

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE PLANEJAMENTO ALIMENTAR E NUTRIÇÃO

**LEVEDURA DE CERVEJARIA (*Saccharomyces sp.*):
COMPOSIÇÃO, VALOR PROTÉICO E AVALIAÇÃO DE
TOXICIDADE SUBCRÔNICA EM CÉLULAS ÍNTEGRAS,
CÉLULAS MECANICAMENTE ROMPIDAS E
CONCENTRADO PROTÉICO**

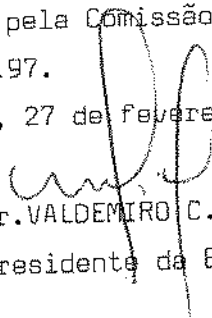
GLENYS MABEL CABALLERO CÓRDOBA
Nutricionista

PARECER

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por GLENYS MABEL CABALLERO CÓRDOBA e aprovada pela Comissão Julgadora em 27.02.97.

Dr. VALDEMIRO CARLOS SGARBIERI
Orientador

Campinas, 27 de fevereiro de 1997


Prof. Dr. VALDEMIRO C. SGARBIERI
Presidente da Banca

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutor em Ciência da Nutrição

1997

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/UNICAMP
	C111L
V.	Ex.
TOMADA	30069
PROD.	281197
C	☐ D ☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	10/05/97
N.º CPD	

CM-00 098419-1

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA F.E.A. - UNICAMP

C111L

Caballero Córdoba, Glenys Mabel

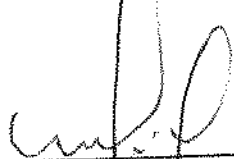
Levedura de cervejaria (*Saccharomyces sp.*): composição, valor protéico e avaliação de toxicidade subcrônica em células integras, células mecanicamente rompidas e concentrado protéico / Glenys Mabel Caballero Córdoba. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.

Orientador: Valdemiro Carlos Sgarbieri

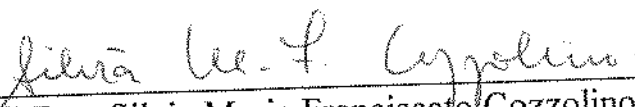
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Levedura. 2.Biomassa. 3.Saccharomyces. 4.Nutrição - testes. 5.Toxicidade - testes. I.Sgarbieri, Valdemiro Carlos.
II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.Título.

BANCA EXAMINADORA

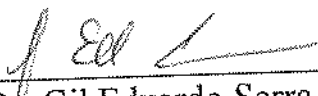


Prof. Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri
(Orientador)

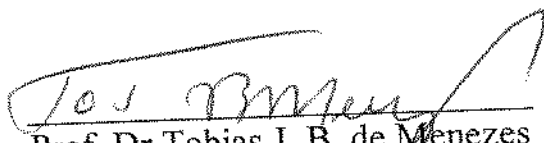


Prof.ª Dra. Silvia Maria Franciscato Cozzolino
(Membro)

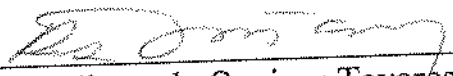
Prof. Dr José Eduardo Dutra de Oliveira
(Membro)



Prof. Dr. Gil Eduardo Serra
(Membro)



Prof. Dr. Tobias J. B. de Menezes
(Membro)



Prof.ª Dra. Débora de Queiroz Tavares
(Membro)

Prof. Dr. Felix Guillermo Reyes
(Membro)

Dedico esta tese
aos meus pais
Glenys e José Irene,
ao meu esposo
Armando e aos
meus filhos Alan
Isaac e Alex Adrián
que com amor e
carinho me deram
forças para realizar
este objetivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão de bolsa durante o curso de doutorado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro para a realização da parte experimental da tese.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), especialmente ao Departamento de Nutrição e Planejamento Alimentar (DEPAN)-FEA, pela oportunidade concedida para a realização do curso.

Ao professor Dr. Valdemiro Carlos Sgarbieri, pela orientação dedicada e eficiente deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, nas pessoas de Rodney, Rita, Damaris e do Dr. Gil Eduardo Serra, pelo apoio técnico.

À Prodesa, na pessoa do Dr. Juan Carlos Cruz Sánchez, pelo fornecimento da matéria-prima.

Ao Centro Interdepartamental de Química de Proteínas (CIPQ)-USP-Ribeirão Preto pela realização das análises de aminoácidos.

À Banca Examinadora, por terem doado seu tempo e conhecimentos para a correção deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, especialmente a Eliette de Carvalho Leite, Soeli Reis, Francisco Carraro e Liana Dawood, pelo auxílio técnico prestado.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Antônio Gonçalves, Cláudia Romano, Marli I. A. Medeiros, Creuza K. Nomura, Geraldo A. Silva e José C. Marcondes, pelo atendimento rápido e atencioso

À secretaria de pós-graduação da FEA, na pessoa de Margareth Randi Moraes, pela delicadeza e eficiência.

Às amigas e colegas Erna Vogh Jong, Andréa Dário Frias, Teresa Pacheco, Mara Reis, Gersisley, Maria Sebastiana e Ruth, pelo carinho e amizade.

A Maria Helena da Silva (Marlen), por ter sido mãe dos meus filhos nas minhas horas de ausência.

Às minhas irmãs do peito e companheiras incondicionais de todas as horas: Sirlene, Teresa Cesare e Niurka.

Aos meus sogros Vivina e Leonel, pela solidariedade

À João Carlos Semedo Mendes e Rita Buratto, pela colaboração e empréstimo do equipamento para a impressão do exemplar final.

À todos os professores e funcionários da FEA, que contribuíram de alguma forma, direta ou indiretamente para que este trabalho se concretize.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	1
SUMMARY.....	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	8
2.1. RUPTURA CELULAR	9
2.1.1. Métodos mecânicos	9
2.1.2. Digestão enzimática	11
2.1.3. Métodos químicos	12
2.2. EXTRAÇÃO E SEPARAÇÃO POR PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LEVEDURA PARA A PRODUÇÃO DE CONCENTRADOS E ISOLADOS PROTÉICOS	13
2.3. AVALIAÇÃO DA QUALIDADE PROTÉICA	16
2.3.1. Métodos biológicos	16
2.3.2. Métodos químicos	18
2.3.3. Métodos microbiológicos	19
2.4. ÁCIDOS NUCLEICOS	20
2.4.1. Teor de ácidos nucleicos nos alimentos	20
2.4.2. Efeitos da ingestão de ácidos nucleicos	20
2.4.3. Redução do teor de ácidos nucleicos	22
2.5. VALOR NUTRICIONAL DAS PROTEÍNAS DE LEVEDURA	25
2.6. AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA DA PROTEÍNA DE LEVEDURA UTILIZADA COMO FONTE ALIMENTAR	30
2.6.1. Testes toxicológicos para proteína unicelular	31
Uréia	33

Creatinina	35
Ácido úrico	36
Aminotransferases ou transaminases	37
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.....	39
3.1.1.Preparo de material (amostras) para a pesquisa.....	39
3.1.2.Estudos Planejados.....	39
3.2. RUPTURA MECÂNICA DAS PAREDES CELULARES	40
3.3. CURVA DE SOLUBILIDADE DA PROTEÍNA EM FUNÇÃO DO pH	43
3.4. EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DA PROTEÍNA COM BAIXO TEOR DE ÁCIDOS NUCLEICOS	43
3.5. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA NA BIOMASSA E NA PROTEÍNA ISOLADA	45
3.6. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL <i>IN VITRO</i>	46
3.6.1. Escore químico (EQ)	46
3.6.2. Digestibilidade <i>in vitro</i>	47
3.6.3. Lisina disponível	48
3.6.4. Valor biológico calculado (VBc)	48
3.6.5. Utilização líquida da proteína calculada (NPUC)	49
3.7. AVALIAÇÃO NUTRICIONAL <i>IN VIVO</i>	49
3.7.1. Escore de aminoácidos corrigido pela digestibilidade <i>in vivo</i> (PDCAAS)	55
3.7.2. Energia absorvida (EA)	55
3.8. ENSAIO DE TOXICIDADE SUBCRÔNICA	57
3.8.1. Quociente de eficácia alimentar	58
3.8.2. Coleta de sangue	59
3.8.3. Coleta de urina	60

3.8.4. Coleta de órgãos	60
3.9. Análise estatística	61
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1. RUPTURA CELULAR.....	62
4.2. EXTRAÇÃO E PRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA DE LEVEDURA	64
4.3. COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE CÉLULAS DE LEVEDURAS E DE CONCENTRADO PROTÉICO OBTIDO COM PERCLORATO	68
4.4. COMPOSIÇÃO DE AMINOÁCIDOS DE CÉLULAS ÍNTEGRAS DE LEVEDURA DE CERVEJA (CLI) E CONCENTRADO PROTÉICO DE LEVEDURA OBTIDO COM PERCLORATO (CPP)	70
4.5. VALOR NUTRICIONAL.....	72
4.5.1. Avaliação <i>in vitro</i>	72
4.5.2. Ensaio biológico com ratos Wistar.....	75
Balanço nitrogenado.....	76
Quociente de eficácia protéica	82
Energia absorvida.....	84
4.6. ESTUDOS TOXICIDADE SUBCRÔNICA.....	86
4.6.1. Ganho de peso, consumo e quociente de eficácia alimentar.....	86
4.6.2. Influência de proteína de levedura em alguns índices bioquímicos determinados no soro sangüíneo e na urina de ratos Wistar.....	97
Níveis séricos de aminotransferases.....	97
Níveis séricos e urinários de creatinina.....	100
Níveis sangüíneos e urinários de uréia.....	104
Níveis sangüíneos e urinários de ácido úrico.....	107
4.6.3. Resultados da análise de órgãos.....	110
Fígado	110

Rins	116
Cérebro	123
4.7. Considerações finais	128
5. CONCLUSÕES	131
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Composição centesimal das dietas utilizadas no ensaio biológico para a determinação do BN, VBa, Da, NPUa das proteínas de levedura	52
Tabela 2. Mistura mineral AIN-93 G-MX	53
Tabela 3. Mistura vitamínica AIN-93-VX	54
Tabela 4. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total e proteína do sobrenadante de células de leveduras rompidas em diferentes velocidades ..	62
Tabela 5. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total, proteína bruta e rendimento de extração da proteína no sobrenadante de células de levedura (25 e 40%), rompidas na velocidade de 2.400 rpm, com fluxo de alimentação de 2,4 e 4,8 L/h	64
Tabela 6. Composição centesimal (% base seca) de células íntegras de levedura (CLI) e de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP)	69
Tabela 7. Composição aminoacídica de células íntegras de leveduras (CLI), de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP), em g/100g de proteína e escore químico (EQ) dado em %	71
Tabela 8. Teor de lisina disponível (LD), digestibilidade da proteína "in vitro" (Dig), valor biológico calculado (VBc) e utilização líquida da proteína (NPUc)	73
Tabela 9. Nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio fecal (NF), nitrogênio urinário (NU) e balanço nitrogenado (BN) de ratos que receberam dietas contendo 10% de proteína proveniente de células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico de levedura (CPP) e caseína (CAS)	77

