxina B <sub>2</sub>
AFG <sub>1</sub>	Aflatoxina G <sub>1</sub>
AFG <sub>2</sub>	Aflatoxina G <sub>2</sub>
AFLA	Aflatoxinas
AFM <sub>1</sub>	Aflatoxina M <sub>1</sub>
ATCC	Coleção de microrganismos norte-americana (do inglês <i>American Type Culture Collection</i> )
BBD	Delineamento Box-Behnken (do inglês <i>Box-Behnken Design</i> )
BHI	Infusão de cérebro e coração (do inglês <i>Brain Heart Infusion</i> )
CCD	Desenhos de compostos centrais (do inglês <i>Central Composite Design</i> )
DO	Densidade óptica
DOE	Planejamento de experimentos (do inglês <i>Design of Experiments</i> )
DON	Deoxinivalenol
FAO	Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (do inglês <i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> )
FUMO	Fumonisin
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro (do inglês <i>Generally Recognized As Safe</i> )
HSCAS	Aluminossilicatos sódio-cálcio hidratados (do inglês <i>Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicate</i> )
IgA	Imunoglobulina A
IgM	Imunoglobulina M
OCRA	Ocratoxinas
OMS	Organização Mundial de Saúde
Otm	Meio em condições otimizadas
PB	Delineamento Plackett-Burman (do inglês <i>Plackett-Burman Design</i> )
rpm	Rotações por minuto
RSM	Metodologia de superfície de respostas (do inglês <i>Response Surface Methodology</i> )
SNK	Teste de Student-Newman-Keuls
T2	Toxina T-2
TGI	Trato gastrointestinal
UFC	Unidades formadoras de colônia
YPD	Extrato de levedura, peptona e dextrose (do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> )
YPS	Extrato de levedura, peptona e sacarose (do inglês <i>Yeast Extract Peptone Sucrose</i> )
YPD+S	Extrato de levedura, peptona, dextrose e sacarose (do inglês <i>Yeast Extract Peptone Dextrose and Sucrose</i> )
ZON	Zearalenona

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>02</b>
2.1	Objetivo geral.....	02
2.1	Objetivos específicos.....	02
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>03</b>
3.1	Micotoxinas.....	03
3.2	Prevenção e controle.....	04
3.2.1	Métodos de descontaminação.....	06
3.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	08
3.3	Prebiótico.....	09
3.4	Probiótico.....	10
3.5	Quantificação do crescimento celular.....	11
3.6	Otimização estatística.....	12
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
4.1	Desenho experimental de seleção da fonte de carbono para maior produção de biomassa.....	15
4.2	Desenhos experimentais de interações das variáveis sobre a produção de biomassa.....	16
4.3	Comparação das curvas de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio otimizado e não otimizado.....	17
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>18</b>
5.1	Desenho experimental de seleção da fonte de carbono para maior produção de biomassa.....	18
5.2.	Desenhos experimentais de interações das variáveis sobre a produção de biomassa.....	23
5.3	Crescimento das leveduras em meio otimizado.....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

As diversas fontes utilizadas para alimentação humana ou animal devem ser livres de contaminantes, sejam eles químicos ou naturais. Um importante grupo de agentes contaminantes são as micotoxinas e estima-se que possa afetar cerca de 25% das colheitas agrícolas a cada ano. Essas toxinas são produzidas por certos fungos durante seu metabolismo secundário, como uma defesa a uma situação de estresse. Existem diversos tipos de micotoxinas, dentre as quais se destacam as aflatoxinas, por apresentarem efeitos carcinogênico e mutagênico.

É de extrema importância evitar a contaminação dos alimentos utilizando técnicas agrícolas eficientes na diminuição da carga fúngica e conseqüentemente na redução das micotoxinas. Porém, é difícil controlar essa contaminação, uma vez que ela pode ocorrer em qualquer estágio da produção do alimento. Quando não é possível evitar essa contaminação prévia, torna-se necessário utilizar substâncias que possam diminuir a carga de micotoxinas nos alimentos. O estudo de aditivos alimentares de origem biológica, com potencial para prevenir os efeitos deletérios desses metabólitos, e reduzir o grave impacto em termos de morbidade e mortalidade que estas originam é fundamental, e proporciona impacto econômico relevante.

Atualmente, *Saccharomyces cerevisiae* é o principal microrganismo utilizado no combate aos problemas decorrentes das micotoxinas em alimentos para animais de produção. A utilização dessa levedura como forma de descontaminação é promissora, principalmente por ser considerado um microrganismo grau GRAS (*Generally Recognized As Safe*), e por sua capacidade probiótica. Essas leveduras ligam-se às toxinas formando complexos insolúveis no trato gastrointestinal que são posteriormente eliminados nas fezes. Assim, ao reduzir a biodisponibilidade e a absorção das micotoxinas, acabam por diminuir seus efeitos tóxicos.

A produção industrial de *S. cerevisiae* deve garantir que as tecnologias empregadas mantenham a estabilidade, a viabilidade e as atividades probióticas da levedura ao longo de toda sua vida útil. Esse processo também deve ser economicamente viável.

A utilização de planejamentos experimentais por intermédio de processos desenhados estatisticamente melhora o processo de produção industrial de *S. cerevisiae*, uma vez que seleciona os níveis ótimos das variáveis relevantes e aumenta a produção de biomassa.

A capacidade probiótica e de adsorção de micotoxinas por *S. cerevisiae* está relacionada a componentes de sua parede celular. Dessa forma, o estudo da otimização da produção de biomassa por *S. cerevisiae* é relevante pois, uma vez que se obtenha uma maior quantidade de produto, a área de adsorção aumenta e, com isso, também aumenta a capacidade de adsorção de micotoxinas em menor tempo e custo.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Otimizar a produção de biomassa de duas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (LL74 e LL83) com capacidade probiótica e adsorvente de micotoxinas.

### 2.2 Objetivos específicos

- a) Realizar o planejamento de experimentos (DOE) em escala laboratorial.
- b) Quantificar o crescimento de *S. cerevisiae* utilizando diferentes metodologias de quantificação, com posterior obtenção de curvas de correlação entre metodologia indireta e metodologia direta.
- c) Selecionar, por meio de modelagem estatística, variáveis de interesse para maior produção de biomassa de *S. cerevisiae*.
- d) Maximizar, por meio de modelagem estatística, a produção da biomassa de *S. cerevisiae* pela definição dos principais componentes do meio de cultivo e suas concentrações ótimas.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Micotoxinas

As fontes de nutrientes destinadas à alimentação humana ou animal devem estar livres de contaminantes químicos naturais ou sintéticos, que podem causar danos à saúde. Um importante grupo de contaminantes são as toxinas produzidas naturalmente por microrganismos, plantas ou animais. Nesse grupo se destacam as micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por diversas espécies fúngicas (CRUZ, 2010). Esses podem se desenvolver em diversos substratos e, quando se encontram em situações de estresse, podem produzir micotoxinas que trazem diversos riscos para a saúde humana e animal (BAPTISTA et al., 2004; VENEGAS et al., 2014).

Estima-se que haja mais de 500 micotoxinas conhecidas, porém apenas um grupo muito pequeno é identificado em alimentos e tem sido mais frequentemente estudado (CRUZ, 2010; MOK et al., 2013). As micotoxinas representam um grande risco à saúde por apresentarem efeitos bioquímicos e biológicos quando ingeridas. Biologicamente podem causar carcinogenicidade, mutagenicidade, teratogenicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, entre outros; já os efeitos bioquímicos envolvem alterações no metabolismo de carboidratos, lipídios, ácidos nucleicos e proteínas (PEREIRA et al., 2002; BAPTISTA et al., 2004).

O impacto causado pelas micotoxinas pode ser visto em todos os níveis da produção vegetal e animal, desde sua formação e comercialização até a utilização dos produtos e subprodutos. Os fungos produtores de micotoxinas estão amplamente distribuídos na natureza e contaminam principalmente produtos agrícolas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) as considera um dos maiores poluentes ambientais, e estima-se que  $\frac{1}{3}$  de toda a produção de grãos esteja contaminada, o que leva a uma grande preocupação mundial. Além do dano direto à saúde, as micotoxinas causam, indiretamente, uma grande perda econômica, tanto pelo descarte do alimento contaminado quanto por levar a uma diminuição do crescimento e perda da produção animal (BAPTISTA et al., 2004; PIEREZAN et al., 2012; URIBE-YUNDA; NAVAS, 2012).

As micotoxinas mais comumente encontradas em alimentos são as aflatoxinas (AFLA), deoxinivalenol (DON), zearalenona (ZON), fumonisinas (FUMO), ocratoxinas (OCRA) e toxina T-2 (T2). Além do efeito que essas toxinas possuem separadas, há o efeito sinérgico, visto que, em um mesmo alimento, muitas vezes podemos encontrar duas ou mais espécies fúngicas colonizadoras e/ou produtoras de diferentes micotoxinas (LEESON; SUMMERS, 2001).

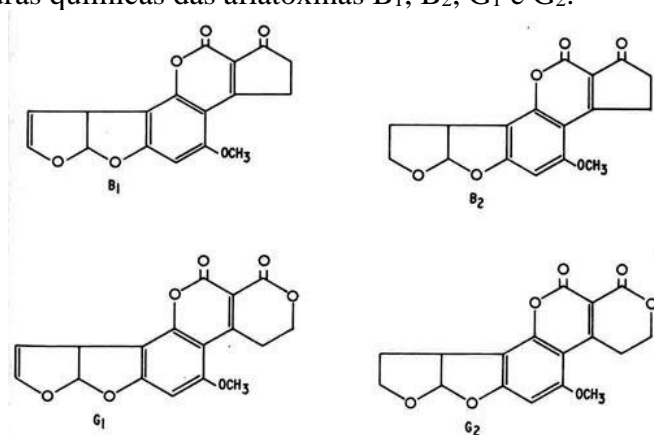
Dentre as micotoxinas, as aflatoxinas são as que podem causar maior dano à saúde animal e humana, por sua alta toxicidade e efeito carcinogênico (MAIA; SIQUEIRA, 2007; MEDEIROS et al., 2011; MOK et al., 2013). As aflatoxinas são produzidas por fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., sendo os maiores produtores as espécies *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* e *Aspergillus nomius* (PEREIRA et al., 2002; CRUZ, 2010). Estes fungos são abundantes na natureza,

encontrados principalmente em regiões de clima tropical e subtropical (SEGURA et al., 2013).

O termo coletivo aflatoxinas é usado para designar um grupo de toxinas, sendo ao todo 17 compostos isolados que pertencem a este grupo. As aflatoxinas mais estudadas são aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>), aflatoxina B<sub>2</sub> (AFB<sub>2</sub>), aflatoxina G<sub>1</sub> (AFG<sub>1</sub>) e aflatoxina G<sub>2</sub> (AFG<sub>2</sub>). As estruturas químicas dessas micotoxinas são similares: todas apresentam um núcleo central cumarínico ligado a uma estrutura bifuranoide (Figura 1). A AFB<sub>1</sub> é considerada uma das substâncias mais carcinogênicas conhecida (MAIA; SIQUEIRA, 2007).

Quando ingerida em grande quantidade e em curto espaço de tempo, ocorre a aflatoxicose aguda, que pode causar necrose hepática, hemorragia, insuficiência hepática aguda e edema, até mesmo levando à morte. A aflatoxicose crônica é causada pela ingestão de baixos níveis dessa toxina diariamente, e está associada a distúrbios na digestão, absorção e/ou metabolismo de nutrientes, podendo causar perda de peso, apatia, diminuição da conversão alimentar e produção de leite, além de aumentar consideravelmente a probabilidade de o animal desenvolver cirrose e carcinomas ou tumores primários hepáticos ao longo da vida (VENEGAS et al., 2014).

**Figura 1** - Estruturas químicas das aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>.



Fonte: adaptado de Cardwell et al. (2000).

A aflatoxicose crônica é considerada a principal forma clínica encontrada a campo e seus efeitos deletérios são de característica subclínica, ou seja, nem sempre são evidentes ao produtor, o que leva a grandes perdas econômicas a médio e longo prazo (MALLMANN et al., 2006).

### 3.2 Prevenção e controle

A contaminação de alimentos por aflatoxinas pode ocorrer em qualquer fase, desde sua produção até o consumo final. Quando ingerida, a AFB<sub>1</sub> sofre biotransformação primária no fígado. No caso de contaminação em ração ou alimento destinado à alimentação de animais de produção, os produtos de sua biotransformação podem estar



presentes em carne, leite, ovos e produtos derivados, uma vez que a AFB<sub>1</sub> não é inativada pelos métodos e processamentos tecnológicos (MAIA; SIQUEIRA, 2007). De maneira geral, as micotoxinas apresentam grande estabilidade química, o que permite sua presença no alimento mesmo após a remoção dos fungos pelos processos normais de descontaminação ou processamento industrial do alimento (ACEVEDO et al., 1995).

Em virtude das características tóxicas das micotoxinas, há a necessidade de prevenir a contaminação dos alimentos manipulando o microambiente onde se encontram. Os métodos para controle podem ser classificados em duas categorias: prevenção da contaminação e crescimento fúngico e descontaminação dos compostos tóxicos (MALLMANN et al., 2006).

O uso de boas práticas agrícolas evita a contaminação das lavouras e a prevenção da contaminação pós-colheita, que prioriza evitar a contaminação e produção de micotoxina no processo de estocagem e processamento (FERREIRA et al., 2006).

É importante que, durante o armazenamento, a temperatura e a umidade estejam controladas, visto que a produção máxima de micotoxinas ocorre por volta dos 24°C para a maioria dos fungos produtores de AFB<sub>1</sub>, não havendo produção quando a temperatura é inferior a 15°C. Embora algumas espécies de *Aspergillus* sp. consigam sobreviver e se desenvolver em baixa umidade, observa-se maior quantidade de micotoxinas em grãos armazenados sob alta umidade. O ideal é manter a umidade relativa na estocagem abaixo de 60% e a umidade do alimento abaixo de 12% (BAPTISTA et al., 2004).

O uso de engenharia genética e obtenção de grãos resistente aos fungos é considerado um método prático e eficiente. Outra estratégia interessante é utilizar controle biológico, através do uso de competidores naturais que inibem o crescimento ou reduzem a carga fúngica. A utilização de mais de uma estratégia de controle promove maior estabilidade e redução efetiva nos níveis de contaminação, porém essas estratégias nem sempre são utilizadas por falta de mão de obra, de maquinário ou não são acessíveis a todos os produtores, principalmente os de baixa renda (BAPTISTA et al., 2004; MECA et al., 2010).

Quando não é possível a aplicação dos métodos de prevenção e controle na colheita e no armazenamento ou os métodos foram ineficazes, a alternativa é a descontaminação. Esta se refere ao tratamento pós-colheita para destruir ou reduzir a carga de micotoxina (MALLMANN et al., 2006).

A Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO) estabeleceu vários critérios para a aceitação de um processo de descontaminação, dentre os quais estão:

- Destruir, inativar ou eliminar a toxina;
- Não produzir resíduos tóxicos ou carcinogênicos nos produtos finais, ou em alimentos obtidos a partir de animais que se alimentaram de uma dieta detoxificada;
- Manter o valor nutritivo e a palatabilidade do produto;
- Não alterar as propriedades tecnológicas importantes de forma significativa;
- Destruir todos os esporos e micélios fúngicos para que não possam, em condições favoráveis, proliferar e produzir novas micotoxinas (FAO, 1995).

### 3.2.1 Métodos de descontaminação

A descontaminação pode ser feita por métodos físicos, químicos ou biológicos. Ambas as técnicas se mostram eficientes na redução da carga de micotoxinas em alimentos. O beneficiamento de grãos reduz tanto a carga de micotoxinas quanto a carga fúngica (MALLMANN et al., 2006).

A utilização de agentes físicos, como o carvão ativado, é realizada diariamente na África. Porém, seu efeito depende da espécie a ser avaliada e de sua concentração, muitas vezes apresentando falhas na descontaminação (AVANTAGGIATO et al., 2005). Os métodos físicos podem necessitar de mão de obra qualificada, maquinário específico e, muitas vezes, de avaliação prévia para quantificação de micotoxinas, uma vez que produtos que não estão visivelmente contaminados podem conter níveis elevados de micotoxinas (MALLMANN et al., 2006; KWIATKOWSKI; ALVES, 2007; BOVO et al., 2010).