Tabela 10. Digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa) utilização líquida da proteína (NPUa) e quociente de eficiência protéica (PER) de ratos alimentados com dietas contendo 10% de proteínas de células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP) e caseína (CAS)	81
Tabela 11. Dieta consumida (DC), quantidade de fezes excretadas (QFE), energia bruta da dieta (EBD), energia bruta fecal (EBF), energia da dieta consumida (EDC), energia excretada nas fezes (EEF) e energia absorvida (EA) durante o balanço nitrogenado de ratos alimentados com produtos a base de levedura e caseína	85
Tabela 12. Dieta consumida (DC), proteína consumida (PC), ganho de peso (GP) e quociente de eficiência alimentar (QEA) para ratos alimentados durante 45 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteína	89
Tabela 13. Dieta consumida (DC), proteína consumida (PC), ganho de peso (GP) quociente de eficiência alimentar (QEA) para ratos alimentados durante 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de produtos à base de levedura e caseína	93
Tabela 14. Níveis sangüíneos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos Wistar alimentados com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína, por períodos de 45 e 90 dias ...	98
Tabela 15. Níveis sangüíneos e urinários de creatinina (CR) em ratos Wistar alimentados durante 45 e 90 dias, com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína	102
Tabela 16. Níveis sangüíneos e urinários de uréia (UR) em ratos Wistar alimentados com formulações contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína durante 45 e 90 dias	105

Tabela 17. Níveis sanguíneos e urinários de ácido úrico (AU) em ratos Wistar alimentados com preparações contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína por períodos de 45 e 90 dias	108
Tabela 18. Peso de fígado (PFig) e percentagem de fígado em relação ao peso corporal (%Fig) de ratos que receberam durante 45 e 90 dias dietas contendo 15 e 30 % de proteínas de levedura e caseína	111
Tabela 19 - Lipídios totais no fígado (LTF) e proteínas totais no fígado (PTF) de ratos Wistar que receberam dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína durante 45 e 90 dias	114
Tabela 20. Peso de rins (PRim), % de rins em relação ao peso corporal (% Rim), lipídeos totais dos rins (LTR), proteínas totais dos rins (PTR), de ratos submetidos ao consumo de dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína por um período de 45 dias e 90 dias	117
Tabela 21- Lipídios totais de rins (LTR) e proteínas totais de rins (PTR) de ratos submetidos so consumo de dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína por períodos de 45 e 90 dias	120
Tabela 22. Peso de cérebro (PCer), % de cérebro em relação ao peso corporal (% Cer), lipídios totais do cérebro (LTC), proteínas totais do cérebro (PTC), de ratos que receberam dietas com 15 e 30% de proteínas durante 45 e 90 dias	124
Tabela 23. Lipídios totais do cérebro (LTC) e proteínas totais do cérebro (PTC) de ratos que receberam dietas contendo 15 e 30% de proteínas provenientes de produtos à base de levedura de cervejaria e caseína por períodos de 45 e 90 dias	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo da uréia	34
Figura 2. Processo de ruptura da parede celular de levedura de cervejaria	42
Figura 3. Métodos de extração da proteína de levedura com perclorato de sódio (CPP)	44
Figura 4. Curva de solubilidade de células de levedura em função do pH	65
Figura 5. Nitrogênio extraído (NE) a pH 8,0, nitrogênio precipitado (NP) a pH 4,2 em células de leveduras rompidas após a primeira e segunda recirculação da suspensão a uma velocidade de 2400 rpm	67
Figura 6. Escore do aminoácido limitante primário (EALP) e escore de aminoácido corrigido pela digestibilidade <i>in vivo</i> (PDCAAS) da proteína de células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP)	75
Figura 7. Consumo de proteína (PC) e ganho de peso (GP) durante os 10 dias e balanço nitrogenado de ratos Wistar que receberam dietas contendo 10% de proteínas de células íntegras (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico obtido com perclorato de sódio (CPP) e caseína (CAS)	79
Figura 8. Curvas de crescimento de ratos alimentados com dietas contendo 10% de proteínas fornecidas por células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP) e caseína (CAS)	83
Figura 9. Curva de crescimento de ratos sacrificados com 7 semanas que receberam dietas contendo níveis protéicos de 15 e 30% de caseína (CAS15 CAS30), células de levedura rompida (CLR15 e CLR30) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP15 e CPP30) .	87

Figura 10. Curva de crescimento de ratos sacrificados com 13 semanas que receberam dietas contendo níveis protéicos de 15 e 30% de caseína (CAS15 CAS30), células de levedura rompida (CLR15 e CLR30) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP15 e CPP30) .	92
Figura 11. Proteína consumida diariamente por ratos alimentados durante 45 e 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura obtidas por diferentes tratamentos	95
Figura 12. Quociênte de eficácia alimentar para ratos alimentados por períodos de 45 e 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura	96
Figura 13. Percentagem de fígado em relação ao peso corporal (% Fig) de ratos Wistar que receberam dietas durante 45 e 90 dias contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína	112
Figura 14. Percentagem de lipídios totais em fragmentos de ratos Wistar alimentados com dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura de cervejaria e caseína durante 45 e 90 dias	115
Figura 15. Percentagem de proteínas totais em fígados de ratos Wistar alimentados com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura de cervejaria e caseína durante 45 e 90 dias	116
Figura 16. Percentagem de rins em relação ao peso corporal (% Rim) de ratos alimentados durante 45 e 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína	119
Figura 17. Percentagem de lipídios totais de rins de ratos Wistar alimentados com dietas contendo níveis protéicos de 15 e 30% provenientes de células de leveduras rompidas (CLR 15 e CLR 30), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP 15 e CPP 30) e caseína como padrão (CAS 15 e CAS 30) por períodos de 45 e 90 dias	121

Figura 18. Percentagem de proteínas totais em rins de ratos Wistar alimentados com dietas contendo níveis de 15 e 30% de proteínas provenientes de levedura rompidas (CLR 15 e CLR 30), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP 15 e CPP 30) e caseína (CAS 15 e CAS 30) durante 45 e 90 dias de ensaio	122
Figura 19. Percentagem de cérebro em relação ao peso corporal (% Cer.) de ratos submetidos a dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína, por períodos de 45 e 90 dias	125
Figura 20. Percentagem de lipídios totais de cérebros de ratos Wistar que receberam formulações contendo proteína (15 e 30%) de células de levedura rompidas, concentrado protéico obtido com perclorato e caseína por períodos de 45 e 90 dias	127
Figura 21. Percentagem de proteínas totais de cérebros de ratos Wistar que receberam formulações contendo proteína de células de levedura rompidas, concentrado protéico de levedura obtido com perclorato e caseína (15 e 30%) por períodos de 45 e 90 dias	128

RESUMO

Buscando novas alternativas para a utilização de resíduos industriais, foi pesquisado o aproveitamento da levedura de cerveja (*Saccharomyces carlsbergensis*) como fonte protéica. Suspensões de levedura desamargada com 40% de células (v/v), foram rompidas por método mecânico, utilizando-se moinho Dyno-mill com 70% da câmara preenchida com esferas de vidro (0,2 a 0,6 mm de diâmetro), na velocidade de 2400rpm, fluxo de alimentação de 4,8 L/h e temperatura de 15°C. O extrato protéico proveniente das células rompidas foi adicionado de perclorato de sódio (NaClO₄) até atingir a concentração 0,5M para redução química do conteúdo de ácido ribonucleico (RNA), logo após acrescido de ácido clorídrico (HCl) para precipitação isoelétrica da proteína, obtendo-se o concentrado protéico de levedura com 78% de proteína e 2,26% de RNA. O tratamento com perclorato ocasionou diminuição do conteúdo de lisina disponível e do escore químico (EQ=92%), quando comparado com as células de levedura rompidas (EQ=100%). O concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP) apresentou melhores índices de digestibilidade aparente, valor biológico e utilização líquida aparente, quando comparado com as células de levedura íntegras e rompidas. Os ensaios de toxicidade subcrônica revelaram que os ratos alimentados com dietas contendo concentrado protéico de levedura mostraram consumo protéico e ganho de peso, significativamente inferior ($p \leq 0,05$) aos grupos que receberam células de levedura rompida (CLR) e caseína (CAS). A ingestão de proteínas de leveduras causou alterações nos níveis séricos de aminotransferases e creatinina, os níveis de ácido úrico e uréia permaneceram dentro da faixa dos limites normais de referência. As excreções urinárias de creatinina; uréia e ácido úrico associados aos resultados séricos não revelaram injúrias renais provocadas pelas dietas. Nas análises de órgãos não foram observadas mudanças patológicas no conteúdo lipídico e protéico dos tecidos renais e cerebrais em consequência do consumo de proteínas de levedura, porém houve aumento no conteúdo de lipídios hepáticos e diminuição do teor de proteínas totais do fígado em ratos alimentados com células de levedura rompidas (CLR) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP).

SUMMARY

The objective of this research was the study of brewer's yeast as an alternative source of nutrients in human foods. Suspensions (40% v/v) debittered yeast cells were mechanically ruptured in Dynomill with 70% of its chamber filled with glass spheres (0.2 to 0.6 mm in diameter), 2,400rpm, feeding rate of 4.8 L/h and temperature of 15°C. Protein was extracted from the disrupted cells suspension with 0.5 M NaClO₄ and precipitated at isoelectric pH (4.2) with HCl solution. The precipitate (protein concentrate) contained, after washing and freeze drying, 78% protein and 2.26% RNA. Available lysine was only 92% compared to the broken cells suspensions and integral cells. The yeast protein concentrate presented higher apparent digestibility, apparent biological value and apparent NPU compared to lyophilized integral or broken cells suspension. The toxicological assays revealed that rats fed the protein concentrate showed reduced protein consumption and body weight gain ($p \leq 0.05$) relative to the groups receiving dehydrated broken yeast cells and casein. Yeast protein caused abnormal alterations of blood serum levels of aminotransferases and creatinine. The levels of uric acid and urea remained in the reference normal range. Urine excretion of creatinine, urea and uric acid, related to blood serum levels, did not show any organic injury that could be attributed to the diets. Organ analysis did not show pathological changes in the concentration of lipids and protein in the rat kidneys and brains due to yeast protein intake, however an increase in lipids and decrease in protein content was observed in the liver of rats fed yeast broken cells and the protein concentrate obtained with the sodium perchlorate treatment.

1. INTRODUÇÃO

A produção insuficiente de alimentos de alto conteúdo protéico e o agravamento da contaminação ambiental, tem impulsionado a procura de novos recursos e metodologias para enfrentar e solucionar os problemas de escassez e desnutrição alimentar.

Entre estes recursos encontram-se resíduos das mais variadas origens, que através de processamento adequado, podem ser convertidos em alimento para humanos, ração para animais, fertilizantes, etc. CARRASCO de MENDOZA et alii (1991); ROSALES (1984).

A proteína unicelular é considerada uma fonte promissora de proteína não convencional que possibilitará aumentar a oferta da dieta a nível mundial. O enorme interesse neste assunto levou a focalizar, com muita atenção, os microrganismos, especialmente as leveduras para a produção de proteínas destinadas à nutrição animal e humana, LYUTSKANOV et alii (1990); STATEVA et alii (1988).

Hoje em dia a levedura é reconhecida mundialmente como excelente fonte de proteínas, vitaminas do complexo B, fibras e muitos outros micronutrientes, ICIDCA (1988); REED & NAGODAWITHANA (1991).

Do ponto de vista tecnológico, as leveduras possuem algumas vantagens com relação a outros microrganismos pela sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos, alta velocidade de crescimento, além da sua biomassa ser facilmente separável, YOUSRI (1982).

De todas as espécies, o gênero *Saccharomyces* é a que tem demonstrado maior valor industrial e comercial, ICIDCA (1988), e qualidade nutricional superior devido ao seu alto teor de lisina, STATEVA et alii (1988). Por exemplo, foi comprovado que a levedura *Saccharomyces carlsbergensis* contem mais proteína e o

dobro de metionina, quando comparada com outras sete espécies de leveduras, POÓ & MILLÁN (1990).

No entanto existem alguns fatores que limitam o uso da sua proteína para o consumo humano, entre os quais podemos destacar:

- A presença de parede celular rígida a qual não é digerida pelas enzimas digestivas humanas, SNYDER (1970); GÁLVEZ et alii (1990).
- O alto conteúdo de ácidos nucleicos. A ingestão de quantidades significativas de ácidos nucleicos leva a acumulação de ácido úrico que pode cristalizar nos tecidos e órgãos causando pedras no trato urinário e deposição de cálcio nos tecidos moles, LYUTSKANOV et alii (1990).

Por estas razões se faz necessário o desenvolvimento de métodos de processamento da biomassa que permitam minimizar os problemas antes mencionados.

Tem sido demonstrado que concentrados e isolados protéicos obtidos a partir de células de levedura podem ter melhor qualidade nutricional do que as células integras, porque seu conteúdo de ácidos nucleicos, a presença de componentes ativos indesejáveis e o efeito deletéreo da parede celular sobre a biodisponibilidade da proteína são atenuados, ROSALES (1984).

Os processos tecnológicos empregados usualmente começam pela ruptura da parede celular, seguido da extração da proteína.

O método mais utilizado para a ruptura da parede celular é o mecânico, um dos quais se caracteriza pela utilização de moinhos com agitadores contendo no seu interior pérolas de vidro de 0,2 a 0,6mm. Neste processo a suspensão de células de levedura conjuntamente com as pérolas de vidro são submetidas a agitação, produzindo abrasão das pérolas com a parede celular, o que causa a ruptura da parede, possibilitando a extração da proteína e de outros componentes presentes nas células, WRIGHT et alii (1989).

Usualmente a extração do conteúdo intracelular é otimizado com soluções alcalinas, resultando na obtenção de proteínas associadas a ácidos nucleicos e outros componentes celulares solúveis. Isto significa que 50 a 60% da proteína isolada de levedura, por precipitação isoelétrica, pode existir na forma de um complexo nucleoprotéico contendo 10 a 15% de ácidos nucleicos, SCHWENKE et alii (1980); KINSELLA (1987).

Com base no raciocínio de que interações hidrofóbicas são críticas na estabilização do complexo nucleoprotéico e que as forças hidrofóbicas resultam da estrutura e das propriedades físicas da água, especula-se que agentes que modifiquem as propriedades físico-químicas da água possam ser usados na dissociação do complexo nucleoprotéico através do rompimento das interações hidrofóbicas, KINSELLA & DAMODARAN (1984).

Ânions caotrópicos, em concentrações que variam de 0,5 a 1,0M, foram efetivos na dissociação do complexo RNA-Proteína de levedura e reduziram o conteúdo de RNA das proteínas isoladas. Tais ânions como o perclorato ClO_4^- , tricloroacetato ($\text{Cl}_3\text{CH-COO}^-$) e tiocianato (SCN^-) a 0,5M reduzem o teor de RNA das nucleoproteínas acima de 80%, KINSELLA (1987).

No estudo de qualquer microrganismo como fonte não convencional de proteínas é necessário incluir a realização de avaliação nutricional e análises toxicológicas rigorosas, que garantam a sua inocuidade para o consumo humano, HERNANDEZ ROSALES et alii (1985).

Os ensaios biológicos para a avaliação da qualidade protéica incluem procedimentos fundamentados na medida de crescimento ou retenção de nitrogênio (balanço nitrogenado) em animais experimentais, em função da proteína teste ingerida como única fonte de nitrogênio. Para a avaliação da qualidade protéica dos alimentos, seria ideal desenvolver métodos para a avaliação em humanos, mas o custo e o tempo

empregado tornam esta análise proibitiva. Alternativamente, são utilizados métodos *in vivo* sendo o rato o animal mais utilizado , KIHLEBERG (1972); HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

Numerosas investigações têm feito uso de parâmetros metabólicos para prognosticar o valor nutritivo da proteína e seus possíveis efeitos tóxicos. O metabolismo de proteínas nos músculos e no fígado, crescimento muscular, número de células ou peso, concentração de proteínas hepáticas, atividade de diferentes enzimas relacionadas com a concentração de aminoácidos livres presentes no plasma sanguíneo e excreção de creatinina têm sido listados, HALÁSZ & LASZTITY (1991).

Durante os experimentos são observados os efeitos da proteína unicelular sobre o crescimento, consumo de ração e outros determinantes do valor nutritivo da fonte de proteína unicelular, aparência física (alterações de postura e locomoção); aparência das excretas, manifestações externas (olhos, narinas, pelo, rabo e região anal), SCRIMSHAW (1983).

Devem ser realizados exames clínicos periódicos; bioquímicos no sangue e na urina, testes de função renal ou hepática, exame da composição dos órgãos, PAG/UNU GUIDELINE Nº 15 (1983).

Considerando os motivos antes expostos, o presente trabalho teve como objetivos:

- Desenvolver a nível laboratorial, processos para o tratamento da biomassa de levedura (*Saccharomyces sp.*) proveniente da indústria de cerveja, com a finalidade de obter produtos que possam ser utilizados para o consumo humano.
- Caracterizar quimicamente a biomassa e seus respectivos derivados.
- Estudar a qualidade protéica dos diferentes produtos preparados através de análises químicas *in vitro* e de ensaios biológicos com ratos.

- Verificar possíveis efeitos tóxicos da biomassa e seus derivados em animais de laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A levedura é sem dúvida o microrganismo de maior importância econômica e comercial. Sob o ponto de vista industrial, no gênero *Saccharomyces* estão incluídas as mais importantes leveduras. Abrangendo quase todas as leveduras produtoras de álcool, que são utilizadas ainda para a fabricação de cerveja, do vinho, do pão e para a obtenção de invertase, RUSSELL et alii (1987) e EVANGELISTA (1989).

Atualmente as leveduras continuam a ser consideradas fonte importante de nutrientes, passando a constituir uma excelente matéria prima para a indústria de alimentos e para a indústria farmacêutica e cosmética, ALAIS & LINDEN (1991) e REED & NAGODAWITHANA (1991).

De acordo com DZIEZAK (1987) produtos à base de levedura vêm sendo extensivamente utilizados nas formulações de alimentos como flavorizantes para realçar o sabor de preparações (sopas, molhos, carnes). A inclusão em produtos cárneos proporciona não só uma melhoria do sabor como também reduz potencialmente os custos relativos ao uso de extrato de carne.

O uso de biomassa de levedura íntegra como fonte alimentícia apresenta duas limitações: por um lado a presença da parede celular rígida que reduz a biodisponibilidade de nutrientes e pode conter agentes alergênicos e fatores que ocasionam distúrbios gastrointestinais, por outro lado o alto teor de ácidos nucléicos, que formam, como um dos seus metabólitos o ácido úrico, o qual, pelo fato de ser pouco solúvel nos fluidos biológicos pode acumular-se quando, em excesso, e trazer problemas de ordem orgânica, MOURA (1986).

Segundo LITCHFIELD (1977) a levedura poderá ser uma boa alternativa para a produção de concentrados e isolados protéicos, com propriedades funcionais

desejáveis, permitindo a remoção das paredes celulares, de ácidos nucleicos e de outros eventuais fatores tóxicos.

Muitos métodos têm sido desenvolvidos para melhorar a qualidade nutricional e a eficiência da proteína de levedura, estes geralmente começam com a ruptura celular, seguidos da extração da proteína, ROSALES (1984).

2.1. Ruptura celular

Os principais métodos utilizados para promover a ruptura da parede celular de leveduras são: mecânico, ruptura por digestão enzimática e químico.

2.1.1. Métodos mecânicos

O estado físico no qual a proteína existe no material inicial, influencia as estratégias de extração.

As proteínas são naturalmente solúveis nos fluídos biológicos como plasma, urina ou outras secreções do tecido celular. Contrariamente, as proteínas que estão presentes dentro das células e tecidos necessitam, como etapa preliminar, o fracionamento . Esta, normalmente envolve a ruptura física da célula por homogeneizadores, sonicação, congelamento, seguido de centrifugação a baixa velocidade, para separar as células rompidas da proteína solúvel presente no sobrenadante, LILLEHOJ & MALIK (1989).

Os métodos mecânicos de desintegração celular permitem isolar as proteínas intracelulares e enzimas com um grau mínimo de desnaturação, HUMMEL & KULA (1989).

Diferentes equipamentos já foram utilizados para a ruptura da parede celular de levedura, entre eles podem ser citados moinhos simples com superfícies abrasivas,

moinhos com agitadores contendo no seu interior pérolas de vidro, desintegradores balísticos, moinhos cavitacionais, homogeneizadores de alta pressão e ultrasom, HALÁSZ & LÁSZTITY(1991).

O rompimento de células através de moinhos e homogeneizadores tem sido estudado por vários autores.

Estes processos envolvem a agitação de uma suspensão celular por uma rosca sem fim ou agitador de discos, sendo desta forma constantemente atritada contra pérolas de vidro com diâmetro de 0,2 a 0,6mm, as quais são colocadas dentro do homogeneizador, EDEBO & MAGNUSSON (1973).

Para aumentar a eficiência da ruptura celular em agitadores com partículas abrasivas tipo o dyno-mühle kd 5, pesquisadores como MOGREN et alii (1974); CURRIE et alii (1972) e LINDBLOM (1977) concluíram que as variáveis temperatura, concentração da suspensão, velocidade de agitação, fluxo de alimentação, tamanho das partículas abrasivas e recirculação da suspensão, devem ser estudadas.

FOLLOW et alii (1971) utilizaram o homogeneizador Manton- Gaulin 15M-8BA à temperatura de 4-5°C, operando sob alta pressão, conseguindo liberar 95% da proteína da suspensão celular em 30 minutos.

LINDBLOM (1977) constatou que a moagem no Dyno-mill de uma suspensão contendo 10-17% de células de *Saccharomyces cerevisiae* , conseguiu romper 98% das células .

MOGREN et alii (1973) constataram que a ruptura mecânica melhora o valor nutritivo da levedura (PER $1,66 \pm 0,06$ para $1,99 \pm 0,11$).

A avaliação dos diferentes métodos de ruptura celular é uma etapa importante da determinação do grau de rompimento celular da levedura. Para tais propósitos a quantificação da proteína (nitrogênio solúvel) é amplamente utilizada. O princípio do uso deste método é que, após a ruptura da parede celular, pode ser melhor avaliada a

proteína solúvel, visto que o solvente pode entrar na célula e solubilizar a proteína, HALÁZ & LASTITY (1991).

A eficiência da ruptura também pode ser quantificada, através da determinação da atividade de algumas enzimas tais como: glicose 6-fosfato desidrogenase, invertase, 6-fosfogluconato desidrogenase, glicose-6-fosfatase, fosfatase alcalina, fosfatase ácida e fumarase, FOLLOW et alii (1971) e GAVER & HUYGHEBAERT (1991).

2.1.2. Digestão enzimática

Todas as macromoléculas presentes nas células viáveis de levedura estão contidas dentro de uma membrana semipermeável que se encontra abaixo da parede celular. A parede celular proporciona o suporte mecânico necessário para manter o tamanho e o formato da célula. A autólise é o processo pelo qual os componentes celulares são solubilizados através da ativação de enzimas degradativas endógenas da levedura. Isto é factível pela aplicação cuidadosamente controlada de condições tais como temperatura, pH, tempo e a adição de certos agentes potencializadores. Tais condições levam à morte a população de células, sem a consequente inativação das enzimas degradativas que se encontram compartimentalizadas nas células vivas. Sob estas condições, importantes sistemas enzimáticos responsáveis por carrear o metabolismo celular, deixam de obedecer o delicado mecanismo de controle existente nas células vivas sadias. A morte celular causa uma desordem endógena, permitindo que as enzimas degradativas livres, ataquem indiscriminadamente seus substratos específicos. Este ataque causa a quebra de macromoléculas como proteínas e ácidos nucléicos em suas unidades básicas correspondentes, as quais são solúveis por natureza. Uma desordem intracelular resulta na desestruturação da parede celular com

a consequente perda da integridade das membranas semipermeáveis, permitindo que os componentes solúveis saiam para o meio extracelular, REED & NAGODAWITHANA (1991).