A descontaminação química é realizada por meio de reações que se utilizam de alta pressão ou extração, solventes orgânicos ou combinações dessas técnicas. A utilização de amônia para descontaminação tem se mostrado bastante eficiente, podendo ocorrer degradação de aflatoxinas. Deve-se tomar cuidado com a utilização de agentes químicos, já que é importante avaliar se esse produto causa efeitos deletérios na saúde do consumidor e se não há outros compostos nos alimentos que podem interagir entre si, podendo, inclusive, aumentar sua toxicidade, causando efeitos deletérios à saúde (MALLMANN et al., 2006; KWIATKOWSKI; ALVES, 2007).

Outra importante forma de descontaminação é a utilização de aditivos biológicos, os quais podem ser enzimas ou microrganismos. Os microrganismos mais utilizados são bactérias do gênero *Lactobacillus* sp. e leveduras. As leveduras são consideradas descontaminantes de micotoxinas pelo fato de sua parede celular possuir a capacidade de adsorção, além de algumas apresentarem capacidades probióticas (MALLMANN et al., 2006).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada por ser um organismo conhecido como grau GRAS (*Generally Recognized As Safe*), além de ser um excelente fermentador, participando da fabricação de diversos produtos, como vinho, pão e cervejas. É um microrganismo unicelular eucariótico, que apresenta morfologia variada. Possui a capacidade de ajustar-se metabolicamente para a fermentação de açúcares na presença ou ausência de oxigênio, produzindo álcool ou gás carbônico (PICCININ et al., 2005; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

*Saccharomyces cerevisiae* como aditivo alimentar e adsorvente de micotoxinas é o método mais utilizado para descontaminação, reduzindo a carga de micotoxinas ingeridas na cadeia de produção animal. A adsorção é um fenômeno físico-químico no qual o componente em uma fase gasosa ou líquida é transferido para a superfície de uma fase sólida. A migração desses componentes de uma fase para outra tem como principal fator a diferença de concentração do meio e a superfície da substância adsorvente. Portanto, quanto maior for essa superfície, maior será a eficiência da adsorção (LEESON; SUMMERS, 2001; BORBA, 2006).

Segundo Cheremisinoff e Ellerbusch (1978), existem basicamente dois tipos de adsorção: a física e a química, as quais podem ocorrer simultaneamente. Na adsorção física ocorre interação de Van der Waals entre o adsorvente e a substância a ser adsorvida. As interações do tipo Van der Waals são de longo alcance, porém são ligações fracas. Na adsorção química, as moléculas unem-se à superfície do adsorvente por ligações químicas, acomodando-se em sítios específicos (DROGUETT, 1983).

As substâncias adsorventes possuem a capacidade de aderir à micotoxina, impedindo-a de ser absorvida no trato digestivo, tornando-a indisponível para o animal e, com isso, diminuindo sua toxicidade. Entretanto, deve-se tomar cuidado, pois alguns adsorventes interferem na dieta animal, desbalanceando ou adsorvendo alguns nutrientes importantes para a dieta por afinidade química (LEESON; SUMMERS, 2001).

Considerando que as micotoxinas possuem estruturas diferentes, os adsorventes considerados mais eficientes são aqueles que conseguem adsorver maior variedade de substâncias (GIMENO; MARTINS, 2011). Uma boa substância adsorvente deve ter a capacidade de inativar ou remover a micotoxina, não gerar resíduos tóxicos, não afetar a dieta e ser sanitária e economicamente viável. Dentre os adsorventes, temos os de origem inorgânica e orgânica (DIAZ; SMITH, 2008).

Os adsorventes inorgânicos são polímeros à base de silicatos. Argilas, zeólitas, bentonitas, aluminossilicatos sódio-cálcio hidratados (HSCAS) são os mais empregados atualmente, além de outros tipos de argilas. Embora possuam a capacidade de adsorver uma grande quantidade de toxinas, micotoxinas e metais pesados, essas substâncias também têm afinidade por nutrientes da dieta, o que pode levar ao desbalanceamento nutricional, gerando complicações para a saúde animal. Os adsorventes inorgânicos não são biodegradáveis, o que pode representar grandes problemas quanto ao destino dos resíduos, já que são acrescentados em altos níveis na dieta e não há estudos relatando efeitos a longo prazo da ingestão continuada dessas substâncias (SOARES, 2010; DI CASTRO, 2014).

Os adsorventes orgânicos são substâncias à base de carbono, em geral derivados de fibras de plantas ou derivados de parede celular de microrganismos, sendo em sua maioria leveduras. As leveduras são amplamente utilizadas como adsorventes e incluídas nas dietas de animais de produção. Sua utilização para a redução da carga de micotoxinas na alimentação é uma técnica bastante utilizada e tem sido alvo de diversos estudos. As leveduras são organismos unicelulares, medindo de 5 a 10 micras. As espécies de leveduras variam em morfologia, metabolismo, modo de reprodução e locais onde podem ser encontradas (STONE; MILLS, 2007; SILVA et al., 2012).

A parede celular das leveduras também é bastante utilizada; sua composição inclui principalmente polissacarídeos ligados às proteínas. A utilização de leveduras como adsorvente se mostra um método eficiente, já que não são tóxicas, possuem grande área de superfície, boa especificidade e necessitam de baixa inclusão na dieta para um bom efeito adsorvente, além de algumas apresentarem efeito probiótico. Dentro desse contexto, destacamos a levedura *S. cerevisiae* como adsorvente (RAKSHAE; PANAHANDEH, 2011).

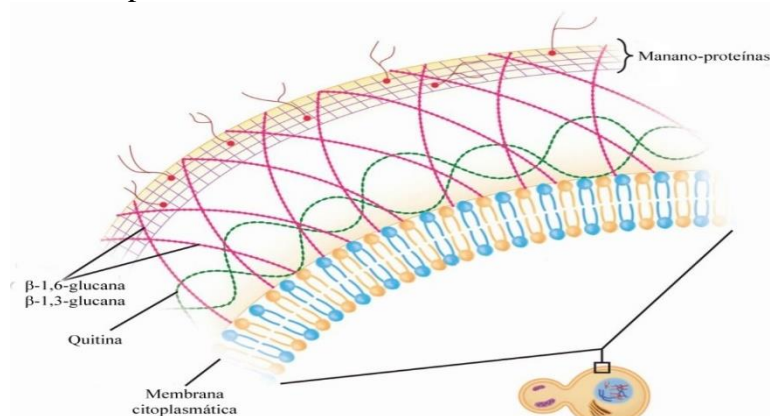
### 3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

O desenvolvimento da parede celular como proteção é primordial para o crescimento e a sobrevivência das células fúngicas, sendo uma estrutura forte, que circunda toda a levedura e é responsável pela proteção física e estabilidade osmótica da célula, permitindo o transporte de nutrientes para o citoplasma através de permeabilidade seletiva (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008).

A parede celular de *S. cerevisiae* possui duas camadas, compostas por três macromoléculas principais: manano-proteínas, que formam um complexo no qual o polissacarídeo manana se liga covalentemente à proteína; glucano, que é um polissacarídeo representado por  $\beta$ -glucanos:  $\beta$ -1,3 e  $\beta$ -1,6-glucanos e, quitina, que é um polímero de  $\beta$ -1,4 N-acetilglicosamina. Esses componentes são unidos por ligações covalentes (FERRACINI-SANTOS; SATO, 2009).

As manano-proteínas correspondem a 30% do peso seco da parede celular, compõem a camada mais externa e estão ligadas covalentemente às cadeias  $\beta$ -1,6-glucanos. Os  $\beta$ -1,6-glucanos correspondem a aproximadamente 5% do peso seco da parede celular e são moléculas pequenas, contendo cerca de 140 resíduos de glicose. Os  $\beta$ -1,3-glucanos correspondem a aproximadamente 60% da parede celular, sendo compostas predominantemente por moléculas lineares, com cerca de 50 resíduos ligados através do carbono com moléculas de  $\beta$ -1,6-glucanos e quitina (Figura 2) (PICCININ et al., 2005; MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008; FERRACINI-SANTOS; SATO, 2009).

**Figura 2** - Parede celular de levedura. As manano-proteínas,  $\beta$ -1,3-glucanos,  $\beta$ -1,6-glucanos e quitina são sobrepostas. As proteínas conjugadas com manano-proteínas se estendem para além da parede celular.



Fonte: adaptado de Ryan e Ray (2014).

Estudos realizados por Yiannikouris et al. (2004) mostraram que as leveduras possuem a habilidade de reduzir os efeitos das micotoxinas pela capacidade de adsorvê-las em sua parede celular. Os  $\beta$ -1,3-glucanos apresentam uma estrutura tridimensional, o que possibilita a adsorção de diferentes moléculas, entre elas micotoxinas e seus derivados metabólicos (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008). Além disso, apresentam

habilidade para estimular o sistema imunológico do hospedeiro, o que exerce diversos benefícios contra infecções bacterianas, virais, fúngicas, tumores, efeitos de radiação e estresse oxidativo (ARMANDO et al., 2011).

As manano-proteínas possuem atividade imunogênica, estimulando imunoglobulina A (IgA) intestinal e atuando com células de defesa do organismo, além de possuírem a capacidade de inibir a atividade tóxica de micotoxinas, graças à sua capacidade antioxidante. Também foi descrito que as manano-proteínas possuem sítios de ligação com bactérias patogênicas, possuindo a capacidade de se ligar a essas e carregá-las ao longo de todo o intestino. Além disso, esse estímulo imune promove a ativação de células de defesa, o que aumenta a imunidade da mucosa, promovendo maior proteção (MAGNANI; CASTRO-GÓMEZ, 2008, KELLER, 2012).

Em razão de seus inúmeros benefícios, a produção de biomassa de *S. cerevisiae* tem aumentado em todo o mundo para a fabricação de produtos de ação probiótica e adsorvente de micotoxinas, uma vez que, aumentando a quantidade de leveduras, também aumenta a área de adsorção. As leveduras são mais resistentes que bactérias lácticas, resistindo a mudanças repentinas de pH e mudanças osmóticas no meio, além de apresentarem menores requisitos nutricionais, o que leva a custos menores no processo de produção. Porém, o processo de produção de biomassa deve assegurar estabilidade e viabilidade, incluindo capacidade de reprodução e atividade durante seu tempo de vida. Além disso, quando não se deseja manter a viabilidade da célula de levedura, podem-se aproveitar apenas os componentes de sua membrana celular e utilizá-los como prebiótico. Em razão da capacidade de resistir a grandes temperaturas, as paredes celulares de leveduras podem ser usadas em diversos processamentos industriais de alimentos, incluindo rações extrusadas (KELLER, 2012; ARMANDO et al., 2011).

### 3.3 Prebiótico

O termo prebiótico foi definido por Gibson e Roberfroid (1995) para se referir a uma substância alimentar não digerível que afeta de maneira benéfica o hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou uma quantidade limitada de microrganismos no cólon.

Alguns prebióticos são usados como promotores de crescimento, já que ao manter o equilíbrio da microbiota intestinal, especialmente em animais jovens ou em situação de estresse, permite maior ganho de peso, maior produção ou maior desempenho do animal. As substâncias mais estudadas como prebióticos são oligossacarídeos, sendo em sua maioria provenientes de hidrólise parcial de produtos comerciais ou por reação de transglicosilação (SILVA; ANDREATTI FILHO, 2000).

Os oligossacarídeos mais pesquisados são fruto-oligossacarídeos, gluco-oligossacarídeos e mananoligossacarídeos. Os fruto-oligossacarídeos são resultantes da polimerização da frutose natural, derivada de plantas, ou sintética. Já os gluco-oligossacarídeos e mananoligossacarídeos são provenientes da parede celular de leveduras (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Os mananoligossacarídeos apresentam como ação prebiótica: induzir a ativação de macrófagos da luz do intestino; bloquear o sítio de adesão das bactérias; facilitar a

apresentação de patógenos a células do sistema imune; estimular a secreção de IgA e Imunoglobulina M (IgM); estimular o crescimento das bactérias produtoras de ácido láctico; promover aumento uniforme da altura das vilosidades intestinais; melhorar a integridade intestinal e a absorção dos nutrientes (SILVA; ANDREATTI FILHO, 2000).

### 3.4 Probiótico

Quando se descobriu que microrganismos são benéficos à saúde, Parker (1974) utilizou pela primeira vez o termo probiótico, de origem grega, que significa “a favor da vida”, usado como definição de organismos e substâncias que contribuem para o balanço microbiano intestinal (BARBOSA et al., 2011). Desde então vários autores mudaram a definição de probiótico, sendo a mais recente feita pela Organização Mundial de Saúde e Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura, segundo as quais probiótico é descrito como: “microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO, 2002).

De acordo com a FAO (2002), um bom probiótico deve ser: capaz de ser produzidos em escala industrial; viável e estável durante a estocagem; capaz de sobreviver às condições do trato gastrointestinal (TGI), preferencialmente aderindo-se à mucosa; produzir efeito benéfico à saúde do hospedeiro, por meio de atividade antimicrobiana contra patógenos, reduzindo sua adesão; possuir atividade hidrolítica sobre sais biliares, além de contribuir nutricionalmente; modular atividade imunológica; não ser patogênico; apresentar relação espécie-específica com hospedeiro; identificado genotipicamente e fenotipicamente. Além disso, sua segurança deve ser constatada.

É necessário que o microrganismo a ser usado esteja em níveis adequados para que exerça sua função probiótica. É dito que, para maioria dos microrganismos, deve haver pelo menos  $10^7$  unidades formadoras de colônias (UFC)/grama de conteúdo intestinal, no caso do TGI (GUILLOT, 2001). O efeito benéfico à saúde do hospedeiro tem sido associado ao antagonismo com patógenos, interferência com microrganismos patogênicos, efeito barreira, resistência à colonização e exclusão competitiva (ROLFE, 2000).

*Saccharomyces cerevisiae* tem a capacidade de estimular a produção de IgA e IgM em razão dos mananoligossacarídeos presentes em sua parede celular; além disso, essa levedura possui a capacidade de produzir substâncias, enzimas, vitaminas do complexo B e aminoácidos; produz efeito antagonista contra microrganismos patogênicos e possui a capacidade de aderir às microvilosidades intestinais, promovendo a exclusão competitiva dos mesmos (ARMANDO et al., 2011).

Estudos realizados por Keller (2012) mostraram que cepas de *S. cerevisiae* apresentaram capacidade de produção de substâncias antimicrobianas, capacidade de autoagregação e coagregação com patógenos intestinais.

Quando um alimento possui ingredientes prebióticos e microrganismos probióticos simultaneamente, é denominado simbiótico, e possui características funcionais dos dois produtos, que sinergicamente beneficiarão a saúde do consumidor (RAIZEL et al., 2011).

### 3.5 Quantificação do crescimento celular

O pré-requisito necessário para o uso comercial dos probióticos é sua sobrevivência em número suficientemente elevado durante a produção e estocagem (ROSS et al., 2005; KAILASAPATHY, 2009). Assim, torna-se necessária a avaliação constante da quantificação de células durante todas as etapas do processo. A quantificação celular é realizada por técnicas definidas como diretas e indiretas. Na forma direta, conta-se o número de células presente na cultura, além de muitos métodos também permitirem a observação simultânea da morfologia celular. O tipo de microrganismo, as características do meio de cultivo e a viabilidade econômica são os fatores que determinarão o método utilizado para a quantificação. Em processos biológicos os métodos baseados na contagem total de microrganismos ou na observação microscópica têm sido reportados. Outros métodos amplamente empregados são densidade óptica (ou absorvância), peso seco de células, número mais provável de microrganismos, dentre outros (COMPRI-NARDY et al., 2009; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

A espectrofotometria é o método indireto de análise óptica mais utilizado em investigações biológicas e físico-químicas, por ser um método rápido e simples. Este método baseia-se na dispersão da luz ao passar por uma amostra. Quando um feixe de luz monocromática atravessa uma solução com moléculas absorventes, parte da luz é absorvida pela solução e o restante é transmitido (COMPRI-NARDY et al., 2009). Em 1852, Beer observou que a intensidade de um feixe de luz monocromática decresce exponencialmente, conforme a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente (VINADÉ; VINADÉ, 2005).