KNORR et alii (1979), observaram que o tratamento de células de levedura (*Saccharomyces carlsbergensis*) com enzimas líticas exógenas, tais como zimolase e lisozima ocasionou um considerável aumento na quantidade de nitrogênio e proteínas liberadas durante a incubação da suspensão celular.

Baseados em estudos bibliográficos, HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) sugeriram que as glicanases são as únicas enzimas, sejam elas de origem exógena ou endógena, capazes de promover uma lise efetiva da parede celular, sem a necessidade de que qualquer outra enzima faça parte do processo.

Cabe ressaltar que quando o principal propósito da extração de proteínas de levedura, é a produção de concentrado protéico, a ruptura da parede através da digestão enzimática é impraticável, uma vez que ocorrem grandes perdas de proteína devido à hidrólise, SCOPES (1982).

OBATA et alii (1977) encontraram que a *Oerskovia* sp. produz três tipos de hidrolases de glicanas de leveduras, das quais a hidrolase denominada F-L, é capaz de ocasionar a lise das células viáveis. Outra característica desta hidrolase é sua atividade proteolítica intensa a pH 9,0.

2.1.3. Métodos químicos

A parede celular apresenta uma estrutura complexa formada de polímeros de glicana, manana, quitina, lipídios, fosfato, esteróis e proteínas. A estabilidade da forma da célula de levedura é devida a existência de grande número de ligações dissulfídicas

e eletrostáticas pelas quais seus componentes formam um heteropolímero de carboidratos e proteínas.

A plasmólise é um fenômeno frequentemente usado para a manufatura de extratos devido à iniciação rápida do processo de degradação celular. O sal constitui o agente frequentemente utilizado para potencializar este efeito. Solventes orgânicos como o acetato de etila e o isopropanol também podem facilitar este processo. A levedura em presença de altas concentrações de sal no meio, começa a perder seu conteúdo hídrico em função do aumento da pressão osmótica do meio. Sob condições extremas como no caso da plasmólise, o conteúdo da membrana plasmática é liberado, sendo que o mesmo tende a ocupar apenas parte do volume celular, dentro da parede. A plasmólise prolongada resulta em morte celular, seguida do início dos processos degradativos celulares, REED & NAGODAWITHANA (1991).

O tratamento da biomassa de levedura com tolueno e acetato de etila, à temperatura de 35-40°C, promove a extração parcial dos componentes da parede celular e posteriormente as enzimas liberadas completam o processo, SCOPES (1982).

Pesquisadores como SHETTY & KINSELLA (1978); HUMMEL & KULA (1989) testaram o uso de tióis (mercaptoetanol, ditioneitol e monotioglicerol) na ruptura das ligações dissulfídicas da parede celular, alcançando com estes tratamentos a recuperação de aproximadamente 89% do nitrogênio presente nas células de levedura.

2.2. Extração e separação por precipitação de proteínas no pH isoeletrico

Após a ruptura da parede celular, os componentes celulares podem ser extraídos usando substâncias químicas fracas como por exemplo água, soluções salinas e soluções alcalinas, VANANUVAT & KINSELLA (1975).

A solubilidade das proteínas em água depende de numerosos parâmetros. Do ponto de vista termodinâmico, a solubilização corresponde a uma dissociação simultânea das moléculas do solvente e das moléculas de proteínas, prévia a uma dispersão destas últimas no solvente com uma superfície interfacial de máximo contato entre a proteína e o solvente. Portanto, para que a proteína possa solubilizar-se será necessário que ocorra uma interação com a água através da formação de pontes de hidrogênio, interações dipolo-dipolo e iônicas. A solubilidade depende fundamentalmente do pH, força iônica, tipo de solvente e temperatura, CHEFTEL et alii (1989); FENEMA (1989).

Uma proteína, com valores de pH superiores ou inferiores ao ponto isoelétrico, tem carga negativa ou positiva e as moléculas de água reagem com estas cargas contribuindo para a sua solubilização. As cadeias protéicas que apresentam cargas elétricas semelhantes, têm tendência à repulsão entre si e portanto a dissociar-se e desdobrar-se. Quando as variações de solubilidade de uma proteína são representadas em função do pH, é obtida uma curva com o formato de V ou U, onde o ponto mínimo de inflexão corresponde ao ponto isoelétrico (pI). Este comportamento foi utilizado para solubilizar algumas proteínas. A maior solubilidade e consequentemente a maior proporção de extração protéica é conseguida em pH alcalino, CHEFTEL et alii (1989).

Os íons de sais neutros aumentam a solubilidade das proteínas, já que reagem com suas cargas e diminuem assim a atração eletrostática entre as cargas opostas das moléculas protéicas vizinhas (salting-in). Por outro lado, quando a concentração salina é superior a 1M a solubilidade protéica diminui e pode levar a uma precipitação (salting-out). Isto ocorre porque o excesso de íons compete com a proteína para estabelecer ligações com o solvente. Efeito semelhante é produzido quando são adicionados determinados solventes orgânicos (acetona, álcool etílico) às soluções

protéicas aquosas. Estes compostos, diminuem a constante dielétrica do solvente e consequentemente, diminuem as forças de repulsão entre as moléculas, fato que ocasiona uma agregação e precipitação das proteínas, FENEMA (1989).

VANANUVAT & KINSELLA (1975), estabeleceram as melhores condições para a recuperação de proteína de *Saccharomyces fragilis* utilizando hidróxido de sódio 0,4%, cloreto de sódio 4%, e água, encontrando que a homogeneização da suspensão de células (5%) em NaOH 0,4% apresentou uma extração máxima (83%) quando comparada com a água (55%). Sendo assim, a recuperação da proteína isoelétrica (pH=4,3) do extrato alcalino foi de aproximadamente 88%.

Para a obtenção de isolados e concentrados protéicos, tem sido adicionado ao extrato alcalino, vários compostos capazes de promover a precipitação das proteínas de leveduras, entre os quais destacam-se: os ácidos, especialmente HCl, etanol 90%, sulfato de amônio, SHETTY & KINSELLA (1982) e ácido tricloroacético, WRIGHT et alii (1989).

A solubilidade do nitrogênio da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae* é superior a 75% próximo do pH 9,0 e a solubilidade mínima acontece na faixa de pH 3-5, SCHWENKE et alii (1980).

ROSHKOVA et alii (1986) obtiveram isolados protéicos de levedura após o fracionamento de biomassa de levedura de cervejaria e de produção alcoólica, do gênero *Saccharomyces*. Para tal utilizaram os métodos de extração alcalina, precipitação isoelétrica seguida da liofilização, resultando num produto com 65-70% de proteína, 10-12% de ácidos nucleicos e 1,0-1,5% de polissacarídeos.

O procedimento comumente usado para a extração de proteínas de levedura é o tratamento com solventes alcalinos (principalmente NaOH). A extração com álcali a pH 9-12 é o procedimento mais praticado, isto se o principal propósito é obter grande produção de proteínas. Porém, o inconveniente deste método está na grande quantidade

de contaminantes, especialmente os ácidos nucleicos que são extraídos juntamente com a proteína, HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

2.3 Avaliação da qualidade protéica

A função primordial de uma proteína alimentícia é fornecer os aminoácidos necessários para o anabolismo dos tecidos. Como é sabido, as proteínas orgânicas são objeto de uma incessante renovação (turnover) e/ou catabolismo liberando os aminoácidos que as constituem, de sorte que a reserva protéica de cada indivíduo está em constante renovação.

Se os aminoácidos liberados com o catabolismo fossem integralmente reutilizados para a síntese protéica o organismo não precisaria recorrer às proteínas exógenas (alimentares). Porém sabemos que sua reciclagem é parcial e que uma parte dos aminoácidos liberados pelo catabolismo é oxidado e excretado.

Todos os métodos de avaliação da qualidade protéica determinam, direta ou indiretamente, a eficiência relativa com que aquela proteína teste satisfaz as necessidades de aminoácidos essenciais do organismo. Assim quando a quantidade de aminoácidos ingeridos excede às necessidades para a síntese de tecidos, o excedente é excretado sob a forma de nitrogênio e o esqueleto carbônico dos aminoácidos é utilizado para a produção de energia. Comparando a quantidade de nitrogênio ingerido e nitrogênio excretado, pode-se obter o "balanço nitrogenado do animal". Portanto, após longos tempos o balanço de nitrogênio continua a ser a base dos métodos de avaliação da qualidade protéica das proteínas alimentares, DILLON (1991).

A determinação da qualidade da proteína pode ser feita através de métodos biológicos, químicos e microbiológicos, ROSALES (1984).

2.3.1. Métodos biológicos

O desenvolvimento do conhecimento científico nas áreas médicas e correlatas, há muito tempo utiliza-se da experimentação com animais. Essa idéia surgiu, principalmente, por questões éticas e econômicas. Mesmo com o progresso de métodos alternativos (estudos *in vitro*, culturas de células, etc.), os modelos animais ainda oferecem como principal vantagem o fornecimento de informações do organismo como um todo, fato que não é conseguido com os outros métodos, RIBEIRO et alii (1995).

Os estudos para avaliar a qualidade de novas fontes protéicas são geralmente realizados utilizando ratos jovens ou outros mamíferos de laboratório. Os ratos, por inúmeras razões, como a necessidade de animais econômicos e ecologicamente importantes, com alta taxa de reprodução, dieta variada e adaptação a grande variedade de habitats, acabaram sendo os mais empregados, BAKER et alii (1979).

Os bioensaios são métodos baseados na medida do crescimento (ganho de peso) ou na retenção de nitrogênio em função da proteína teste ingerida como única fonte de nitrogênio, PELLET & YOUNG (1980); TAGLE (1981).

Nos métodos baseados no incremento de peso corporal, são dignos de menção: o quociente de eficiência protéica (PER), o quociente de retenção líquida da protéica (NPR) e o valor de lactância (LV), TAGLE (1981). Os ensaios fundamentados na retenção de nitrogênio através da determinação do nitrogênio fecal e do nitrogênio urinário excretado, permitem determinar a digestibilidade (D), a utilização líquida da proteína (NPU), e o valor biológico (VB). Por convenção internacional estipulou-se usar nas experiências um nível de 10% de proteína na dieta. O suprimento de energia e de outros nutrientes deve ser adequado. Este nível permite a comparação entre diferentes proteínas, sendo que a qualidade da proteína teste é maior quando se

consomem níveis menores de proteína e diminui quando aumenta o consumo protéico, PELLET & YOUNG (1980).

2.3.2. Métodos químicos

A composição de aminoácidos de uma proteína, é a determinação química que se realiza primeiramente, para estimar o valor da mesma como fonte de nitrogênio para crescimento e manutenção. Desta forma uma análise do conteúdo de aminoácidos fornece informação acerca do valor nutricional potencial da proteína. Por outro lado permite quantificar os aminoácidos essenciais e observar se os mesmos foram destruídos por algum tratamento sofrido pela proteína. Cabe ressaltar que este método não reflete a biodisponibilidade dos aminoácidos, KIHLEBERG (1972).