Assim, para obter a concentração da suspensão analisada, faz-se necessário o conhecimento da relação existente entre a turbidez e a concentração celular ou número de células viáveis. Essa relação pode ser obtida por meio de uma curva de correlação, a qual é construída utilizando como parâmetro um método direto de medida de concentração ou número de células viáveis *versus* a medida da densidade óptica (DO). O uso de espectrofotometria e curva de correlação é um método que está sendo expandido para a escala industrial e abrange as mais diversas análises (VINADÉ; VINADÉ, 2005).

O método direto mais comumente utilizado para quantificar a concentração de células em uma suspensão é a contagem de células em equipamento microscópio, realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer, que consiste em uma lâmina de vidro composta por nove quadrados que medem 1 mm<sup>2</sup> de área. Para realizar a estimativa da concentração de células, são realizadas contagens da quantidade de células encontradas em cada quadrado, divididas pelo respectivo volume, resultando na concentração de células por mm<sup>3</sup> (COMPRI-NARDY et al., 2009; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Outro método direto bastante utilizado é a contagem de microrganismos em placas. Este método visa determinar o tamanho de uma população microbiana, aplicando-se a técnica de diluição decimal seriada, que consiste em diluições sucessivas da amostra, com cada diluição sendo semeada em placas com meio de cultivo apropriado e incubada em condições de temperatura, tempo e atmosfera especificadas para o ensaio. A seguir, decorrido o tempo de incubação, é realizada a leitura das placas. O valor obtido em cada

placa é então multiplicado pelo fator de diluição e, assim, obtém-se o número real de colônias presentes na amostra inicial não diluída. A contagem de microrganismos em placas é de extrema importância para a grande maioria dos experimentos em microbiologia, uma vez que a quantidade de células em uma amostra não diluída é geralmente elevada, impossibilitando sua quantificação direta (COMPRI-NARDY et al., 2009; ALVES; GUIMARÃES, 2010).

Um dos parâmetros de maior importância em processos biotecnológicos industriais é o acompanhamento do crescimento microbiano, por concentração celular (biomassa). Sua exata quantificação é importante para modelar-se matematicamente o processo e seu comportamento cinético (HISS, 2001).

O método considerado como referência para a determinação da biomassa ( $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) é o gravimétrico, em que a concentração celular é quantificada através de seu peso seco. Porém, o tempo operacional exigido para sua completa realização é considerável, o que dificulta o acompanhamento do crescimento microbiano em tempo real no bioprocessamento, impossibilitando a realização de eventuais ações necessárias de correções no processo (HISS, 2001).

Logo, uma metodologia que permita a obtenção de resultados em apenas alguns minutos reveste-se da mais alta importância para o setor da biotecnologia. Assim, se houver proporcionalidade entre uma metodologia rápida e metodologias diretas, pode-se, por meio de uma curva de correlação, determinar a concentração da substância ou a viabilidade celular de amostras não conhecidas, o que permite o acompanhamento do crescimento do microrganismo em tempo real (SILVA et al., 1997).

A curva de correlação é obtida aplicando-se regressão linear entre pontos experimentais. Esta regressão gera uma equação linear do tipo  $y = ax + b$ , sendo  $y$  a variável dependente,  $x$  a variável independente,  $a$  a constante igual ao coeficiente angular da reta,  $b$  a constante igual ao coeficiente de regressão ou linear,  $R^2$  igual ao coeficiente de determinação e  $r$  igual ao coeficiente de correlação. Este último é utilizado com o objetivo de verificar se há relação entre duas variáveis e seu grau de associação. Alguns autores apontam a existência de alta correlação quando o valor de  $r$  é superior a 0,90, porém sabe-se da existência de correlação entre duas variáveis mesmo com valores inferiores ao mencionado (VINADÉ; VINADÉ, 2005; COMPRI-NARDY et al., 2009).

### **3.6 Otimização estatística**

O processo de industrialização deve ser reproduzível e economicamente viável. Portanto, se faz necessário otimizar as condições de fermentação e produção de biomassa, nos parâmetros físicos e químicos. Há vários componentes do meio e do metabolismo celular que interferem na multiplicação e crescimento celular, com possibilidade de que haja interações entre fatores. Ou seja, ao utilizar modelos unidimensionais haveria uma negligência na interação dos fatores, o que resultaria em uma falha ou fracasso experimental. Nesses casos, para avaliação de cada um dos fatores que afeta o resultado, seria necessário conduzir um experimento variando um fator por vez, mantendo fixas as outras variáveis. Porém, essa metodologia não avalia a interação entre as variáveis e



demanda uma quantidade muito alta de experimentos, aumentando os gastos com materiais e tempo de realização (TERRAZAS, 2012).

O termo *Design of Experiments* (DOE), traduzido como planejamento de experimentos ou delineamento experimental, refere-se a técnica utilizada para definir quais variáveis influenciam no comportamento da resposta e como utilizá-las a seu favor, o que permite obter melhor combinação das variáveis a fim de otimizar o produto final ou o processo, buscando a maior precisão estatística possível na resposta e o menor custo. É uma técnica de extrema importância para a indústria, pois seu emprego permite resultados mais confiáveis, economizando dinheiro e tempo (TERRAZAS, 2012, PETENETE, 2015).

Existem diversas técnicas de planejamento de experimentos, como tratamentos em blocos, quadrado latino, experimentos fatoriais, superfície de resposta, entre outros. Nos casos em que vários fatores necessitam ser estudados simultaneamente, os experimentos fatoriais são bastante utilizados. Nesse tipo de experimento, todas as combinações possíveis entre variáveis e níveis são consideradas, obtendo uma boa precisão dos resultados, mesmo quando é utilizado um pequeno número de variáveis e níveis, o que diminui bastante o custo e o tempo exigidos (BOX et al., 2005). Quando o experimento possui mais de três variáveis, uma alternativa econômica é a utilização de experimentos fatoriais fracionados, nos quais é realizado um arranjo entre as variáveis e as observações de forma que todos os fatores variem simultaneamente. Escolhendo as variáveis, é possível determinar o efeito de cada fator e o modo como cada uma das variáveis interage com as demais (HINKELMANN; KEMPTHORNE, 1963; RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Experimentos fatoriais são aqueles que apresentam combinações entre dois ou mais fatores, em que cada combinação é um tratamento. Seguindo um esquema fatorial completo, este será denotado por  $N^K$ , em que  $K$  é o número de fatores no estudo e  $N$ , o número de níveis de cada fator. Porém, à medida que aumenta o número de fatores, o número de ensaios cresce exponencialmente, o que muitas vezes inviabiliza sua utilização. Para isso, faz-se necessário o uso de delineamentos prévios com base em frações fatoriais, a exemplo do delineamento Plackett-Burman, que levam ao resultado da condição ótima dos ensaios, diminuindo consideravelmente a quantidade de ensaios a serem realizados (RODRIGUES; IEMMA, 2009; BARROS NETO et al., 2007).

O delineamento Plackett-Burman (PB) faz parte de planejamentos fatoriais fracionados, abrangendo matrizes para qualquer  $n$  múltiplo de quatro fatores ( $n=12, 16, 20, 24...$  ensaios). O PB usa uma abordagem linear e assume que não há interação entre os diferentes componentes da média na série de análise de variáveis. O PB é considerado uma concepção fatorial fracionária e o coeficiente de contraste ou efeito principal de uma tal concepção pode ser calculado como a diferença entre a média das respostas do experimento nos níveis mais altos (+1) e nos níveis mais baixos (-1). Esses delineamentos possuem colunas mutualmente ortogonais, contendo o mesmo número de sinais positivos e negativos. Esse planejamento funciona como uma ferramenta de triagem inicial para a metodologia de superfície de respostas (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

A metodologia PB é uma ferramenta de triagem e, com um pequeno número de ensaios, é possível determinar a influência de vários fatores, evitando extensos esquemas

fatoriais com informações mais completas. Porém, neste modelo, é suposta a ausência de interações (PLACKETT; BURMAN, 1946).

Quando se pretende avaliar como vários fatores, seus diferentes níveis e suas interações influenciam na resposta (experimentos de segunda ordem), outros modelos são mais apropriados, como o desenho de compostos centrais (CCD), o delineamento de Box-Behnken (BBD) e a metodologia de superfície de respostas (RSM). Esses experimentos de segunda ordem são mais utilizados para otimização estatística de múltiplas variáveis (BOX et al., 2005).

Os desenhos de Box-Behnken geralmente são mais eficientes em termos de número mínimo de área de execução requerida, quando comparados com os desenhos de compostos centrais. Isso se dá porque pontos de resposta do modelo BBD sempre estão dentro de um limite de operação seguro, ou seja, dentro dos níveis altos e baixos nominais, não contendo nenhum ponto de resposta nos vértices da região cúbica, o que evita valores discrepantes (muito altos ou muitos baixos) que possam aumentar o erro da resposta. Isso pode ser vantajoso quando as combinações de níveis dos fatores são inviáveis ou impossíveis de testar experimentalmente (ANUAR et al., 2013).

A RSM é uma prática comum na biotecnologia, sendo especialmente aplicada para otimizar as condições de cultivo de microrganismos, de forma a encontrar condições ideais e técnicas eficientes para otimização estatística, levando em conta cada fator separado e a interação entre eles (TERRAZAS, 2012).

A utilização dos experimentos de primeira ordem, como o PB, e de segunda ordem, como BBD e RSM, pode ser importante para a determinação de fatores e níveis que resultem em maior produção de biomassa de *S. cerevisiae*, o que viabiliza seu processo de industrialização para uso como probiótico e/ou adsorvente de micotoxinas. Entretanto, convém sempre lembrar que a condição otimizada do processo deve respeitar a fisiologia do microrganismo em questão, ser economicamente viável e de fácil aplicação industrial, além de conservar a viabilidade e estabilidade das células e suas propriedades probióticas (TERRAZAS, 2012).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram realizados no Laboratório de Micologia e Micotoxinas (LAMICO) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais.

Para execução do presente estudo, foram utilizadas duas cepas de *S. cerevisiae* com propriedades probióticas e adsorvente de micotoxina (LL74 e LL83), obtidas a partir da coleção de microrganismos do LAMICO. As cepas foram isoladas e caracterizadas por técnicas fisiológicas e moleculares em estudo anterior, além de previamente testadas e comprovadas suas propriedades probióticas e capacidade de adsorção de micotoxinas (KELLER, 2012).

### 4.1 Desenho experimental de seleção da fonte de carbono para maior produção de biomassa

Inicialmente foram testadas diferentes combinações de fontes de carbono (dextrose e sacarose) para uma escolha que resultasse em maior produção de biomassa e/ou economia no processo produtivo. Para isso foram testados três diferentes meios de cultivo:

- 1) caldo YPD (extrato de levedura 10 g·L<sup>-1</sup>, peptona de carne 20 g·L<sup>-1</sup> e dextrose 20 g·L<sup>-1</sup>);
- 2) caldo YPS (extrato de levedura 10 g·L<sup>-1</sup>, peptona de carne 20 g·L<sup>-1</sup> e sacarose 20 g·L<sup>-1</sup>);
- 3) caldo YPD+S (extrato de levedura 10 g·L<sup>-1</sup>, peptona de carne 20 g·L<sup>-1</sup>, dextrose 10 g·L<sup>-1</sup> e sacarose 10 g·L<sup>-1</sup>).

Frascos contendo 15 mL de cada meio foram incubados com agitação orbital a 150 rpm e 30°C, e foram recolhidas alíquotas em intervalos regulares (T0, T2, T4, T6, T8 e T10 – tempos em horas) até a saturação da curva. Para quantificação celular foram utilizados os métodos: espectrofotométrico – densidade óptica (DO) e contagem de UFC em placas dos respectivos meios de cultivo.

A leitura da DO foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 640 nm. A curva de crescimento microbiano foi construída a partir do valor da densidade óptica e expressa na forma logarítmica  $\ln(DO/DO_0)$ , em que  $DO_0$  é a leitura da densidade óptica no tempo zero e  $DO$  é leitura da densidade óptica no tempo  $t$ .

Para a contagem de UFC em placa fizeram-se diluições seriadas até a diluição 10<sup>-12</sup>. A inoculação foi realizada em superfície de placas de Petri contendo meio YPD. Após o plaqueamento, incubaram-se as placas em temperatura de 30°C por 24 horas. Decorrido o tempo de incubação, fez-se a leitura das placas. A contagem compreendeu entre 30 a 300 colônias. O resultado obtido foi multiplicado pelo fator da diluição. A curva referente ao crescimento microbiano foi construída com o valor da UFC·mL<sup>-1</sup> expresso na forma logarítmica  $\ln(\log_{10}UFC/\log_{10}UFC_0)$ , em que  $UFC_0$  é a UFC·mL<sup>-1</sup> no tempo zero e  $UFC$  é a UFC·mL<sup>-1</sup> no tempo  $t$ .

Com os resultados obtidas das curvas de crescimento, parâmetros cinéticos do processo fermentativo foram calculados como:

- Velocidades específicas máximas de crescimento ( $\mu_{\text{máx}}$ ), que foram determinadas pela construção do gráfico  $\text{Ln } X/X_0$  em função do tempo, obtendo-se o valor de  $\mu_{\text{máx}}$  pelo coeficiente angular da reta ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento, conforme a equação:

$$\text{Ln } (X/X_0) = \mu_{\text{máx}} \cdot t$$

- Tempos de geração ( $t_d$ ), caracterizados como o tempo necessário para o microrganismo dobrar o valor da concentração celular, calculados conforme a equação:

$$\text{Ln } \frac{2X}{X} = \mu_{\text{máx}} (t_g) \quad \text{logo,} \quad \mu_{\text{máx}} = \text{Ln } \frac{\text{Ln}2}{t_g}$$

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados obtidos de DO e UFC foram submetidos à análise estatística por meio da análise de variância (ANOVA) para comparação entre os diferentes meios de cultivo (software BioEstat, versão 5.3). Todos os dados de UFC foram transformados usando a função logarítmica  $\log_{10} (x + 1)$  antes da ANOVA. Foram ajustados modelos de regressão linear simples para avaliar a correlação entre DO e UFC para cada cepa testada de *S. cerevisiae*. Já a comparação das curvas de correlação entre cepas (LL74 vs. LL83) foi realizada verificando-se a sobreposição entre os intervalos de confiança das curvas. Para avaliar a associação entre as variáveis DO e UFC, aplicou-se o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância considerado nas análises estatísticas foi de 5%.

## 4.2 Desenhos experimentais de interações das variáveis sobre a produção de biomassa

Foram utilizados desenhos experimentais de dois tipos: desenho de seleção e desenhos de otimização. A resposta analisada foi a densidade óptica. Para o desenho de seleção, utilizou-se o planejamento experimental de Plackett-Burman para avaliar os efeitos das variáveis independentes sobre o crescimento da levedura em questão, com o efeito de cada resposta avaliado pela equação a seguir:

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i}, \quad i=1,2,3\dots k$$

sendo  $x_i$  o valor codificado da variável  $i$ ,  $X_i$  seu real valor,  $X_0$  o valor que adota a variável no ponto central (nível 0) e  $\Delta X_i$  a variação do parâmetro entre o nível zero e o nível consecutivo a este (superior ou inferior). As variáveis independentes analisadas foram sacarose (g/L), peptona (g/L), extrato de levedura (g/L), velocidade de agitação (rpm) e temperatura (°C) de incubação de cada levedura.

Para os desenhos de otimização foram empregados o planejamento experimental de Box-Behnken e metodologia de superfície de resposta; as variáveis selecionadas anteriormente foram analisadas de acordo com a seguinte equação:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{j=2}^k \sum_{i=1}^{j-1} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2$$

sendo  $y$  a resposta observada,  $\beta_0$  o coeficiente independente,  $\beta_i$  o  $i$ -ésimo coeficiente linear,  $\beta_{ij}$  o  $i,j$ -ésimo coeficiente interativo e  $\beta_{ii}$  o  $i$ -ésimo coeficiente quadrático.

Ao final, foi determinada a concentração ideal de cada uma das variáveis de forma a maximizar a resposta (maior DO = maior biomassa). No delineamento Plackett-Burman, os efeitos principais foram calculados utilizando o modelo de regressão linear com o *software* Action Stat versão 3.2, um suplemento para Microsoft® Excel. Já no delineamento Box-Behnken, os dados foram submetidos à análise estatística do modelo, por meio do *software* gratuito *Essential Experimental Design*, um suplemento para Microsoft® Excel (STEPPAN et al., 1999). O melhor valor de produção de biomassa foi estimado usando a função Solver do Microsoft® Excel. O nível de significância considerado nas análises estatísticas foi de 5%.

### **4.3 Comparação das curvas de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em meio otimizado e não otimizado**

Para avaliar o efeito da otimização estatística foram realizadas curvas de crescimento de *S. cerevisiae* tendo como substratos os meios de cultivo otimizados para cada uma das cepas testadas em comparação com a formulação convencional do caldo YPD. Os dados obtidos foram analisados no programa Stata® release 12 (STATA CORP, 2011). A normalidade e a homocedasticidade foram verificadas antes da ANOVA pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Cochran, respectivamente. Os resultados de DO foram analisados por meio da ANOVA e do teste  $t$  de Student, tendo sido realizadas comparações de médias entre tempos para cada tratamento, e entre o tratamento e seu respectivo controle. O nível de significância para todas as análises estatísticas foi de 5%.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Desenho experimental de seleção da fonte de carbono para maior produção de biomassa

Inicialmente foi testada a influência de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento das cepas estudadas (LL74 e LL83). As fontes escolhidas foram sacarose e dextrose, por serem facilmente encontradas e economicamente viáveis para produção industrial. Foram construídas curvas de crescimento de cada uma das leveduras nos diferentes meios de cultivo:

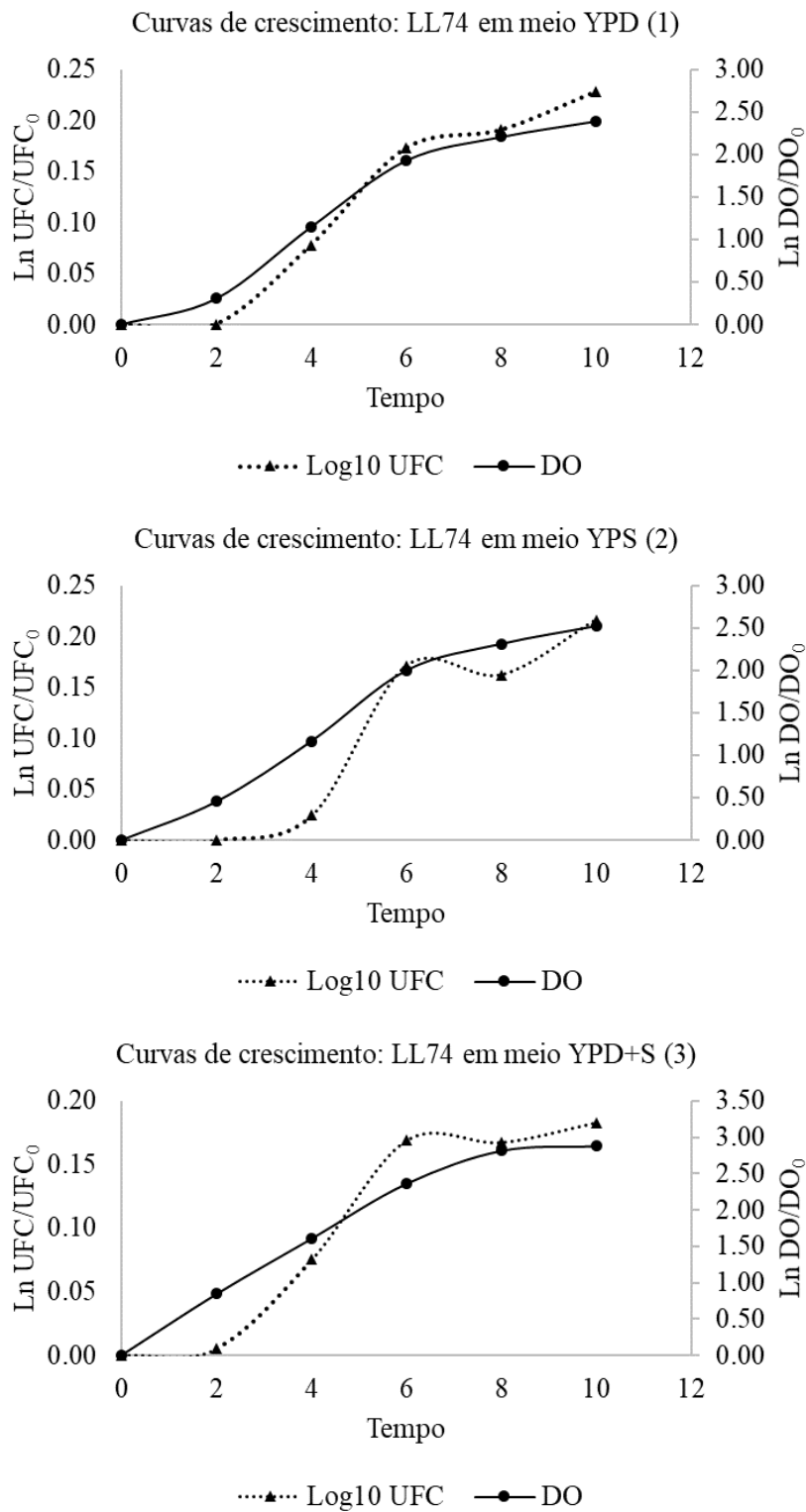
- caldo YPD;
- caldo YPS;
- caldo YPD+S.

Foram recolhidas alíquotas dos cultivos, de duas em duas horas, até a saturação da curva, para medição de DO e UFC. As curvas de crescimento de cada uma das leveduras nos diferentes meios de cultivo se encontram nas Figuras 3 e 4.

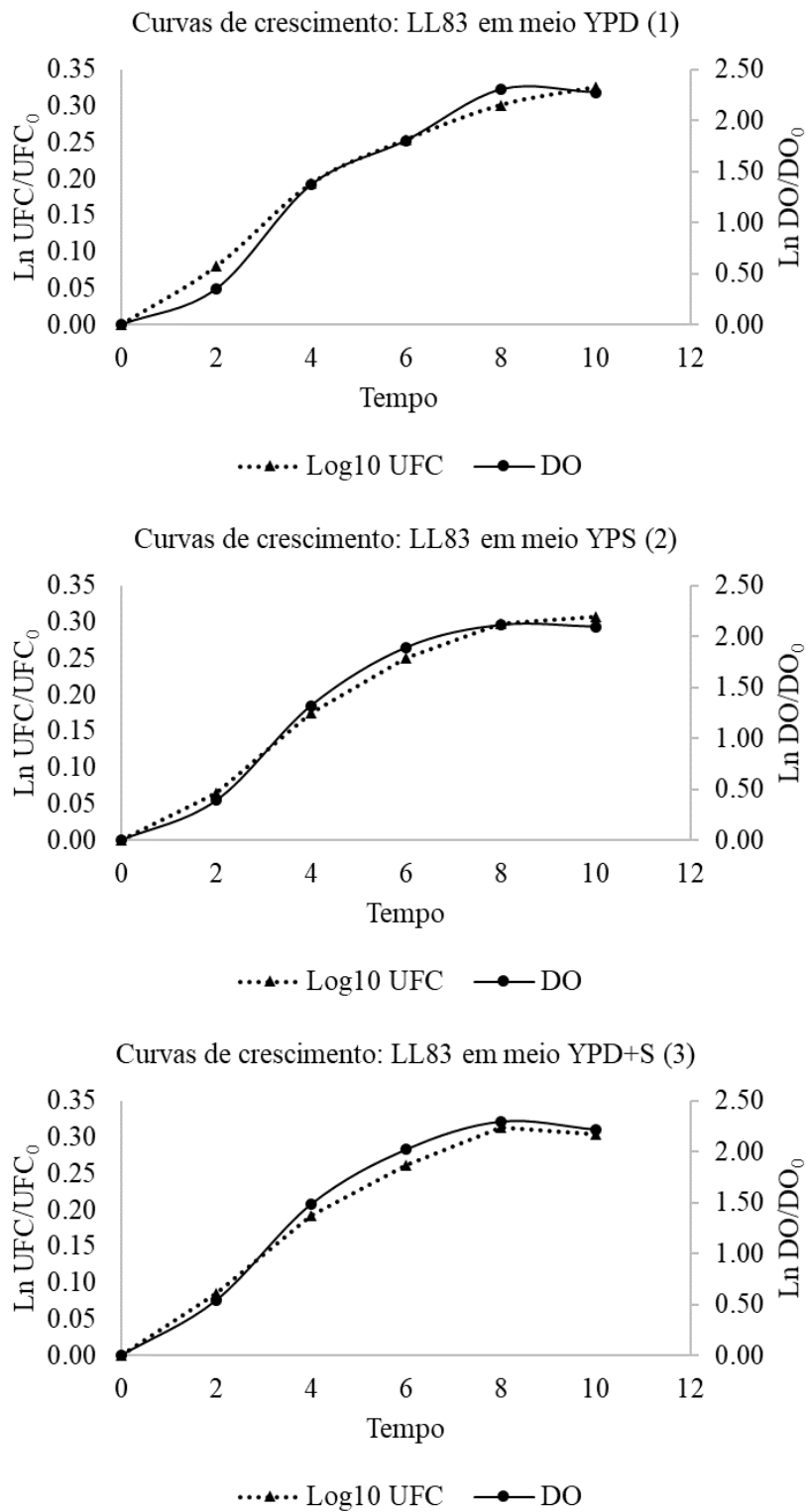
Não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) para o crescimento das leveduras nos diferentes meios de cultura (YPD 100% dextrose, YPS 100% sacarose e YPD+S 50% dextrose e 50% sacarose).

*Saccharomyces cerevisiae* possui a capacidade de utilizar diversas fontes de açúcares para seu desenvolvimento conseguindo adaptar seu metabolismo. A levedura possui os genes HXT1 e HXT7, que codificam permeases responsáveis pelo transporte de hexoses (dextrose, frutose e manose) para o interior da célula fúngica. Além do transporte dos monossacarídeos por difusão facilitada, há o transporte de dissacarídeos pelo co-transporte de açúcares com íons  $H^+$ , porém há gasto de energia ao ser utilizada essa via. Como via alternativa, a sacarose pode ser hidrolisada fora da célula através da invertase, enzima produzida pelas leveduras capazes de separar a sacarose, em glicose e frutose, permitindo absorver as duas moléculas pelo método de difusão facilitada, evitando o gasto de energia (ARMANDO et al., 2011; DÁRIO, 2012). As cepas de *Saccharomyces cerevisiae* estudadas foram capazes de utilizar ambas as fontes de carbono, o que foi confirmado pelo crescimento em todos os meios de cultivo testados que continham dextrose e/ou sacarose. Após pesquisa de mercado, a sacarose foi escolhida como fonte de carbono para a continuidade do trabalho, por ser mais facilmente encontrada e possuir, em geral, preço mais acessível que a dextrose.

**Figura 3** - Curvas de crescimento de *S. cerevisiae* LL74 nos diferentes meios de cultivo testados para maior produção de biomassa.



**Figura 4** - Curvas de crescimento de *S. cerevisiae* LL83 nos diferentes meios de cultivo testados para maior produção de biomassa.





A partir dos resultados das curvas de crescimento celular, foram construídos os gráficos  $\ln(X/X_0)$  versus tempo e foram determinados os valores de  $\mu_{\text{máx}}$  ajustada aos dados experimentais na fase exponencial de crescimento. Também foram calculados os tempos de geração (Tabela 1).

**Tabela 1** - Valores das velocidades específicas de crescimento ( $\mu$ ) durante a fase exponencial (4 a 8 h) e tempos de geração para as cepas *S. cerevisiae* LL74 e LL83 nos diferentes meios de cultivo testados.

Cepas	Meio de cultivo	$\mu_{\text{máx}}$ (h <sup>-1</sup> )	$t_g$ (h)
LL74	YPD	0,265	2,62
	YPS	0,286	2,42
	YPD+S	0,303	2,29
LL83	YPD	0,233	2,97
	YPS	0,198	3,50
	YPD+S	0,203	3,41

$\mu_{\text{máx}}$  = velocidade específica máxima de crescimento;  $t_g$  = tempo de geração.

Nossos resultados estão de acordo com Alves (1996), que relatou valores de  $\mu_{\text{máx}}$  entre 0,19 e 0,64 h<sup>-1</sup> para *S. cerevisiae*. A cepa LL74 apresentou maior velocidade específica máxima de crescimento e menor tempo de geração quando comparada a LL83, o que indica que é melhor em produção de biomassa, produzindo maior quantidade de células em menor tempo. O estudo da cinética de crescimento microbiano permite a análise dos pontos críticos, determinação da vida útil e análise de riscos do processo, sendo de extrema importância para a indústria (HOMEM et al., 2017).

Após a determinação da  $\mu_{\text{máx}}$  e  $t_g$ , foram ajustados modelos de regressão linear simples para avaliar a associação entre DO (medição indireta) e UFC ( $\log_{10}$ ) (medição direta) para cada cepa testada de *S. cerevisiae*. Como resultado, foram obtidos coeficientes de determinação  $R^2 = 0,846$  para LL74 e 0,911 para LL83, o que indica que os valores de DO versus UFC ( $\log_{10}$ ) apresentaram boa linearidade. Logo a seguir, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson para avaliar a correlação entre as medidas de DO e de UFC ( $\log_{10}$ ) de cada cepa testada. Como resultado, foram obtidos coeficientes de correlação  $r = 0,920$  para LL74 ( $p < 0,0001$ ) e 0,955 para LL83 ( $p < 0,0001$ ), indicando alta correlação entre as formas de medição. Diz-se que existe correlação entre duas variáveis quando as alterações sofridas por uma delas são acompanhadas por modificações nas outras. Ou seja, no caso de duas variáveis  $x$  e  $y$ , os aumentos (ou diminuições) em  $x$  correspondem a aumentos (ou diminuições) em  $y$ .

Assim, pelas equações dos modelos de regressão linear de cada cepa (Tabela 2), torna-se possível mensurar o valor de UFC a partir das leituras de valores da DO. A comparação das curvas de correlação entre cepas (LL74 vs. LL83) foi realizada verificando-se a sobreposição entre os intervalos de confiança das curvas. Nota-se que não há sobreposição nos intervalos de confiança 95% dos coeficientes da reta, o que indica que cada cepa teve um comportamento individual de crescimento.

**Tabela 2** - Equações da reta de regressão linear (DO e  $\log_{10}$ UFC) com respectivos intervalos de confiança para o crescimento das cepas *S. cerevisiae* LL74 e LL83.

Cepas	Equação	IC 95% (a)	IC 95% (b)
LL74	$Y = 16,8395 + 3,9984x$	17,460 a 18,135	2,240 a 2,844
LL83	$Y = 17,4602 + 2,5037x$	16,483 a 17,196	3,650 a 4,346

$x$  = valor em DO

$Y$  = valor em UFC

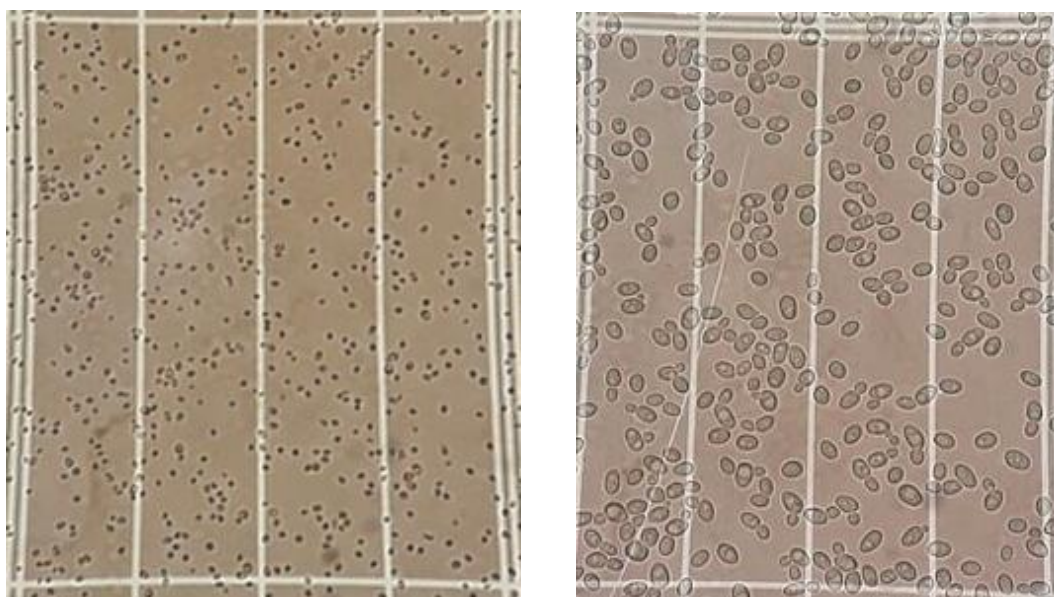
IC = intervalo de confiança

a = coeficiente linear ou intercepto da reta

b = coeficiente angular ou de regressão

Segundo Moreira et al. (2013), dependendo do isolamento, as linhagens de *S. cerevisiae* podem apresentar diferenças morfológicas e de eficiência fermentativa. A diferença no comportamento individual de crescimento pode ser explicada pela diferença morfológica entre elas, como pode ser observado na Figura 5.