Segundo PAG/UNU GUIDELINE Nº 6 (1983) a digestibilidade da proteína *in vitro* pode ser avaliada através da determinação da taxa de hidrólise por pepsina e/ou pepsina e tripsina, simulando as condições existentes no trato gastrointestinal. Desta forma baseados nos cálculos do conteúdo de aminoácidos essenciais e na hidrólise enzimática, é possível estimar o valor nutritivo da proteína.

Todos os métodos para determinação da digestibilidade *in vitro* se baseiam na utilização de enzimas do sistema digestivo simulando as condições fisiológicas.

Alguns autores como DESHPANDE & NIELSEN (1987) e AKESON & STAHPMAN (1964) usaram dois sistemas enzimáticos para promover a digestão protéica entre as quais destacam-se as associações tripsina/quimotripsina; pepsina/pancreatina.

Através de uma criteriosa revisão bibliográfica HALÁSZ & LÁSZTITY (1991) observaram que existe uma alta correlação para a digestibilidade aparente em ratos e a digestibilidade *in vitro*.

A disponibilidade dos aminoácidos essenciais tem grande influência sobre o valor nutritivo dos alimentos, portanto a avaliação individual destes aminoácidos é importante para verificar se não houve perda dos mesmos durante o processamento. No caso específico de proteínas de levedura, o aminoácido lisina é muito susceptível a perdas durante o processamento, motivo pelo qual é submetido a determinação química após a etapa de processamento do produto protéico, HALÁSZ & LÁSZTITY (1991). Sendo assim, a lisina aminoácido essencial para o crescimento, é considerado como um indicador do valor nutritivo das proteínas. Por tais razões KAKADE & LIENER (1969) desenvolveram uma técnica para determinar o teor de lisina disponível, onde os grupos α e ε -NH₂, em estado livre, reagem com o ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

2.3.3. Métodos microbiológicos

Os ensaios microbiológicos possuem algumas vantagens sobre os ensaios com ratos: são mais rápidos, necessitam menos espaço, custo e equipamentos, PELLET & YOUNG (1980).

O microorganismo mais utilizado para ensaios é a *Tetrahymena pyriformis*, visto que é um protozoário que possui necessidades de aminoácidos essenciais semelhantes às do homem e às do rato, PELLET & YOUNG (1981); HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

LYUTSKANOV et alii (1990), avaliaram a qualidade de um extrato protéico de *Saccharomyces cerevisiae* 211 através de um teste com *Tetrahymena*, fazendo uso de diferentes quantidades de extrato protéico adicionados ao meio de cultura e verificaram que as concentrações de extrato protéico utilizadas permitiram o crescimento normal das células de *Tetrahymena*.

2.4. Ácidos nucleicos

2.4.1. Teor de ácidos nucleicos nos alimentos

Elevados teores de ácidos nucleicos (AN) nos alimentos, é uma característica de células em rápido crescimento. Comparando com fontes protéicas não convencionais, os microorganismos contêm elevado teor de AN. Quando expresso em base protéica, possui entre 8 e 25g de AN por 100g de proteína. Altos conteúdos de RNA são encontrados em tecidos animais tais como: mucosa intestinal, pâncreas, fígado e rins. O fígado, por exemplo, contém aproximadamente 4g AN/100g de proteína, já a farinha de cereais, como o trigo e o centeio podem conter 1,1 e 4g de AN/100g de proteína, respectivamente, KIHLEBERG (1972).

2.4.2. Efeito da ingestão de ácidos nucleicos

Os AN da dieta são despolimerizados por nucleases do suco pancreático e convertidos em nucleosídeos por enzimas intestinais antes da absorção. Após absorvidas, as bases purínicas guanina e adenina, são metabolizadas, no homem e outras espécies monogástricas, a ácido úrico. O elevado consumo de purinas resulta no aumento dos níveis plasmáticos e excreção renal do ácido úrico, que por ser pouco solúvel nos fluidos fisiológicos, pode precipitar-se nos tecidos e articulações, propiciando o aparecimento da gota como também a presença de cálculos nos rins e bexiga. Esses efeitos adversos são menos intensos em alguns primatas e outros mamíferos que possuem a enzima urato oxidase (uricase), que converte o ácido úrico em alantoína, um metabólito solúvel e facilmente excretado, KIHLEBERG (1972).

Estudos feitos com dietas isentas de purinas e adicionadas de diferentes concentrações de ácido ribonucleico (RNA) de leveduras, ou com quantidades

variáveis de algas e leveduras, permitiram estabelecer a correlação existente entre níveis de AN na dieta e a concentração sérica de ácido úrico, bem como a sua excreção urinária, SNYDER (1970) e FERREIRA-PINTO & ARAUJO-NETO (1972).

Após exaustiva revisão e avaliação de trabalhos publicados e não publicados o "ad hoc Working Group", PAG (1975) concluiu que um limite de ingestão de 2g/dia de ácidos nucléicos provenientes de proteína unicelular não representa riscos para a saúde.

Até aqui foram abordados os aspectos negativos da presença de altos teores de AN nas fontes de proteína unicelular, contudo, cabe considerar que o RNA e seus produtos de degradação constituem substâncias valiosas para a pesquisa bioquímica e fisiológica, particularmente no campo da medicina e nutrição.

Nucleotídeos (5'-GMP e 5'-IMP) obtidos de RNA de levedura são empregados atualmente como flavorizantes pela indústria de alimentos, REED & NAGODAWITHANA (1991) e McNAIRNEY (1984).

LEE & LEWIS (1968), identificaram 9 nucleotídeos (NAD, ADP, GDP, CDP, GPP e adenosina, citidina, guanosina, uridina 5'-monofosfato), 5 bases nitrogenadas (adenina, guanina, citosina, uracila e hipoxantina) e 4 nucleotídeos (adenosina, citidina, uridina e guanosina), no meio de fermentação da *Saccharomyces carlsbergensis*. NUÑEZ et alii (1990), estudaram o efeito do uso de nucleotídeos (AMP, GMP, CMP, UMP e IMP) na dieta sobre o reparo da vilosidade intestinal de ratos com diarreia crônica, concluindo que os nucleotídeos dietéticos parecem ter um papel modulador do desenvolvimento intestinal após a diarreia crônica, podendo ter importantes implicações no crescimento do enterócito.

Os nucleotídeos 5'-CMP (cistidina monofosfato) e 5'-UMP (uridina monofosfato), possuem excelente valor para a indústria farmacêutica no preparo de drogas antivirais, REED & NAGODAWITHANA (1991).

2.4.3. Redução do teor de ácidos nucléicos

Nas células de levedura íntegras, as proteínas solúveis no citoplasma, proteínas ribossomais, proteínas ligadas à membrana plasmática e parede celular correspondem aproximadamente a 40, 40 e 20%, da proteína total, respectivamente. Durante a ruptura celular algumas proteínas citoplasmáticas se complexam com os ácidos nucléicos, formando complexos riboprotéicos. Isto implica que 50 a 60% da proteína isolada de células de levedura através de precipitação isoelétrica, pode existir na forma de um complexo nucleoprotéico, contendo de 10 a 15% de ácido nucléico, KINSELLA (1987).

Segundo KIHLEBERG (1972); OHTA et alii (1972) ; GIERHART & POTTER (1978) e BENASSI et alii (1990) o teor de AN das fontes protéicas unicelulares pode ser reduzido por uma série de processos citados a seguir:

- Limitação da taxa de crescimento microbiano por restrição de substrato contendo fósforo e carbono
- Processo de extração do RNA celular com NaCl a 10% aquecido a 80°C e pH 9,5. O rendimento da fração protéica é de 70 a 80%, contendo menos que 2% de AN.
- Hidrólise alcalina do RNA celular por tratamento com NaOH que hidrolisa o RNA e as proteínas extraídas são precipitadas e separadas.
- Degradação do RNA com enzimas endógenas. Por ação de choque térmico há desnaturação dos ribossomos e/ou ativação de ribonucleases endógenas e liberação do RNA e seus produtos de hidrólise pelas células. Por este processo, há redução de 85 a 90% dos AN de levedura.

- Degradação do RNA com enzimas exógenas. A adição de ribonuclease (RNase A pancreática bovina) ao meio com as células e aquecimento a 80°C, por 30 segundos, permite a redução de cerca de 80% dos AN celulares.

O rompimento das células pela desintegração mecânica foi considerado um processo eficiente para colocar em contato as RNases intracelulares e os ácidos nucléicos. Verificou-se que a adição de NaCl às células desintegradas ativou as RNases, porém, a incubação da suspensão sem NaCl inativou as enzimas. As RNases apresentaram uma atividade ótima na faixa de pH 5-6 e a temperaturas que variam entre 50 e 60°C, LINBLOM (1977). O sal pode agir na degradação estrutural dos ribossomas, com consequente quebra das interações eletrostáticas que estabilizam as moléculas, TREVELYAN (1976). HEDENSKOG & MOGREN (1973), constataram que após a precipitação da proteína, aproximadamente 90% do RNA pode ser precipitado pela adição de ácido ao sobrenadante.

Por outro lado reagentes químicos foram também usados para separar os ácidos nucléicos do material celular. Sabe-se que a proteína e o ácido nucléico formam um complexo através de interações eletrostáticas entre grupos catiônicos dos resíduos de lisina e grupos fosfato aniônicos dos ácidos nucléicos. Esse complexo pode ser desestabilizado em condições ácidas, facilitando assim a separação dos ácidos nucléicos. Para tanto foram induzidas modificações reversíveis no grupo ϵ -NH₂ da lisina, com o uso de anidridos ácidos (maléico ou citracônico), SHETTY & KINSELLA (1982).

Outros pesquisadores como DAMODARAN & KINSELLA (1984) e HUANG & KINSELLA (1986) estudaram o método de fosforilação do complexo nucleoprotéico de levedura para reduzir o teor de RNA utilizando como reagente fosforilante o oxiclreto de fósforo (POCl₃). Estes cientistas sugerem que a introdução de cargas negativas à proteína de levedura pode desestabilizar as interações não

covalentes existentes entre os AN e a proteína, facilitando a dissociação do complexo RNA-proteína.

O metanol também constitui um excelente agente separador do complexo nucleoprotéico, este consegue remover de 81 a 85% dos AN presentes nas células sem afetar o teor protéico e o perfil aminoacídico, ABU-RAWAIDA et alii (1988).

GONZÁLEZ & LÓPEZ (1986) isolaram RNA de levedura através da extração com acetona e fenol, obtendo um rendimento na faixa de 75 a 80%.

Sais caotrópicos como Cl_3CCOONa , NaClO_4 , usados em concentrações de 0,5M, conseguem dissociar o complexo nucleoproteína de levedura de cervejaria, removendo desta forma 80% do RNA presente na proteína isolada, DAMODARAN & KINSELLA (1983).

A eficiência de ação destes anions está diretamente associada à sua capacidade de modificar a estrutura da água, reduzindo assim os efeitos da entropia negativa que a acompanham, resultando na solução e dissolução da proteína ribossomal apolar nas moléculas de água. Estes grandes ânions causam mudanças na estrutura da água enfraquecendo as ligações hidrofóbicas existentes entre as proteínas na superfície do complexo nucleoprotéico. Este fato também pode causar mudanças conformacionais nos ácidos nucléicos. A dissociação da matriz protéica permite que as moléculas de água entrem no interior do complexo, aumentando a constante dielétrica nessas regiões. Este grande enfraquecimento das pontes de hidrogênio entre os componentes moleculares e o influxo concomitante e progressivo de íons, ocasionam um enfraquecimento das interações eletrostáticas. Esta cascata de eventos que se inicia pela alteração estrutural da água, facilita a dissociação do complexo proteína-RNA e consequente precipitação isoelétrica da proteína com 2% de AN, KINSELLA (1987).

Outro método utilizado para a remoção de RNA de proteína unicelular em homogenatos solúveis é a de resina de troca iônica descrito por LEWIS et alii (1982). Esta metodologia é baseada no fato de que em pH fisiológico (5-7) os ácidos nucleicos estão carregados negativamente e muitas proteínas estão próximas do seu ponto isoelétrico. Assim uma resina de troca aniônica pode permitir a remoção seletiva de ácidos nucleicos solúveis no homogenato microssômico. Para conseguir uma produção razoável de proteína, devem ser selecionadas condições para promover a solubilidade da fração RNA e reduzir as ligações deste com as proteínas. Isto é conseguido pela adição de agentes quelantes como o ácido cítrico e pelo uso da força iônica, a qual reduz as interações eletrostáticas proteína-AN.

2.5. Valor nutricional das proteínas de levedura

A determinação da proteína em microorganismos é feita multiplicando-se, usualmente, o teor de nitrogênio total obtido pelo fator 6,25, assumindo que a proteína contém 16% de nitrogênio, o que seria válido para um alimento de composição conhecida. Isto porém, é discutível para os microorganismos uma vez que no nitrogênio total inclui-se o nitrogênio não protéico proveniente dos ácidos nucleicos, purinas (8-13%), pirimidinas (4%), colinas (0,5%), glicosaminas (0,5%) e pequenas porções de outros constituintes que contribuem para o nitrogênio total. Somente 80% do nitrogênio total das células de levedura está na forma de proteínas, BRESSANI (1968).

Para a determinação do conteúdo de proteínas da levedura através do método de Kjeldahl, o mais apropriado para estimar a proteína pura é multiplicar o nitrogênio total pelo fator 5,5 com a finalidade de não superestimar o seu valor. O uso geral do fator 6,25, para o cálculo da proteína, têm tido consequências indesejáveis, uma vez

que subestima o valor nutricional da proteína expresso como quociente de eficiência protéica (PER), devido a que passa-se a assumir que os animais alimentados com a proteína teste consomem valores maiores do que o valor real, REED & NAGODAWITHANA (1991).

O conteúdo de aminoácidos da proteína de leveduras possui uma composição semelhante aos aminoácidos de proteínas de origem vegetal, especialmente leguminosas, TANNENBAUM (1977).

A proteína de levedura é deficiente em aminoácidos sulfurados, porém rica em lisina, KIHLEBERG (1972). Sendo assim, o seu alto conteúdo de lisina constitui um excelente suplemento para proteínas de cereais, as quais são geralmente deficientes neste aminoácido, REED et alii (1991).

A adição de metionina à biomassa de levedura resulta numa melhoria do seu valor nutricional, passando desta forma a obter índices iguais ou superiores àqueles encontrados para a caseína, CHIAO & PETERSON (1953).

É conhecido que a adição de 0,5% de metionina à dieta aumenta o valor de PER da proteína de levedura de panificação de 1,8 para 2,77, REED & NAGODAWITHANA (1991).

ARRIOLA et alii (1989), estudaram o efeito da suplementação de tortilhas à base de milho (TM), com um concentrado protéico obtido de *Saccharomyces cerevisiae*, e observaram que o PER para a tortilha controle e para as tortilhas enriquecidas foi de 1,86 e 2,05, respectivamente.

Ensaio realizado com ratos machos Wistar alimentados com biomassa de *Kluyveromyces marxianus var. lactis* por CARRASCO de MENDOZA et alii (1991) permitiram concluir, que a biomassa possui um valor biológico adequado (55,37%) para o seu uso na alimentação animal, principalmente quando se incorpora metionina, elevando-se a 60,23%.

Segundo TANNENBAUM (1977), a suplementação da levedura com 0,3% de metionina promove um aumento do NPU de 59% para a proteína não suplementada a 88% para a proteína suplementada e do valor biológico da proteína de 61% para proteína não suplementada a 91% para a proteína suplementada.

GÁLVEZ et alii (1990) analisaram uma mistura de biomassa de *Kluyveromyces fragilis* e proteínas de soro coaguladas, encontrando que o produto possui um alto conteúdo de aminoácidos sulfurados e triptofano, os quais são geralmente aminoácidos limitantes na biomassa.

O trabalho realizado por PÓO & MILLAN (1990) estabeleceu que o nível máximo de substituição de isolado protéico de soja pela proteína de *Saccharomyces carlsbergensis*, recuperada da indústria de cerveja, nas dietas iniciadoras para a alimentação de frangos, é de 50%. No mesmo estudo foi constatado que substituições iguais ou superiores a 75% implicam numa diminuição do crescimento e dos valores de PER e NPR.

Outra característica importante das leveduras no que se refere às suas propriedades nutricionais, é que elas são uma excelente fonte de vitaminas do complexo B, para o desempenho das funções celulares normais, tais como: crescimento, manutenção e reprodução.

As vitaminas do complexo B incluem o grupo dos compostos orgânicos hidrossolúveis derivados das purinas e pirimidinas (B₁, B₂, B₆, niacina e ácido fólico), complexos como a porfirina nucleotídeo (B₁₂), complexos aminoacídicos e ácidos carboxílicos (biotina e ácido pantotênico). As vitaminas participam em reações enzimáticas como ativadores de enzimas ou coenzimas (B₁, B₆, B₁₂, niacina, biotina e ácido pantotênico), na síntese de ácidos nucléicos (B₁₂, biotina e ácido fólico) e como ativadores das funções mitocondriais. A presença destas importantes vitaminas

nas leveduras faz delas um importante fator de crescimento em nutrição humana e animal, REED & NAGODAWITHANA (1991).

A levedura possui quantidades substanciais de macro e micronutrientes. O conteúdo mineral ou de cinzas varia de 8-10% da matéria seca. O fósforo, potássio, magnésio, cálcio e sulfato são os principais componentes das cinzas, HALÁSZ & LÁSZTITY (1991).

Recentemente estudos nutricionais têm mostrado que algumas dietas são deficientes em determinados micronutrientes. A suplementação destas dietas com levedura têm melhorado total ou parcialmente estas carências. Tais inadequações na dieta foram detectados devido à deficiência de cromo, selênio e molibdênio, REED & NAGODAWITHANA (1991).

A levedura de cervejaria é uma boa fonte de selênio e cromo. Estes dois elementos têm sido associados à potencialização da ação da insulina e da enzima glutathione peroxidase em estados diabéticos e na remoção de radicais livres, respectivamente. A importância do selênio para a nutrição humana e animal foi evidenciada em experimentos utilizando levedura de cervejaria. Assim o simples consumo de levedura de cerveja ajuda a prevenir estados carenciais de selênio que são caracterizados por: queda de cabelo, retardo do crescimento, deficiências reprodutivas, cardiomiopatias, necrose e degenerações do fígado e do pâncreas, LEVANDER (1989).

Foi observado que ratos alimentados com dietas pobres em levedura de cerveja, desenvolvem intolerância à glicose. Anos mais tarde, o cromo trivalente foi identificado como componente do fator de tolerância à glicose (GTF). O mecanismo pelo qual a GTF restaura a intolerância à glicose ainda não está completamente elucidado. Sabe-se que o cromo atua como potencializador da insulina, sendo co-fator essencial para sua atividade, não apresentando nenhum efeito fisiológico na ausência

deste hormônio. Um possível mecanismo de ação, seria a atividade catalítica na formação de pontes de dissulfeto entre a insulina e grupos sulfidríla de receptores, colaborando para aumentar o fluxo de glicose através da membrana, ALVAREZ LEITE (1987).

Quando a levedura é utilizada como fonte protéica, o material que constitui sua parede celular é indesejável porque reduz o valor biológico da massa celular e pode conter agentes alergênicos e fatores que ocasionam distúrbios gastrointestinais, MOURA (1986).

O isolamento da proteína unicelular melhora sua digestibilidade. A digestibilidade da proteína da biomassa varia de 75 a 95%, KIHLEBERG (1972) e SCRIMSHAW (1983). Entretanto, existem vários trabalhos indicando distúrbios gastrointestinais tais como náuseas, vômitos, flatulência e diarreia em virtude da ingestão de células intactas, SCRIMSHAW (1975) e MOURA (1986).

Em alguns estudos foi constatado que para as leveduras serem utilizadas sem inconvenientes na alimentação de animais devem ser mortas através do processo de desidratação, o qual provoca ruptura da parede celular, facilitando assim a digestão. Células intactas apresentam menor digestibilidade e menor valor nutritivo, BRESSANI (1968).

As leveduras vivas quando ingeridas, apresentam a tendência de se comportar como parasitas, isto é, apesar do seu elevado teor de algumas vitaminas, elas se utilizam de outras contidas no bolo alimentar, chegando a provocar verdadeiras avitaminoses, DESMONTS (1968).

OMSTEDT et alii (1973), avaliaram a qualidade nutricional da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, através da quantificação da síntese protéica dos ribossomos dos músculos esqueléticos de rato *in vitro*, encontrando que a desintegração mecânica da levedura liofilizada melhora a taxa de síntese protéica.

COZZOLINO (1982), observou o desempenho nutricional e reprodutivo de três gerações de ratos alimentados com biomassa de *S. cerevisiae* cultivada em melaço de cana de açúcar e concluiu que:

- Os ratos alimentados com teores de 10 e 25% de proteína de levedura apresentaram valores de PER e ganho de peso corporal significativamente menores do que a caseína na primeira geração. Na segunda e terceira geração o crescimento foi ainda mais retardado que aquele constatado na primeira geração, especialmente ao nível de 10% de proteína de levedura.

- Houve um decréscimo na fertilidade dos machos para ambas as dietas.

- A digestibilidade foi de 90 e 80% para a caseína e para a proteína de levedura, respectivamente.

2.6. Avaliação da segurança da proteína de levedura utilizada como fonte alimentar

Os primeiros métodos de avaliação da segurança de alimentos visavam demonstrar os seus efeitos tóxicos agudos. Atualmente em alimentos abordam-se aspectos nutricionais, de aceitabilidade e de segurança dos novos produtos utilizados para consumo humano e animal. Tais necessidades aplicam-se a novas variedades de alimentos convencionais, onde a composição foi alterada geneticamente e principalmente em produtos alimentícios desenvolvidos por isolamento de fontes não convencionais, tais como algas, bactérias e leveduras, LITCHFIELD (1977).

Experiências realizadas em testes de alimentação de curto e longo prazo, usando animais de laboratório, têm demonstrado que a ingestão de microorganismos em pequena quantidade, aparentemente segura, pode vir a induzir reações adversas

(náuseas, desconforto, hipersensibilidade, etc) no homem, que não são observáveis em estudos com animais, SCRIMSHAW (1983).

Estes fatos foram determinantes para que o "Protein Advisory Group" (PAG) tenha estabelecido uma série de procedimentos para a avaliação da segurança de alimentos que utilizam fontes não convencionais de proteínas, que podem variar com a fonte microbiana, o substrato e o processo utilizado na produção da fonte protéica, SCRIMSHAW (1983).

De acordo com o protocolo Nº 6 do PAG/UNU GUIDELINE Nº 6 (1983) para a avaliação da segurança, é necessário obter os seguintes dados:

- Informação a respeito dos métodos de produção.
- Propriedades químicas e físicas
- Qualidade microbiológica e seus metabólitos
- Efeitos toxicológicos em animais de laboratório
- Resposta em indivíduos humanos sádios

2.6.1. Testes toxicológicos para proteína unicelular

Vários pesquisadores têm sugerido regras e protocolos que devem ser seguidos rigorosamente quando se deseja avaliar a toxicidade de uma nova fonte alimentar, PAG/UNU GUIDELINE Nº15 (1983); ROSALES (1984) e SOBOTKA (1992), entre os quais destacam-se:

- Testes de toxicidade aguda (2 semanas)
- Estudos subcrônicos (3 meses)
- Estudos crônicos (2 anos)
- Estudos multigeracionais (3 gerações)
- Estudos teratogênicos (20 dias)

- Estudos de mutagenicidade (15 - 20 dias)

Os testes de toxicidade mencionados são comumente realizados em animais de experimentação tais como ratos, camundongos, cobaias, cães, porcos, aves domésticas, bezerros e primatas. Os animais devem estar em bom estado clínico e isentos de patógenos específicos, SCRIMSHAW (1983).