**Figura 5** - Microscopia 400 $\times$ , campo C da câmara de Neubauer, das leveduras *S. cerevisiae* LL74 (esquerda) e LL83 (direita).



Fonte: arquivo pessoal.

Dadas as alterações evolutivas causadas pela adaptação de cada levedura a sua fonte principal de nutriente, cada cepa pode apresentar morfologia e comportamento diferentes influenciando na quantidade de nutrientes necessário para a manutenção da célula e em sua curva de crescimento. Leveduras isoladas de panificação, a exemplo da levedura LL83, apresentam alta atividade de invertases e também vários genes *SUC* no genoma, este gene é responsável pela expressão das invertases extra e intracelulares. Por outro lado, as linhagens utilizadas na produção de destilados não apresentam amplificação no gene *SUC*, uma vez que a glicose e a frutose são suas principais fontes de açúcar a

serem fermentados. As invertases são responsáveis pela hidrólise e aproveitamento da sacarose como fonte de nutrientes. Assim como o gene *SUC* sofre influência da adaptação da levedura ao meio em que esta se encontra, outras permeases e genes codificadores de proteínas transportadoras também sofrem, promovendo essa diversidade em tamanho e necessidade de nutrientes nas diferentes cepas de leveduras (DÁRIO, 2012).

## 5.2 Desenhos experimentais de interações das variáveis sobre a produção de biomassa

Após a escolha da fonte de carbono e da construção das curvas de correlação entre UFC e DO, foi realizado delineamento Plackett-Burman (PB) para avaliação do efeito de cinco variáveis (concentração de sacarose, concentração de peptona, concentração de extrato de levedura, velocidade de agitação e temperatura de incubação), visando selecionar as variáveis mais importantes para a otimização da produção de biomassa (Tabela 3). Os níveis das variáveis foram escolhidos com base nas variações de meios encontrados na literatura, sempre respeitando a fisiologia da levedura, evitando valores incompatíveis com a viabilidade celular.

**Tabela 3** - Desenho de seleção de Plackett-Burman.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Sacarose (g/L)	20	35	50
Peptona (g/L)	10	20	30
Extrato de levedura (g/L)	10	20	30
Velocidade (rpm)	100	200	300
Temperatura (°C)	30	32	34

As matrizes de Plackett-Burman com dados codificados e respectivas respostas (DO) estão apresentadas na Tabela 4 para LL74 e na Tabela 5 para LL83.

**Tabela 4** - Matriz Plackett-Burman com dados codificados para as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL74.

(continua)

Exp #	Sac <sup>a</sup>	Pep <sup>b</sup>	ExL <sup>c</sup>	Vel <sup>d</sup>	Temp <sup>e</sup>	Resp <sup>f</sup>
1	20	30	30	300	30	1,253
2	20	10	10	300	34	1,154
3	20	10	10	100	30	1,480
4	20	30	30	100	34	1,688
5	20	30	10	100	30	1,382
6	20	10	30	300	34	1,494
7	35	20	20	200	32	1,401

**Tabela 4** - Matriz Plackett-Burman com dados codificados para as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL74.

(continuação)

8	35	20	20	200	32	1,305
9	35	20	20	200	32	1,422
10	50	30	30	100	34	1,582
11	50	10	30	300	30	0,942
12	50	30	10	300	30	1,374
13	50	10	30	100	30	1,481
14	50	10	10	100	34	1,661
15	50	30	10	300	34	1,098

#Código do ensaio. <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona. <sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação. <sup>f</sup>Resposta em densidade óptica.

**Tabela 5** - Matriz Plackett-Burman com dados codificados para as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL83.

Exp #	Sac <sup>a</sup>	Pep <sup>b</sup>	ExL <sup>c</sup>	Vel <sup>d</sup>	Temp <sup>e</sup>	Resp <sup>f</sup>
1	20	10	10	100	30	1,750
2	20	30	10	100	30	1,792
3	20	30	30	100	34	1,665
4	20	10	30	300	34	1,197
5	20	10	10	300	34	1,493
6	20	30	30	300	30	1,598
7	35	20	20	200	32	1,837
8	35	20	20	200	32	1,815
9	35	20	20	200	32	1,596
10	50	10	10	100	34	1,663
11	50	10	30	100	30	1,887
12	50	10	30	300	30	1,536
13	50	30	10	300	30	1,649
14	50	30	10	300	34	1,558
15	50	30	30	100	34	1,461

#Código do ensaio. <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona. <sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação. <sup>f</sup>Resposta em densidade óptica.

Esse delineamento visa a seleção de variáveis permitindo seu estudo simultâneo. Isso diminui o número de ensaios que deveriam ser realizados, sendo necessária a realização de três repetições na condição de ponto central (RODRIGUES; IEMMA, 2009).

Os resultados da modelagem de PB podem ser vistos na Tabela 6 para LL74 e na Tabela 7 para LL83.

**Tabela 6** - Resultados<sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Plackett-Burman aplicado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* LL74.

	Efeitos	Estimativa	Valor- <i>p</i>
<b>Intercepto</b>		2768,070	
<b>Sac<sup>a</sup></b>	-157,965	-78,982	1,903E-08*
<b>Pep<sup>b</sup></b>	-316,064	-158,032	1,187E-09*
<b>Lev<sup>c</sup></b>	-526,631	-263,315	1,541E-10*
<b>Vel<sup>d</sup></b>	10,540	5,270	0,0008*
<b>Temp<sup>e</sup></b>	-0,138	-0,069	0,912

\*  $p < 0,05$  #Resultados arredondados. <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona. <sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação.

**Tabela 7** - Resultados<sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Plackett-Burman aplicado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* LL83.

	Efeitos	Estimativa	Valor- <i>p</i>
<b>Intercepto</b>		1,251	
<b>Sac<sup>a</sup></b>	-0,252	-0,126	1,887E-07*
<b>Pep<sup>b</sup></b>	-0,216	-0,108	3,462E-07*
<b>Lev<sup>c</sup></b>	-0,339	-0,169	5,732E-08*
<b>Vel<sup>d</sup></b>	-0,003	-0,001	0,346
<b>Temp<sup>e</sup></b>	0,171	0,085	8,742E-07*

\*  $p < 0,05$  #Resultados arredondados. <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona. <sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação.

Utilizando os dados do delineamento PB, podemos observar que todas as variáveis foram estatisticamente significativas, com exceção da temperatura de incubação para LL74 e a velocidade de agitação para a LL83, nesse experimento. Como todas as variáveis demonstraram ser significativas para pelo menos uma das cepas testadas, todas foram selecionadas para os ensaios de otimização dos níveis ótimos, objetivando a resposta máxima.

Para isso foi utilizado o delineamento de Box-Behnken, com cinco variáveis, matriz fatorial codificada em (-1), (0) e (+1) e cinco pontos centrais, resultando em 45 ensaios. Os valores foram ajustados de acordo com os resultados obtidos no PB (BOX et al., 2005).

**Tabela 8** - Desenho de otimização de Box-Behnken.

Variáveis	Níveis		
	-1	0	+1
Sacarose (g/L)	10	30	50
Peptona (g/L)	4	17	30
Extrato de levedura (g/L)	2	16	30
Velocidade (rpm)	100	150	200
Temperatura (°C)	30	33	36

As matrizes de Box-Behnken com dados codificados e respectivas respostas (DO) estão apresentadas na Tabela 9 para LL74 e na Tabela 10 para LL83.

**Tabela 9** - Matriz Box-Behnken com as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL74.

(continua)

Exp #	Sac <sup>a</sup>	Pep <sup>b</sup>	ExL <sup>c</sup>	Vel <sup>d</sup>	Temp <sup>e</sup>	Resp <sup>e</sup>
1	10	17	16	200	33	1,259
2	10	17	2	150	33	1,258
3	10	30	16	150	33	1,164
4	10	17	30	150	33	1,088
5	10	4	16	150	33	1,178
6	10	17	16	100	33	1,089
7	10	17	16	150	30	1,040
8	10	17	16	150	36	1,161
9	30	17	2	150	30	1,037
10	30	30	16	150	36	1,120
11	30	17	16	200	36	1,085
12	30	17	16	150	33	1,185
13	30	17	30	200	33	1,169
14	30	4	16	100	33	1,129
15	30	4	30	150	33	1,091
16	30	4	16	150	36	1,256
17	30	17	16	150	33	1,223
18	30	30	30	150	33	1,007
19	30	17	16	150	33	1,162
20	30	17	16	150	33	1,156
21	30	17	2	150	36	1,227
22	30	17	2	100	33	1,125
23	30	17	2	200	33	1,277

**Tabela 9** - Matriz Box-Behnken com as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL74.

(continuação)

24	30	17	30	100	33	1,056
25	30	30	2	150	33	1,142
26	30	17	30	150	36	1,081
27	30	17	30	150	30	0,951
28	30	4	16	150	30	1,105
29	30	17	16	200	30	1,074
30	30	4	16	200	33	1,270
31	30	30	16	100	33	1,062
32	30	30	16	150	30	1,013
33	30	17	16	100	36	1,139
34	30	4	2	150	33	1,192
35	30	30	16	200	33	1,226
36	30	17	16	100	30	1,078
37	30	17	16	150	33	0,998
38	50	17	16	100	33	1,086
39	50	17	2	150	33	1,174
40	50	30	16	150	33	1,143
41	50	17	16	150	30	0,964
42	50	4	16	150	33	1,157
43	50	17	30	150	33	1,056
44	50	17	16	150	36	1,144
45	50	17	16	200	33	1,228

<sup>#</sup>Código do ensaio. <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona. <sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação. <sup>f</sup>Resposta em densidade óptica.

**Tabela 10** - Matriz Box-Behnken com as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL83.

(continua)

Exp #	Sac <sup>a</sup>	Pep <sup>b</sup>	ExL <sup>c</sup>	Vel <sup>d</sup>	Temp <sup>e</sup>	Resp <sup>e</sup>
1	10	17	16	100	33	1,224
2	10	30	16	150	33	1,083
3	10	17	2	150	33	1,367
4	10	17	16	200	33	1,218
5	10	17	16	150	36	1,168
6	10	4	16	150	33	1,187
7	10	17	16	150	30	1,033

**Tabela 10** - Matriz Box-Behnken com as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL83.

(continua)

8	10	17	30	150	33	1,117
9	30	30	16	150	30	1,009
10	30	4	16	200	33	1,403
11	30	17	2	150	36	1,097
12	30	17	30	100	33	1,274
13	30	30	16	100	33	1,213
14	30	17	2	100	33	1,181
15	30	17	16	150	33	1,346
16	30	4	16	100	33	1,321
17	30	17	30	200	33	1,315
18	30	17	2	200	33	1,225
19	30	4	30	150	33	1,049
20	30	17	16	150	33	1,391
21	30	30	2	150	33	1,104
22	30	17	16	200	36	1,200
23	30	30	16	200	33	1,312
24	30	4	2	150	33	1,085
25	30	4	16	150	30	1,193
26	30	17	16	200	30	1,167
27	30	17	16	100	36	1,321
28	30	17	16	100	30	1,137
29	30	17	16	150	33	1,337
30	30	17	30	150	36	1,265
31	30	17	16	150	33	1,308
32	30	17	30	150	30	1,036
33	30	4	16	150	36	1,333
34	30	17	2	150	30	0,802
35	30	30	30	150	33	1,228
36	30	17	16	150	33	1,401
37	30	30	16	150	36	1,253
38	50	17	16	150	30	0,991
39	50	17	2	150	33	1,134
40	50	17	16	200	33	1,344
41	50	30	16	150	33	1,293
42	50	17	30	150	33	1,292



**Tabela 10** - Matriz Box-Behnken com as variáveis estudadas e respectivas respostas de *S. cerevisiae* LL83.

(continuação)

43	50	17	16	150	36	1,197
44	50	17	16	100	33	1,273
45	50	4	16	150	33	1,361

#Código do ensaio. <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona. <sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação. <sup>f</sup>Resposta em densidade óptica.

Os resultados do BBD podem ser vistos na Tabela 11 para LL74 e na Tabela 12 para LL83. Os valores de  $R^2$  e  $R^2$  ajustado para a LL74 foram 0,815 e 0,654 e para a LL83 foram 0,759 e 0,558, respectivamente.

**Tabela 11** - Resultados<sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Box-Behnken aplicado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* LL74.

(continua)

Fonte	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	F Signif.	Graus de liberdade	
Regressão	0,231	0,011	5,056	0,0001	20	
Resíduos	0,052	0,002			23	
Falta de ajuste	0,049	0,002	2,696	0,225	20	
Erro puro	0,002	0,0009			3	
Total	0,283				43	
	Efeito	Valor-p	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior	Estatística t
Média	-9,113	0,001	2,436	-14,15	-4,073	-3,741
Sac <sup>a</sup>	-0,006	0,647	0,014	-0,035	0,022	-0,464
Pep <sup>b</sup>	0,008	0,709	0,021	-0,036	0,052	0,378
ExL <sup>c</sup>	0,015	0,460	0,019	-0,026	0,056	0,751
Vel <sup>d</sup>	0,004	0,476	0,005	-0,007	0,016	0,725
Temp <sup>e</sup>	0,579	0,0002*	0,132	0,305	0,853	4,372
Sac*Sac	-3,651E-05	0,415	4,394E-05	-0,0001	5,438E-05	-0,831
Pep*Pep	-5,387E-05	0,609	0,0001	-0,0002	0,0001	-0,518
ExL*ExL	-0,0001	0,051	8,967E-05	-0,0003	1,300E-06	-2,054
Vel*Vel	-4,083E-07	0,954	7,030E-06	-1,495E-05	1,413E-05	-0,058
Temp*Temp	-0,008	0,0003*	0,001	-0,012	-0,004	-4,216
Sac*Pep	-3,878E-16	1,000	9,185E-05	-0,0001	0,0001	-4,22E-12
Sac*ExL	4,642E-05	0,591	8,529E-05	-0,0001	0,0002	0,544
Sac*Vel	-7E-06	0,772	2,388E-05	-5,640E-05	4,240E-05	-0,293
Sac*Temp	0,0002	0,543	0,0003	-0,0005	0,001	0,618

**Tabela 11** - Resultados<sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Box-Behnken aplicado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* LL74.

(continuação)

Pep*ExL	-4,670E-05	0,725	0,0001	-0,0003	0,0002	-0,356
Pep*Vel	8,846E-06	0,812	3,674E-05	-6,715E-05	8,484E-05	0,241
Pep*Temp	-0,0002	0,649	0,0006	-0,001	0,0009	-0,461
ExL*Vel	-1,392E-05	0,687	3,411E-05	-8,450E-05	5,664E-05	-0,408
ExL*Temp	-0,0003	0,536	0,0005	-0,001	0,0008	-0,628
Vel*Temp	-8,333E-05	0,606	0,0001	-0,0004	0,0002	-0,523

\*  $p < 0,05$  <sup>#</sup>Resultados arredondados <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona.

<sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação.

**Tabela 14** - Resultados<sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Box-Behnken aplicado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* LL83.