O rato é o animal mais utilizado em estudos fisiológicos, metabólicos e de toxicidade, pelo fato de suas enzimas estarem aptas para metabolizar o material teste. Animais pesando aproximadamente 100g são geralmente usados para testes pré-clínicos de segurança, por apresentarem um crescimento rápido, e a redução na taxa de ganho de peso corporal é o parâmetro mais sensível para observações toxicológicas. Este roedor atinge sua maturidade sexual durante o período de estudos de toxicidade subcrônica, podendo portanto se avaliar o efeito sobre o sistema reprodutivo, BRIGGS & OEHLME (1980).

Segundo KIHLEBERG (1972); SCRIMSHAW (1983) e SOBOTKA (1992), durante os experimentos devem ser observados os efeitos do alimento em estudo sobre o crescimento, consumo de ração e outros determinantes do valor nutritivo da proteína unicelular, aparência física (alterações de postura e locomoção), aparência das excretas, manifestações externas (olhos, narinas, pelo, rabo e região anal).

Entre os exames clínicos e laboratoriais os autores referenciados sugerem que sejam realizados exames periódicos (1, 3, 6, 9, 12, 18 e 24 meses) bioquímicos e citológicos no sangue e urina (glicose, lipídios, proteínas, substâncias nitrogenadas não protéicas, enzimas, etc.); teste de função renal ou hepática; reflexos neurológicos; eletrocardiograma; eletroencefalograma e exame histológico dos órgãos após o experimento. Os animais que sucumbem durante o período de experimentação também devem ser necropsiados. Quando necessário, realizam-se determinações dos metabólitos da fonte protéica no sangue, tecidos e produtos de excreção dos animais.

Em ensaios de toxicidade subcrônica durante 90 dias são utilizados um número de 20 a 25 animais por grupo, BRIGGS & OEHLME (1980). Neste caso, de acordo com MOURA (1986), a dieta utilizada deve conter 10, 20 e 30% de proteína de levedura. No entanto a prática mais empregada, é o uso de um conteúdo protéico de 30% , HALÁSZ & LASZTITY (1991).

Os testes de função hepática e renal incluem a determinação sérica das transaminases, fosfatase alcalina, uréia, glicose, além de determinar o peso do fígado e dos rins, RINGLER & DABICH (1979) e BRIGGS & OEHLME (1980)

Com a finalidade de mostrar a importância da determinação bioquímica sérica e/ ou urinária de compostos nitrogenados não protéicos (creatinina, uréia e ácido úrico) e de enzimas como as aminotransferases, será feita uma breve abordagem sobre estes compostos.

Uréia: A uréia é um composto nitrogenado excretado na urina, produto do metabolismo de proteínas, sintetizado no fígado a partir da amônia, derivado predominantemente do metabolismo de proteínas por bactérias intestinais e de vários aminoácidos do qual a alanina é o mais importante. A uréia é filtrada pelos glomérulos, sendo que aproximadamente 40% é reabsorvida pelos túbulos através de difusão passiva, RAVEL (1995).

De acordo com GUYTON (1984), a amônia liberada durante a desaminação de aminoácidos é quase totalmente removida do sangue mediante a conversão em uréia, através do ciclo da uréia.

Se essencialmente toda a uréia formada no corpo humano é sintetizada no fígado, na ausência do mesmo ou na presença de alguma doença hepática grave, a amônia se acumula no sangue. Esta por sua vez é extremamente tóxica, em particular

para o cérebro, determinando na maioria dos casos um estado conhecido por coma hepático.

A Figura 1 ilustra, esquematicamente, os mecanismos de formação e de excreção da amônia, sendo muito importante o ciclo da uréia, que ocorre principalmente no fígado.

O nível de uréia no plasma é notadamente afetado pela função renal, pelo conteúdo protéico da dieta e pelo catabolismo protéico, MOTTA (1989).

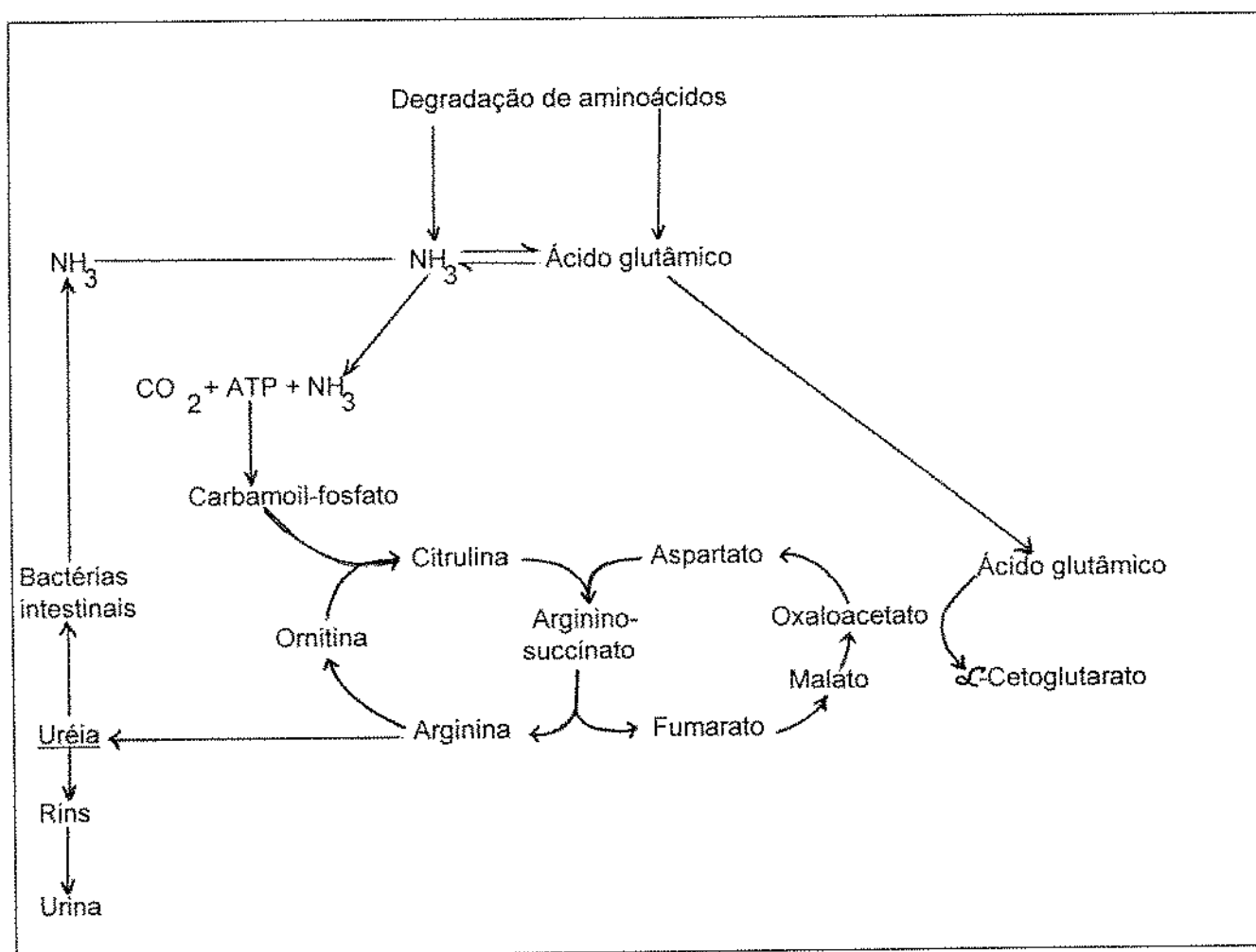


Figura 1. Ciclo da uréia. Fonte : MUNRO & CRIM (1989)

Creatinina: A creatinina é produzida no músculo, a partir da creatina . A creatina por sua vez, é sintetizada no fígado, rim e pâncreas e é transportada para as células musculares e cérebro, onde é fosforilada a creatina-fosfato (substância que atua como reserva de energia metabólica). Tanto a creatina-fosfato como a creatina, em condições fisiológicas, perdem espontaneamente o radical fosfato ou água, respectivamente, para formar seu anidrido , a creatinina. A creatinina difunde do músculo para o plasma de onde é removida, quase que exclusivamente , pela filtração glomerular, sendo excretada na urina. Em presença de teores marcadamente elevados de creatinina no plasma, parte da mesma é excretada também pelos túbulos renais, MOTTA (1989).

A taxa de produção diária de creatinina é relativamente constante e se encontra presente de forma estável nos níveis sanguíneos, RAVEL (1995).

A elevação do teor de creatinina no sangue se dá na insuficiência renal, quando a taxa de uréia, já está aumentada, na nefrite incipiente, na glomerulonefrite com uremia (35mg/dL). Taxas acima de 5mg/dL evidenciam insuficiência renal pronunciada. Nas obstruções urinárias, por afecções da prostata, bexiga, ureter, bem como oligúria provocada pela nefrolitíase, verificam-se índices muito elevados, porém reversíveis pela remoção da causa de obstrução, LIMA et alii (1989).

Qualquer condição que reduz a velocidade de filtração glomerular promove uma menor excreção urinária de creatinina com o consequente aumento na concentração plasmática da mesma. Como a velocidade de excreção da creatinina é relativamente constante e sua produção não é influenciada pelo metabolismo protéico ou outros fatores externos, a concentração de creatinina sérica é uma excelente medida de avaliação da função renal, MOTTA (1989)

Segundo RAVEL (1995), considerações teóricas e clínicas têm mostrado que a determinação da creatinina pode ser melhor empregada para observar a velocidade de filtração glomerular do que as concentrações de uréia.

Ácido úrico: O ácido úrico é o principal produto final do metabolismo das purinas (adenosina , guanosina) no homem, LIMA et alii (1989) ; MOTTA (1989).

Os nucleotídeos das purinas são degradados por uma via onde o grupo fosfato é perdido pela ação da 5 -nucleotidase. O adenilato produz a adenosina, que é então desaminada a inosina, sendo então hidrolisada para produzir uma base púrica, a hipoxantina e a D-ribose. A hipoxantina é oxidada sucessivamente a xantina , formando posteriormente o ácido úrico, pela ação da xantina-oxidase, uma flavoenzima complexa que contém um átomo de molibdênio e quatro centros ferro-sulfurados no seu grupo prostético. O oxigênio molecular é acceptor de elétrons nesta complexa reação.

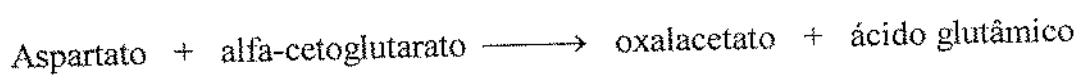
O catabolismo do GMP também produz urato como produto final. O GMP é primeiro hidrolisado produzindo o nucleosídeo guanosina que é clivado formando assim a guanina livre. A guanina livre sofre remoção hidrolítica do seu grupo amino produzindo a xantina, a qual é convertida em urato pela xantina oxidase. O ácido úrico é o produto final de excreção do catabolismo das purinas nos primatas. Entretanto em outros vertebrados o ácido úrico é degradado ao produto de excreção alantoína pela ação da urato oxidase (uricase), LEHNINGER (1984).