(continua)

Fonte	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F	F Signif.	Graus de liberdade	
Regressão	0,552	0,027	3,783	0,001	20	
Resíduos	0,175	0,007			24	
Falta de ajuste	0,169	0,008	5,628	0,052	20	
Erro puro	0,006	0,001			4	
Total	0,728				44	

	Efeito	Valor-p	Erro padrão	Limite inferior	Limite superior	Estatística t
Média	-19,61	8,791E-05	4,168	-28,21	-11,01	-4,705
Sac <sup>a</sup>	-0,007	0,769	0,025	-0,059	0,044	-0,296
Pep <sup>b</sup>	-0,018	0,635	0,038	-0,097	0,060	-0,481
ExL <sup>c</sup>	0,021	0,548	0,035	-0,051	0,095	0,609
Vel <sup>d</sup>	0,007	0,468	0,010	-0,013	0,028	0,737
Temp <sup>e</sup>	1,209	1,757E-05*	0,226	0,742	1,676	5,341
Sac*Sac	-0,0001	0,033*	7,489E-05	-0,0003	-1,392E-05	-2,250
Pep*Pep	-0,0003	0,077	0,0001	-0,0006	3,852E-05	-1,847
ExL*ExL	-0,0006	0,0002*	0,0001	-0,0009	-0,0003	-4,228
Vel*Vel	1,238E-06	0,919	1,198E-05	-2,349E-05	2,597E-05	0,103
Temp*Temp	-0,017	2,187E-05*	0,003	-0,024	-0,010	-5,254
Sac*Pep	3,461E-05	0,835	0,0001	-0,0003	0,0003	0,211
Sac*ExL	0,0003	0,025*	0,0001	4,934E-05	0,0006	2,387
Sac*Vel	1,925E-05	0,656	4,272E-05	-6,893E-05	0,0001	0,451
Sac*Temp	0,0002	0,682	0,0007	-0,001	0,001	0,415
Pep*ExL	0,0002	0,358	0,0002	-0,0002	0,0007	0,936

**Tabela 14** - Resultados<sup>#</sup> da ANOVA do modelo de Box-Behnken aplicado para produção de biomassa de *S. cerevisiae* LL83.

(continuação)

Pep*Vel	6,538E-06	0,922	6,573E-05	-0,0001	0,0001	0,099
Pep*Temp	0,0006	0,549	0,001	-0,001	0,002	0,609
ExL*Vel	-1,071E-06	0,986	6,103E-05	-0,0001	0,0001	-0,017
ExL*Temp	-0,0003	0,703	0,001	-0,002	0,00171	-0,386
Vel*Temp	-0,0002	0,386	0,0002	-0,0008	0,0003	-0,884

\*  $p < 0,05$  <sup>#</sup>Resultados arredondados <sup>a</sup>Concentração de sacarose. <sup>b</sup>Concentração de peptona. <sup>c</sup>Concentração de extrato de levedura. <sup>d</sup>Velocidade de agitação. <sup>e</sup>Temperatura de incubação.

Uma das formas de avaliar a qualidade do ajuste do modelo é pelo coeficiente de determinação  $R^2$ . Basicamente, esse coeficiente indica quanto o modelo foi capaz de explicar os dados coletados. O coeficiente é definido como a razão entre a soma de quadrados da regressão e a soma de quadrados total. O  $R^2$  é, portanto, uma medida descritiva da qualidade do ajuste obtido. Em geral, referimo-nos ao  $R^2$  como a quantidade de variabilidade nos dados que é explicada pelo modelo de regressão ajustado. Os valores  $R^2$  foram 0,815 e 0,759 para LL74 e LL83, respectivamente. O que indica que, para LL74, o modelo explica mais que 81% dos dados experimentais e para a LL83, mais que 75%. O  $R^2$  ajustado corrige esse valor para o tamanho da amostra e para a quantidade de termos do modelo; com isso, o valor do  $R^2$  ajustado vai para 0,654 (65%) e 0,558 (55%) para LL74 e LL83, respectivamente, demonstrando que, ainda assim, o modelo possui uma boa correlação entre os valores observados e os valores previstos.

Os desenhos de Box-Behnken geralmente são mais eficientes em termos de número mínimo de área de execução requerida, quando comparados com o CCD. Isso se dá porque pontos de resposta do modelo BBD sempre estão dentro de um limite de operação seguro, ou seja, dentro dos níveis altos e baixos nominais, não contendo nenhum ponto de resposta nos vértices da região cúbica. Isso pode ser vantajoso quando as combinações de níveis dos fatores são inviáveis ou impossíveis de testar experimentalmente (ANUAR et al., 2013).

Podemos observar que para a cepa LL74 houve diferença estatística significativa ( $p < 0,05$ ) na variável temperatura (efeitos linear e quadrático), ao passo que na cepa LL83 observamos diferença estatística nas variáveis sacarose (efeito quadrático), extrato de levedura (efeito quadrático) e temperatura (efeitos linear e quadrático). Também foi observado efeito significativo da interação sacarose e extrato de levedura, e o valor para esta estimativa se mostrou positivo, portanto, quanto maior for o aumento nos níveis destas variáveis, maior será a resposta em produção de biomassa.

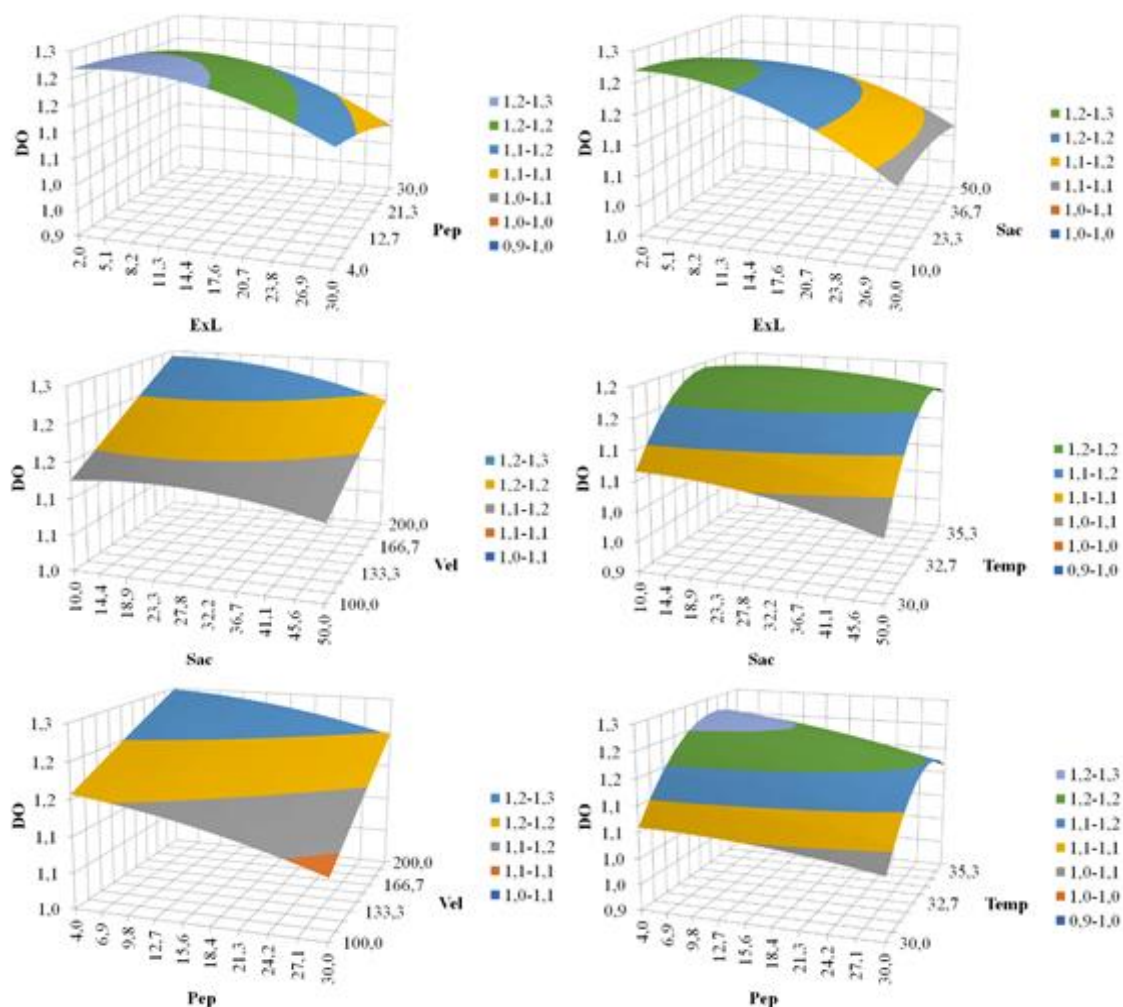
O modelo PB avalia a interação de cada uma das variáveis separadamente, enquanto o modelo BBD avalia também a interação entre diferentes variáveis, o que justifica encontrar diferença estatística em variáveis diferentes quando comparamos os modelos PB e BBD (BOX et al., 2005; RODRIGUES; IEMMA, 2009). Cabe lembrar que o modelo PB funciona apenas para selecionar a variável a ser utilizada e, caso não

apresente diferença estatística, seus valores mínimos e máximos podem ser ajustados para melhor atender ao modelo, em vez de ser apenas descartada.

Em seguida foram realizados os estudos de superfície de resposta, que consistem em fornecer gráficos de contorno que ilustram a forma pela qual os fatores influenciam a variável resposta. As técnicas de superfície de resposta são ferramentas matemáticas muito úteis quando estamos interessados na otimização de um processo em que temos a influência de vários fatores em uma variável resposta, ou seja, os modelos de superfície de resposta podem ser explorados para determinar condições ótimas para trabalhar. Nas Figuras 6 e 7 temos as representações gráficas das interações das variáveis sobre o crescimento das leveduras *S. cerevisiae* LL74 e LL83, respectivamente.

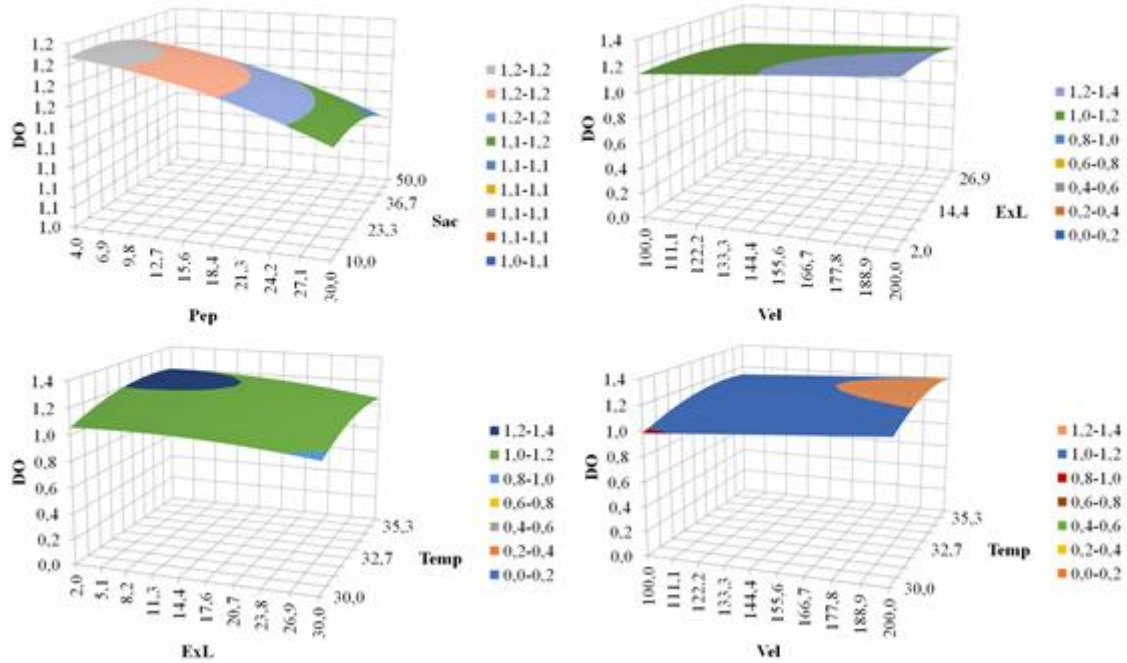
**Figura 6** - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das variáveis sobre o crescimento de *S. cerevisiae* LL74.

(continua)



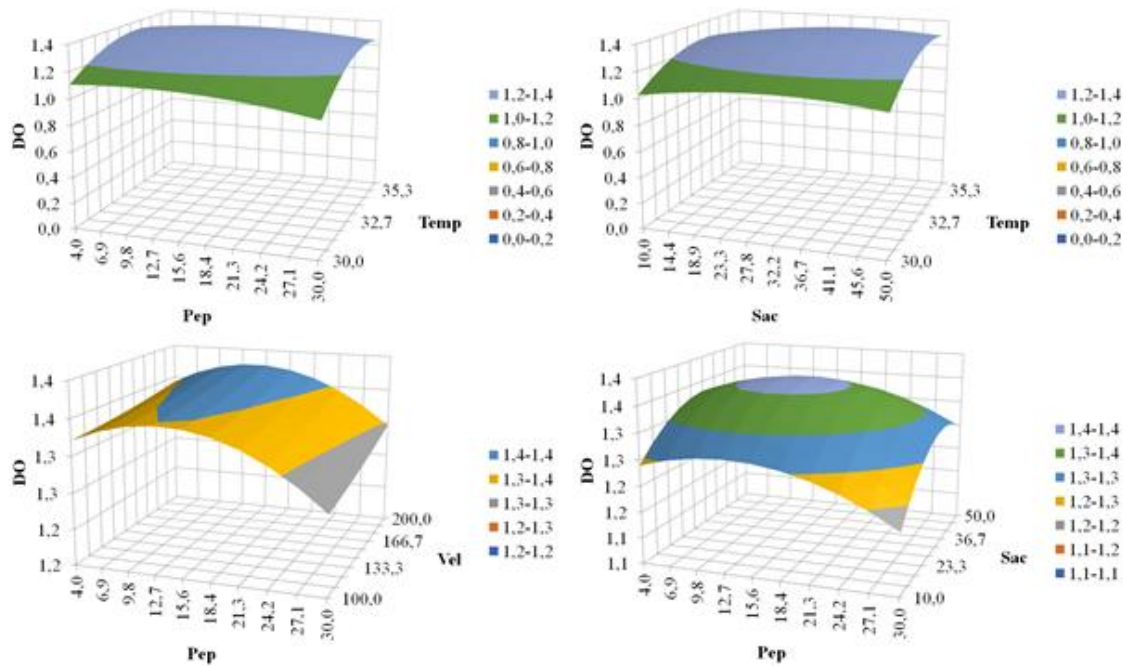
**Figura 6** - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das variáveis sobre o crescimento de *S. cerevisiae* LL74.

(continuação)



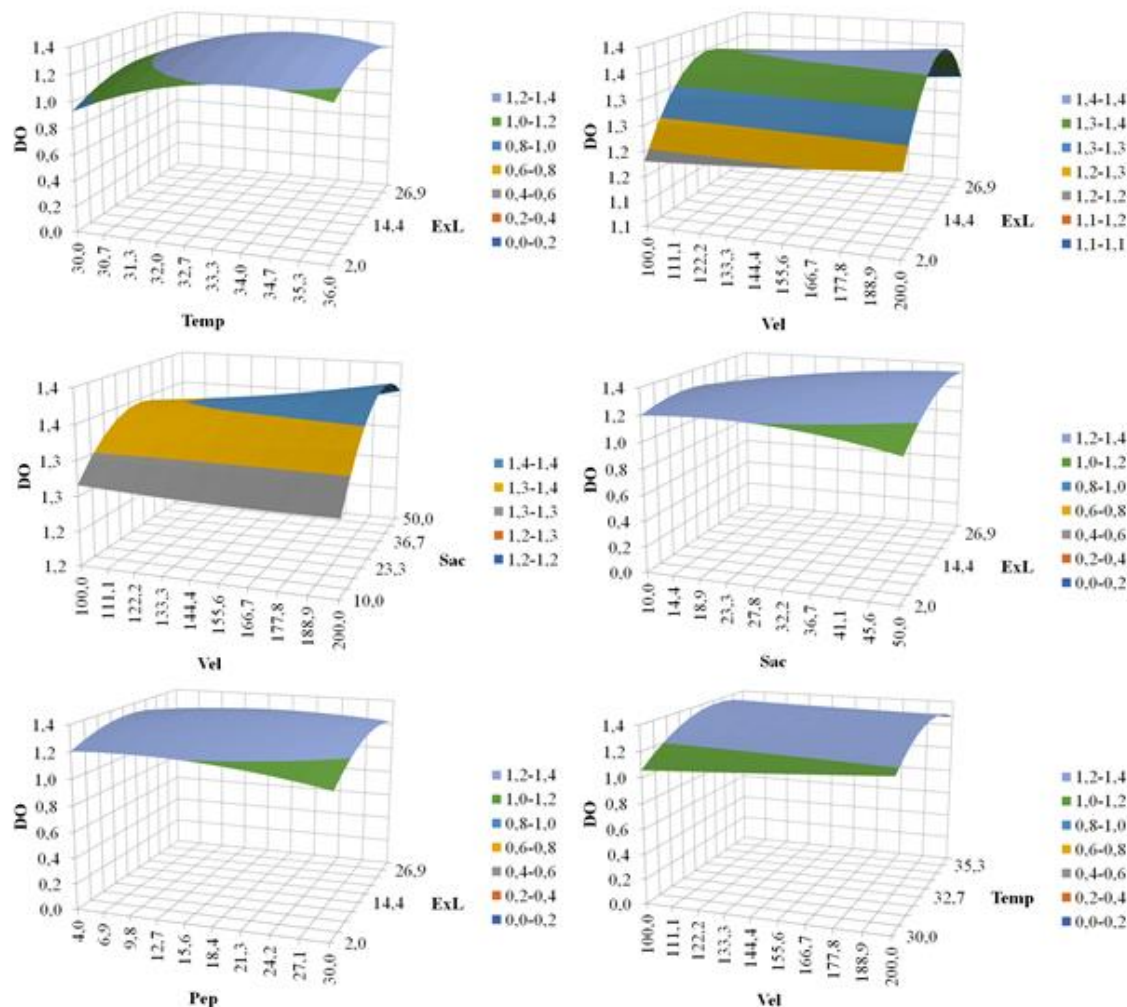
**Figura 7** - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das variáveis sobre o crescimento de *S. cerevisiae* LL83.

(continua)



**Figura 7** - Gráficos de superfície de resposta dos efeitos das variáveis sobre o crescimento de *S. cerevisiae* LL83.

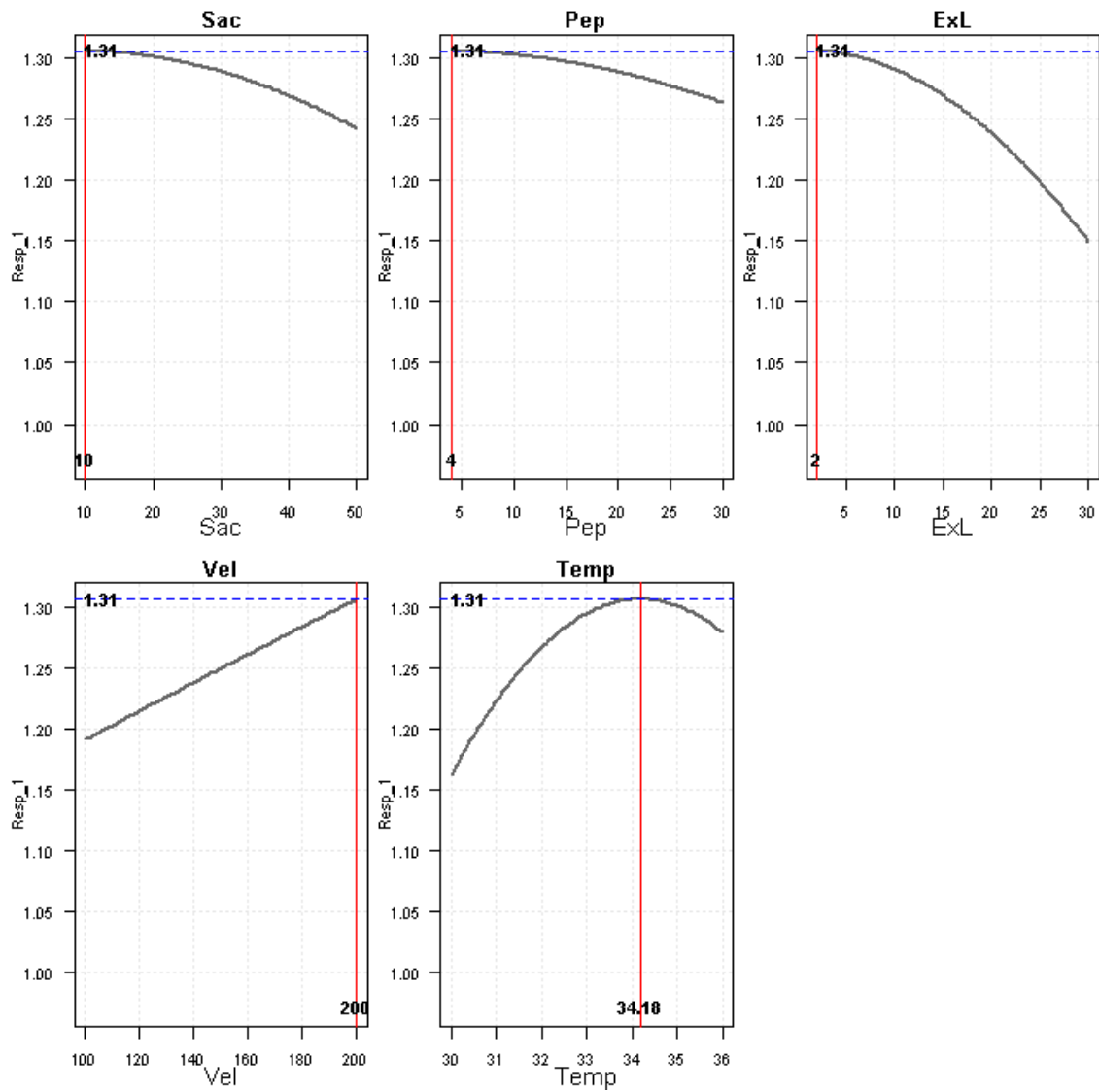
(continuação)



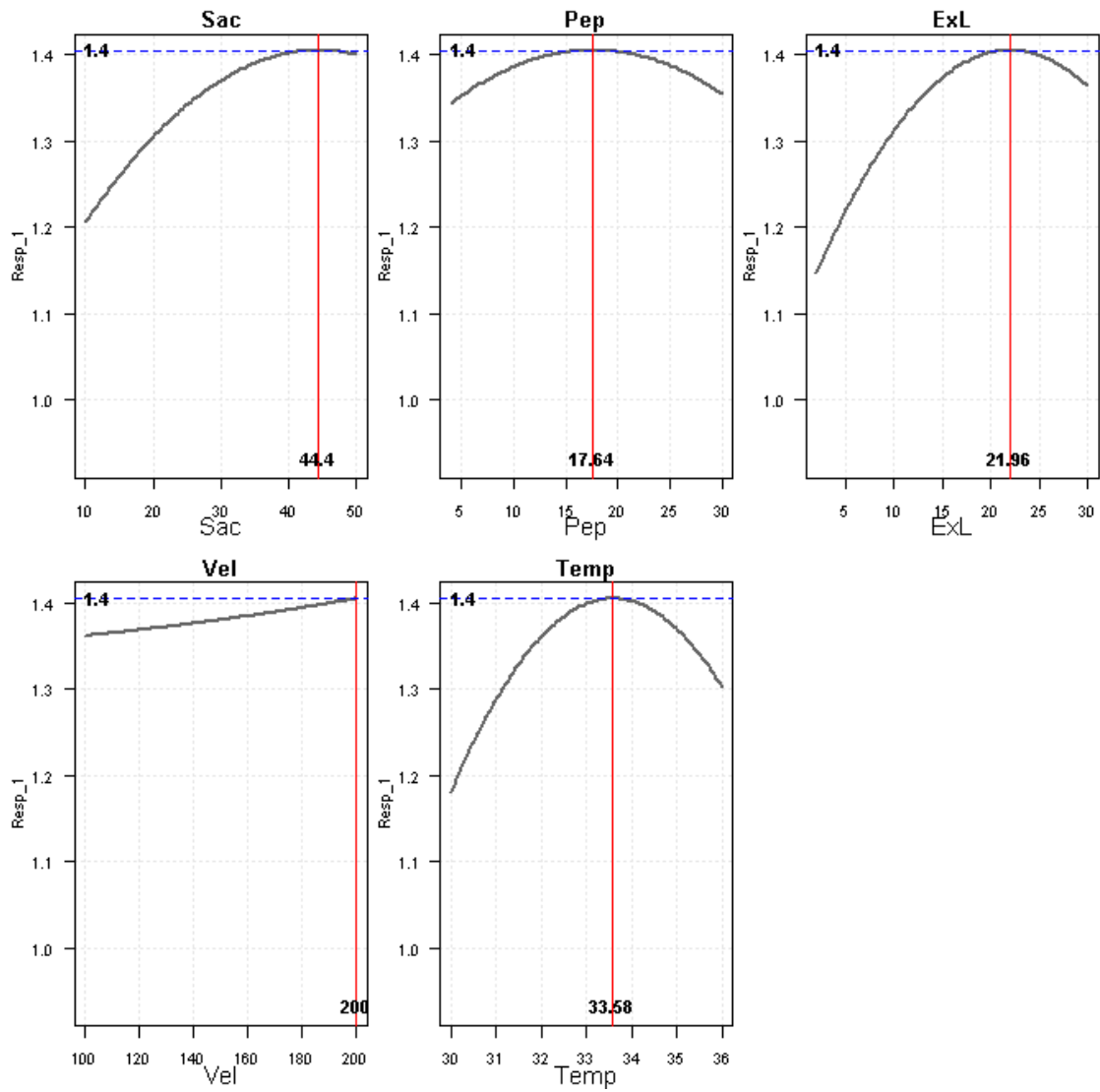
Observando a tendência dos gráficos, podemos notar que a cepa LL74 apresenta-se de forma mais plana, o que indica que sua resposta de interação entre as variáveis se dá por uma reta com a resposta obedecendo a um padrão linear, ou seja, ao aumentar a variável aumenta ou diminui a resposta, ao passo que a cepa LL83 apresenta gráficos mais curvilíneos, o que indica que a resposta da interação entre as variáveis obedece a uma curva, portanto a resposta máxima apresenta-se em um pico da curva e não necessariamente aumentando a variável consequentemente aumenta a resposta.

Para cada cepa foi calculada a condição otimizada para a resposta máxima (maior DO possível = maior produção de biomassa possível), como podemos ver nas Figuras 8 e 9.

**Figura 8** - Gráficos de otimização das variáveis para *S. cerevisiae* LL74.



**Figura 9** - Gráficos de otimização das variáveis para *S. cerevisiae* LL83.





Analisando os gráficos das cepas LL74 e LL83, podemos observar que a maior resposta calculada está representada pela linha tracejada azul na reta ou curva das respostas do crescimento. De acordo com o gráfico de cada variável, o ponto de intercessão é representado pela linha vermelha, demonstrando o valor em que é esperada a máxima produção de biomassa. Para cada uma das leveduras, o meio em condição ótima, de acordo com o cálculo BBD, está descrito na Tabela 13.

**Tabela 13** - Condições ótimas para produção de biomassa das cepas *S. cerevisiae* LL74 e LL83.

Cepa	Sacarose (g/L)	Peptona (g/L)	Extrato de levedura (g/L)	Velocidade de agitação (rpm)	Temperatura de incubação (°C)
LL74	10	4	2	200	34,18
LL83	44,4	17,64	21,96	200	33,58

Como pode ser observado, a cepa LL74 apresentou condições de meio otimizado com menores concentrações dos insumos quando comparada a cepa LL83. Não havendo grande diferença na condição de velocidade de agitação e temperatura de incubação entre as mesmas.

A composição do caldo YPD comumente utilizado para o crescimento de leveduras é 10 g·L<sup>-1</sup> extrato de levedura, 20 g·L<sup>-1</sup> peptona de carne e 20 g·L<sup>-1</sup> dextrose. Ao usarmos o modelo BBD para otimizar a produção de biomassa, observamos que para a levedura LL74, a condição otimizada requer metade da quantidade de fonte de carbono, e apenas 20% da quantidade de peptona e extrato de levedura quando comparada ao meio YPD, representando uma economia de 50% na quantidade de fonte de carbono e de 80% na quantidade de peptona e extrato de levedura para sua produção. Já para a levedura LL83, a quantidade por litro da fonte de carbono necessária para a mesma alcançar seu crescimento ótimo foi 112% maior quando comparada ao meio YPD. Já a quantidade de peptona foi similar e a variável extrato de levedura apresentou um aumento de 119,6% quando comparada ao meio YPD.

### 5.3 Crescimento das leveduras em meio otimizado

Após estabelecer a composição de meio e condição de incubação ótimas de cada cepa (LL74 e LL83), as cepas foram incubadas por 24 horas, sendo coletadas alíquotas a cada quatro horas e medição em espectrofotômetro a 640 nm para construção das curvas de crescimento e comparação com o crescimento das mesmas em caldo YPD (meio não otimizado). Na Tabela 16 observamos os resultados das médias das triplicatas dos valores de DO nos tempos T0, T4, T8, T12, T16, T20 e T24 das leveduras em condição otimizada de acordo com o modelo BBD e em caldo YPD incubadas a 30°C e 150 rpm.

Embora a utilização dos experimentos de primeira ordem, como o PB, e de segunda ordem, como BBD e RSM, pode ser importante para a determinação de fatores

e níveis que resultem em maior produção de biomassa, o que viabiliza seu processo de industrialização para uso como probiótico e/ou adsorvente de micotoxinas, o mesmo deve ser economicamente viável e de fácil aplicação industrial de forma a gerar lucro, além de conservar a viabilidade e estabilidade das células e suas propriedades probióticas (TERRAZAS, 2012).

**Tabela 14** - Valores médios<sup>#</sup> das curvas de crescimento de *S. cerevisiae* LL74 e LL83 em condição otimizada e em caldo YPD convencional.

Cepas	T4	T8	T12	T16	T20	T24
<b>LL74 Otm</b>	0,383 <sup>A</sup>	1,249 <sup>A</sup>	1,543 <sup>A</sup>	1,591 <sup>A</sup>	1,569 <sup>A</sup>	1,622 <sup>A</sup>
<b>LL74 YPD</b>	0,300 <sup>B</sup>	1,115 <sup>B</sup>	1,435 <sup>B</sup>	1,464 <sup>B</sup>	1,382 <sup>B</sup>	1,417 <sup>B</sup>
<b>LL83 Otm</b>	0,283 <sup>A</sup>	1,353 <sup>A</sup>	1,479 <sup>A</sup>	1,496 <sup>A</sup>	1,507 <sup>A</sup>	1,501 <sup>A</sup>
<b>LL83 YPD</b>	0,234 <sup>B</sup>	1,200 <sup>B</sup>	1,282 <sup>B</sup>	1,324 <sup>B</sup>	1,473 <sup>B</sup>	1,412 <sup>B</sup>

Otm: meio em condição otimizada; YPD: extrato de levedura, peptona, dextrose.

<sup>#</sup>Valores médios das medições de DO a 640 nm.

<sup>A</sup>Médias com mesma letra maiúscula, na coluna, não diferem pelo teste t ( $p > 0,05$ ).

Em ambas as cepas notamos que houve um aumento na DO, o que indica um aumento na produção de biomassa ao longo do tempo nos meios em condição otimizada e em YPD. Notamos também que a DO no meio otimizado de ambas as cepas foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) quando em comparação com o meio YPD padrão.

O crescimento foi 14,5% e 6,3% maior, respectivamente para as leveduras LL74 e LL83, provando que a otimização estatística usando o modelo de triagem PB e otimização BBD aumentaram a produção de biomassa. A maior diferença de crescimento para a levedura LL83 foi no tempo T12, onde a mesma apresentou 15,4% a mais de biomassa em meio otimizado quando comparada ao crescimento no mesmo tempo em meio YPD. Em seus estudos, Terrazas (2012) aumentou a produção de biomassa de *Pichia pastoris* usando os mesmos modelos. Em um experimento semelhante, Dogi et al. (2017) também obtiveram aumento da produção de biomassa de uma cepa de *S. cerevisiae* utilizando triagem de variáveis por meio de PB e BBD.

Em um estudo utilizando resíduos industriais, Pereyra et al. (2018), aumentou a produção de biomassa de *S. cerevisiae* em 112,5% quando comparado ao meio não otimizado, o que permitiu uma produtividade até nove vezes maior que a inicial, provando que a utilização de modelagem matemática é eficiente para a seleção das variáveis mais significativas e com isso, otimizar a produção obtendo maior quantidade de biomassa de forma mais econômica e em menor tempo.

No presente estudo, a LL74 apresentou valores de  $\mu_{\text{máx}}$  e  $t_g$  maiores que a LL83, indicando maior produção em menor quantidade de tempo. Quando comparamos as condições ótimas das variáveis para meio de cultura (sacarose, peptona e extrato de levedura) entre as cepas estudadas, notamos que as quantidades requeridas são bem menores para a cepa LL74 gerando economia de até 80% quando comparada ao meio padrão YPD e apresentando um aumento de 14,5% na produção de biomassa. Ao passo

que, mesmo apresentando aumento de 6,3% na produção de biomassa, a levedura LL83 requereu uma quantidade de insumos para sua produção ótima de biomassa até 119% maior quando comparado ao meio padrão YPD.

## 6. CONCLUSÕES

A utilização do planejamento de experimentos (DOE), em escala laboratorial, permite a obtenção de resultados mais rápidos, com menor custo e com precisão estatística na resposta.

Houve correlação entre diferentes metodologias de quantificação de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*: DO (medição indireta) e UFC ( $\log_{10}$ ) (medição direta), indicando ser possível mensurar o valor de UFC a partir das leituras de valores da DO, o que simplifica e agiliza os processos.

O delineamento de Plackett-Burman se mostrou adequado para triagem e seleção de variáveis de interesse para maior produção de biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*.

A modelagem estatística, através do delineamento Box-Behnken e metodologia de superfície de respostas, se mostraram eficientes para otimização da produção de biomassa de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, melhorando estatisticamente o processo produtivo quando comparado às condições padrão descritas na literatura.

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* LL74 se mostrou mais eficiente que a cepa *Saccharomyces cerevisiae* LL83, por produzir maior quantidade de biomassa utilizando menos insumos para sua produção, sendo considerada mais economicamente viável para a produção industrial.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACEVEDO, S.; RANAUDO, M. A.; ESCOBAR, G. et al. Adsorption of asphaltenes and resins on organic and inorganic substrates and their correlation with precipitation problems in production well tubing. **Fuel**, v. 74, n. 4, p. 595-598, 1995.

ALVES, J. G. L. F. **Estudo da influência da temperatura na cinética de crescimento anaeróbico de *Saccharomyces cerevisiae***. 1996. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1996.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. Cultivo celular: In: MOLINARO, E. M., CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R (coord.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010, v. 2, cap. 5, p. 215-253.

ANUAR, N.; ADNAN, A. F. M.; SAAT, N. et al. Optimization of extraction parameters by using response surface methodology, purification, and identification of anthocyanin pigments in *Melastoma malabathricum* fruit. **The Scientific World Journal**, v. 2013, n. 1, p. 01-10, 2013.

ARMANDO, M. R.; PIZZOLITTO, R. P.; ESCOBAR, F. et al. *Saccharomyces cerevisiae* strains from animal environmental with aflatoxin B1 binding ability and anti-pathogenic bacteria influence in vitro. **World Mycotoxin Journal**, v. 4, n. 1, p. 59-68, 2011.

AVANTAGGIATO, G.; SOLFRIZZO, M.; VISCONTI, A. Recent advances on the use of adsorbent material for detoxification of *Fusarium* mycotoxins. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, n. 4, p. 379-388, 2005.

BAPTISTA, A. S.; HORII, J.; BAPTISTA, A. S. Fatores físico-químicos e biológicos ligados à produção de micotoxinas. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, n. 1, p. 1-14, 2004.

BARBOSA, F. H. F.; BARBOSA, L. P. J. L.; BAMBIRRA, L. H. S. Probióticos – microrganismos a favor da vida. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.11, n. 1, p. 11-21, 2011.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3ª ed. Campinas, SP: Editora da UNICAMP, 2007. 480 p.

BORBA, C. E. **Modelagem da remoção de metais pesados em coluna de adsorção de leito fixo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

BOVO, F.; CORASSIN, C. H.; OLIVEIRA, C. A. F. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **UNOPAR Científica, Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 12, n. 2, p. 15-21, 2010.

BOX, G. E. P.; HUNTER, J. S.; HUNTER, W. G. **Statistics for experimenters: design, innovation and discovery**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2005.

CARDWELL, K. F.; KLING, J. G.; MAZIZA-DIXON, B. Interaction between *Fusarium verticillioides*, *Aspergillus flavus*, and insect infestation in four maize genotypes in lowland Africa. **Phytopathology**, v. 90, n. 3, p. 276-284, 2000.

CHEREMISINOFF, P. N., ELLERBUSCH, F. **Carbon Adsorption Handbook**. Michigan: Ann Arbor Science, 1978.

COMPRI-NARDY, M.; STELLA, M. B.; OLIVEIRA, C. **Práticas de laboratório de bioquímica e biofísica: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 212p.

CRUZ, L. C. H. **Micologia veterinária**. 2. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. 348p.

DÁRIO, M. G. **Efeito da alteração na captação de sacarose ao metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae***. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade de São Paulo (USP), 2012.

DI CASTRO, I. C. **Aspectos sobre as micotoxinas na produção de suínos**. 2014. 45f. Trabalho de Conclusão (Graduação em Zootecnia) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

DIAZ, D. E.; SMITH, T. K. Agentes secuestrantes de micotoxinas: herramientas prácticas para su neutralización. In: DIAZ, D. E.; SMITH, T. K. **El libro azul de micotoxinas**. Reino Unido: Nottingham University Press, 2008. p. 345-362.

DOGI, C.; CRISTOFOLINI, A.; PEREYRA, M. L. G. et al. Aflatoxins and *Saccharomyces cerevisiae*: yeast modulates the intestinal effect of aflatoxins, while aflatoxin B<sub>1</sub> influences yeast ultrastructure. **World Mycotoxin Journal**, v. 10, n. 2, p. 171-181, 2017.

DROGUETT, S. **Elementos de catálisis heterogénea**. Monografía. Serie de Química. Washington: Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, 1983.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins. **Food and Nutrition Paper** n. 64. Roma: FAO, 1995.

FAO. Worldwide regulations for mycotoxins. **Food and Nutrition Paper** n. 64. Roma: FAO, 2002.

FERRACINI-SANTOS, L.; SATO, H. H. Isolamento de polímeros da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da atividade antioxidante da manana-proteína isolada. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 322-326, 2009.

FERREIRA, H.; PITTNER, E.; SANCHES, H. F. et al. Aflatoxinas: um risco a saúde humana e animal. **Revista do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 2, n. 1, p. 113-127, 2006.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota. Introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GIMENO, A.; MARTINS, M. L. **Micotoxinas y micotoxicosis en animales y humanos**. 3. ed. Miami, Flórida: Special Nutrients, 2011. 129 p. Disponível em: <<http://www.specialnutrients.com/pdf/book/3%20edicion%20MICOTOXINAS%20LR%20Secure.pdf>>. Acesso em: 22 dez. 2017.

GUILLOT, J. F. Como utilizar correctamente los probióticos en avicultura. **Avicultura Industrial**, v. 19, n. 8, p. 33-36, 2001.

HINKELMANN, K.; KEMPTHORNE, O. Two classes of group divisible partial diallel crosses. **Biometrika**, v.50, p.281-291, 1963.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. R (coord.). **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blücher, v. 2, cap. 6, p. 93-122, 2001.

HOMEM, C. L. G.; COSTA, J. R. C.; PINHEIRO, I. R. Estudo da Fermentação Alcoólica do Hidrolisado de Bagaço de Laranja por *Saccharomyces cerevisiae*. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 4, n. 1, p. 64-67, 2017.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 4 (33), n. 6, p. 1-19, 2009.

KELLER, K. M. **Leveduras com potencial ação descontaminante de micotoxinas e como probiótico para aplicação na produção animal**. 2012. 168 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

KOS, B. V. Z. E.; ŠUŠKOVIĆ, J.; VUKOVIĆ, S. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981-987, 2003.

KWIATKOWSKI, A.; ALVES, A. P. F. Importância da detecção e do controle de aflatoxinas em alimentos. **Saúde e Biologia**, v. 2, n. 2, p. 44-53, 2007.

LEESON, S.; SUMMERS, J. D. **Scott's nutrition of the chicken**. 4. ed. Ontario: University Books, 2001. 591p.

MAGNANI, M.; CASTRO-GÓMEZ, R. J. H.  $\beta$ -glucana from *Saccharomyces cerevisiae*: constitution, bioactivity and obtaining. **Ciências Agrárias**, v. 29, n. 3, p. 631-650, 2008.

MAIA, P. P.; SIQUEIRA, M. E. P. B. Aflatoxinas em rações destinadas a cães, gatos e pássaros – uma revisão. **Revista da FZVA**, v. 14, n. 1, p. 235-257, 2007.

MALLMANN, C. A.; DILKIN, P.; GIACOMINI, L. Z. et al. Critérios para seleção de um bom sequestrante para micotoxinas. In: **Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícola**, 2006, São Paulo. Anais. São Paulo: FACTA, 2006. p. 213-224.

MECA, G.; BLAIOTTA, G.; RITIENI, A. Reduction of ochratoxin A during the fermentation of italian red wine Moscato. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 579-583, 2010.

MEDEIROS, R. T. S.; GONZALES, E.; FELICIO, R. C. et al. Evaluation of antifungal activity of *Pittosporum undulatum* L. essential oil against *Aspergillus flavus* and aflatoxin production. **Ciência e Agrotécnologia**, v. 35, n. 1, p. 71-76, 2011.

MOK, C. H.; SHIN, S. Y.; KIM, B. G. Aflatoxin, deoxynivalenol, and zearalenone in swine diets: Predictions on growth performance. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v. 26, n. 4, p. 243-254, 2013.

MOREIRA, B. L. D.; PARAZZI, C.; PAPIN, L. F. et al. Study of yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* from biodiversity environmental in alcoholic fermentation. **Bioscience Journal**, v. 29, suppl. 1, p. 1672-1677, 2013.

MYERS, R. H.; MONTGOMERY, D. C.; ANDERSON-COOK, C. M. **Response surface methodology: product and process optimization using designed experiments**. 3. ed. Nova York: John Wiley & Sons, 2009. 856p.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Criterios de salud ambiental, 11: Micotoxinas**, Cidade do México: OPS, 1983. p. 131.

PARKER, R. B. Probiotics: the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition & Health**, v.29, n. 1, p. 4-8, 1974



PEREIRA, M. M. G.; CARVALHO, E. P.; PRADO, G. Crescimento e produção de aflatoxinas por *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 20, n. 1, p. 141-156, 2002.

PEREYRA, C. M.; GIL, S.; CRISTOFOLINI, A. et al. The production of yeast cell wall using an agroindustrial waste influences the wall thickness and is implicated on the aflatoxin B1 adsorption process. **Food Research International**, v. 111, n. September 2018, p. 306-313, 2018.

PETENETE, M. **Afinal, o que é DOE?**. 2015. Disponível em: <<http://www.escolaedti.com.br/entenda-o-que-e-doe/>>. Acesso em: 18 dez. 2017.

PICCININ, E.; DI PIERO, R. M.; PASCHOLATI, S. F. Efeito de *Saccharomyces cerevisiae* na produtividade de sorgo e na severidade de doenças foliares no campo. **Fitopatologia Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 5-9, 2005.

PIEREZAN, F.; OLIVEIRA-FILHO, J. C.; CARMO, P. M. et al. Intoxicação experimental por aflatoxina em bezerros. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 7, p. 607-618, 2012.

PLACKETT, R. L.; BURMAN, J. P. The design of optimum multifactorial experiments. **Biometrika**, v. 33, n. 4, p. 305-325, 1946.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M. et al. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, 2011.

RAKSHAEE, R.; PANAHANDEH, M. Stabilization of a magnetic nano-adsorbent by extracted pectin to remove methylene blue from aqueous solution: A comparative studying between two kinds of cross-liked pectin. **Journal of Hazardous Materials**, v. 189, n. 1-2, p. 158-166, 2011.

RODRIGUES, F. **Relatório-Quantificação celular 2**. 2017. Disponível em: <<http://www.ebah.com.br/content/ABAAe4e0AF/relatorio-quantificacao-celular2>>. Acesso em: 20 dez. 2017.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2. ed. Campinas, SP: Cárita Editora, 2009.

ROLFE, R. D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. **Journal of Nutrition**, v. 130, n. 2, p. 396-402, 2000.

ROSS, R. P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G. F. et al. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n. 6, p. 1410-1417, 2005.

RYAN, K. J.; RAY, C. G. **Sherris medical microbiology**. Nova York: McGraw-Hill Education, 2014.

SANTOS, C. P. F.; MELO, D. M. A; SOBRINHO, E. V. Caracterização e usos de argilas bentonitas e vermiculitas para adsorção de cobre (II) em solução. **Cerâmica**, v. 48, n. 308, p. 178-182, 2002.

SEGURA, F. G.; AUGUSTÍN, V. E. B. O.; JAVIER, F. G. F. et al. Detección de aflatoxina B1 en alimentos balanceados para conejos. **REDVET**, v.15, n. 1, p. 1-7, 2013.

SILVA, A. M.; COSTA, F. O.; CARVALHO, E. S. et al. Estudo da capacidade de adsorção por solvente para biomassas adsorventes. In: Encontro Nacional de Educação, Ciência e Tecnologia, 1., 2012, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: ENECT, 2012. 1-6 p.

SILVA, E. N.; ANDREATTI FILHO, R. L. Probióticos e prebióticos na avicultura. In: Simpósio de Sanidade Avícola, 2., 2000, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Embrapa, 2000. 45-54 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. São Paulo: Blücher, 1997. 109p.

SOARES, F. S. C. **Caracterização e aplicação de zeólitas naturais**. 2010. 228 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

STATA CORP. **Stata Statistical Software: Release 12**. College Station, TX: StataCorp LP, 2011.

STEPPAN, D.; WERNER, J.; YEATER, B. **Essential regression and experimental design in MS Excel-free, user friendly software package for doing multiple linear regression, step-wise regression, polynomial regression, model adequacy checking and experimental design in MS Excel**. 1999. Disponível em: <<http://www.oocities.org/siliconvalley/network/1032/>>. Acesso em: 05 fev. 2017.

STONE, C. W.; MILLS, D. V. **Yeast products in the feed industry: a practical guide for feed professionals**. 2007. Disponível em: <[http://www.engormix.com/e\\_articles\\_view.asp?art=243&AREA=MAS](http://www.engormix.com/e_articles_view.asp?art=243&AREA=MAS)>. Acesso em: 04 dez. 2017.

TERRAZAS, W. D. M. **Fatores que influenciam a produção de biomassa e glicerol quinase pela levedura recombinante *Pichia pastoris***. 2012. 132 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2012.

TROMBETE, F. M.; FRAGA, M. E.; SALDANHA, T. Contaminação de queijos por aflatoxina M1: Uma abordagem sobre a ocorrência e prevenção. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 392, p. 40-48, 2013.

URIBE-YUNDA, D. F.; NAVAS, M. C. Mecanismos moleculares involucrados em la mutagenicidad inducida por aflatoxina B1. **Revista Ciencias de la Salud**, v. 10, n. 3, p. 403-419, 2012.

VENEGAS, A. C.; GUERRA, J. J. H; NAVAS, M. C. N. Exposición a aflatoxina: un problema de salud pública. **IATREIA**, v. 27, n. 1, p. 42-52, 2014.

VINADÉ, M. E. C.; VINADÉ, E. R. C. **Métodos espectroscópicos de análise quantitativa**. Santa Maria: Editora UFSM, 2005. p. 272.

YIANNIKOURIS, A.; FRANÇOIS, J.; POUGHON, L. et al. Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **Journal of Food Protection**, v. 67, n. 6, p. 1195-1200, 2004