Como resultado da contínua renovação das substâncias contendo purinas, quantidades constantes de ácido úrico são formadas e excretadas. O ácido úrico é transportado pelo plasma até os rins, onde é filtrado pelos glomérulos. Quase todo o ácido úrico é reabsorvido pelos túbulos proximais e pequenas quantidades são excretadas pelos túbulos distais e eliminadas na urina. Os triglicerídios, os corpos cetônicos e o lactato competem com o urato na excreção renal. Parte do urato é

excretado pelo trato gastrointestinal e degradado pelas enzimas bacterianas, MOTTA (1989).

O aumento da uricemia pode ocorrer por redução da excreção renal ou pelo excesso de produção. Os valores aumentados são observados em todas as formas de insuficiência renal com azotemia e pode muitas vezes, preceder o aumento de uréia sangüínea na obstrução do trato renal (litíase renal, hipotireoidismo, insuficiência cardíaca congestiva), LIMA et alii (1989).

Aminotransferases ou transaminases: As enzimas aspartato aminotransferase, AST (transaminase glutâmico-oxalacética, GOT) e a alanina aminotransferase, ALT (transaminase glutâmico-pirúvica, GTP) catalizam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o alfa- cetoglutarato, formando cetoácido e ácido glutâmico. Estas reações necessitam piridoxal-fosfato como coenzima:



As reações catalizadas pelas aminotransferases (transaminases) exercem papéis centrais tanto para a síntese como para a degradação de aminoácidos. Além disso, como estas reações envolvem a interconversão dos aminoácidos a piruvato ou ácidos dicarboxílicos, atuam como uma ponte entre o metabolismo dos aminoácidos e carboidratos, MOTTA (1989).

As aminotransferases são enzimas cuja síntese depende da piridoxina, uma das vitaminas do complexo B. Sem essa vitamina os aminoácidos não essenciais não podem ser sintetizados e portanto a formação de proteínas não se processa normalmente, GUYTON (1984).

As aminotransferases sobretudo a AST, estão presentes em bactérias e em todos os tecidos animais, existindo em quantidades apreciáveis no miocárdio, fígado, músculos esqueléticos, cérebro, rins e testículos.

Assim qualquer lesão com destruição celular desses tecidos (com excessão do cérebro) provoca apreciável aumento de atividade dessas enzimas no sangue, LIMA et alii (1989).

A ALT por sua vez é uma enzima encontrada predominantemente no fígado, porém existe em quantidades moderadas nos rins e em pequenas quantidades no músculo esquelético e coração.

Em geral grandes aumentos de ALT são devidos a doenças hepáticas, tecidos lesados em grandes extensões nos outros órgãos antes mencionados, também podem afetar os níveis séricos, RAVEL (1995).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Planejamento experimental

3.1.1. Preparo de material (amostras) para a pesquisa

Para a execução da pesquisa planejou-se trabalhar com as seguintes amostras:

a) Células de levedura (*Saccharomyces sp.*) íntegras originárias de cervejarias e gentilmente fornecidas na forma de células frescas em suspensão aquosa, devidamente limpa e desamargada pela firma PRODESA, sediada em Campinas.

b) Células de levedura rompidas mecanicamente em moinho "dynamill".

c) Concentrado protéico obtido a partir de suspensões de células rompidas após tratamento com perclorato de sódio, precipitação da proteína no pH isoelétrico e centrifugação para eliminação dos componentes não precipitáveis, nesse pH. Fluxogramas para o rompimento mecânico das paredes celulares e para o isolamento da proteína na forma de concentrado protéico são mostrados nas Figuras 2 e 3.

3.1.2. Estudos planejados

A partir das amostras obtidas como descrito em 3.1.1, os seguintes estudos foram conduzidos:

a) determinação da concentração química centesimal e da composição de aminoácidos das três amostras objetos de estudo.

b) determinação *in vitro* de alguns índices de avaliação nutricional.

c) ensaios biológicos para determinação *in vivo* do valor nutritivo das proteínas das três amostras comparativamente à caseína.

d) ensaios biológicos de curta e média duração (45 e 90 dias) para avaliação da toxicidade subcrônica eventualmente presente no material.

Os resultados dos ensaios biológicos, tanto para avaliação nutricional como nos testes toxicológicos, foram submetidos à análise estatística, ANOVA e testes de Tukey para médias, utilizando o programa estatístico SANEST, elaborado por ZONTA & MACHADO (1988).

Detalhes do processo de ruptura mecânica, dos métodos analíticos e da execução dos ensaios biológicos são descritos a seguir.

3.2. Ruptura mecânica das paredes celulares

Foi utilizado o método de ruptura mecânica, de acordo com HEDENSKOG & MOGREN (1973).

Para a ruptura das células de levedura foi utilizado o equipamento Dynamill tipo KDL, com eixo de discos agitadores de 80mm de diâmetro e câmara de moagem com capacidade de 1,4 L. Nesta fase foram estudadas as seguintes variáveis: concentração, fluxo de alimentação, velocidade rotacional do equipamento, recirculação da suspensão de leveduras pelo moinho. A temperatura da suspensão de levedura e do equipamento foi mantido entre 5-15°C pela circulação de etilenoglicol como líquido refrigerante, que circula pela camisa dupla existente ao redor da câmara do moinho.

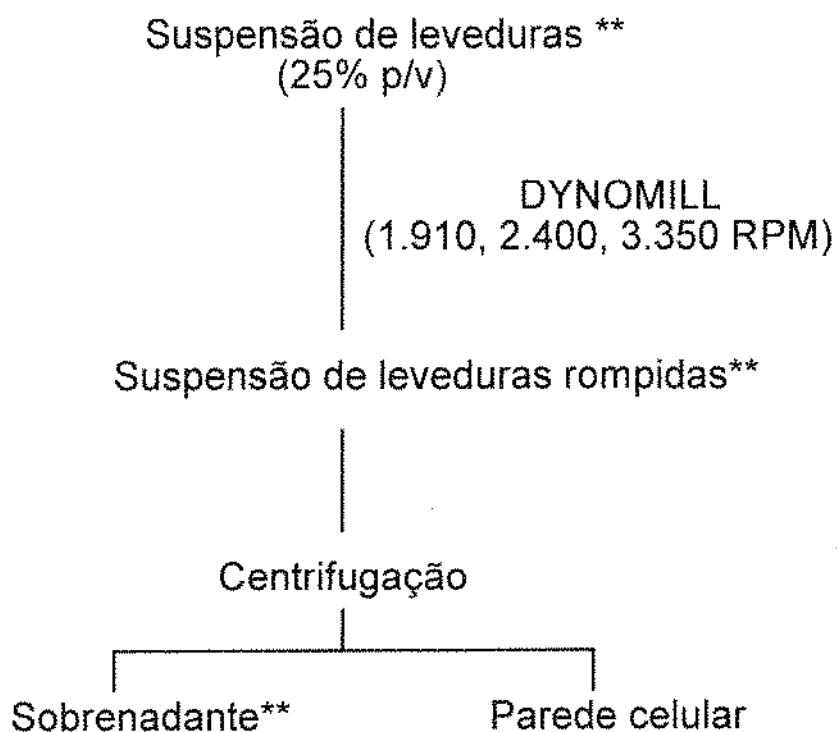
Numa primeira etapa foi empregada uma suspensão de levedura em água com 25% de células frescas, pH ajustado para 8,0 com uma solução a 10% de carbonato de cálcio. Foram utilizadas esferas de vidro com diâmetro de 0,2 a 0,6 mm, as quais ocuparam 70% da câmara de moagem e o fluxo de alimentação regulado para 2,4 L/h, sendo recirculado 3 (três) vezes. Nestas condições foram testadas 3 velocidades de moagem: 1.910, 2.400 e 3.350 rpm. A eficiência da ruptura celular foi avaliada pela dosagem de nitrogênio total na suspensão de células íntegras e pela quantidade de

nitrogênio solúvel no sobrenadante, após a suspensão de células rompidas ter sido centrifugada a 10.000 rpm durante 30 minutos.

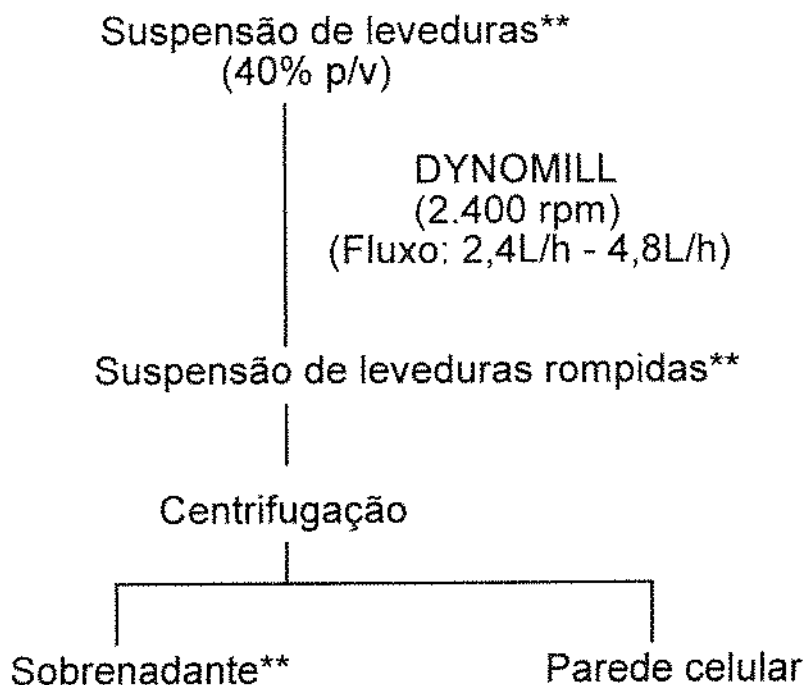
Numa segunda etapa fixou-se a velocidade do equipamento em 2.400 rpm, por ter-se mostrado a melhor velocidade de ruptura, ocupação de 70% da câmara com esferas de vidro. Variou-se a concentração da suspensão de levedura de 25 para 40% p/v e o fluxo de alimentação para 4,8 L/h.

O fluxograma de rompimento e de monitoramento da eficiência do processo é mostrado na Figura 2.

Etapa-1



Etapa-2



** determinação de KJELDAHL e teor de sólidos.

Figura 2. Processo de ruptura da parede celular de levedura de cervejaria.

3.3. Curva de solubilidade da proteína em função do pH

Foram realizadas extrações na faixa de pH entre 2 e 12, em água destilada, sendo os pHs ajustados com NaOH ou HCl 0,1N. As suspensões foram deixadas em agitação durante 1 hora à temperatura ambiente e o nitrogênio solúvel no sobrenadante foi determinado pelo método semi-micro Kjeldahl .

3.4. Extração e isolamento da proteína com baixo teor de ácidos nucleicos

A suspensão de levedura rompida, sofreu correção de pH para 8,0 com Na_2CO_3 a 20% sob agitação continua durante 10 minutos e à temperatura de 25°C. A seguir a suspensão foi centrifugada a 20.000 xg durante 15 minutos a 5°C. Ao sobrenadante (extrato protéico) acrescentou-se NaClO_4 até atingir uma concentração de 0,5M . Em seguida adicionou-se ácido clorídrico 6N até pH 4,2 (ponto isoelétrico da proteína de levedura) e o precipitado foi obtido por centrifugação. A proteína isoelétrica foi lavada 2 vezes com água destilada a pH 4,2 na proporção de 1:10. A proteína isoelétrica foi ressuspensa em água, neutralizada com solução de NaOH até pH 6,0 - 7,0 e em seguida liofilizada, como mostra o fluxograma da Figura 3.

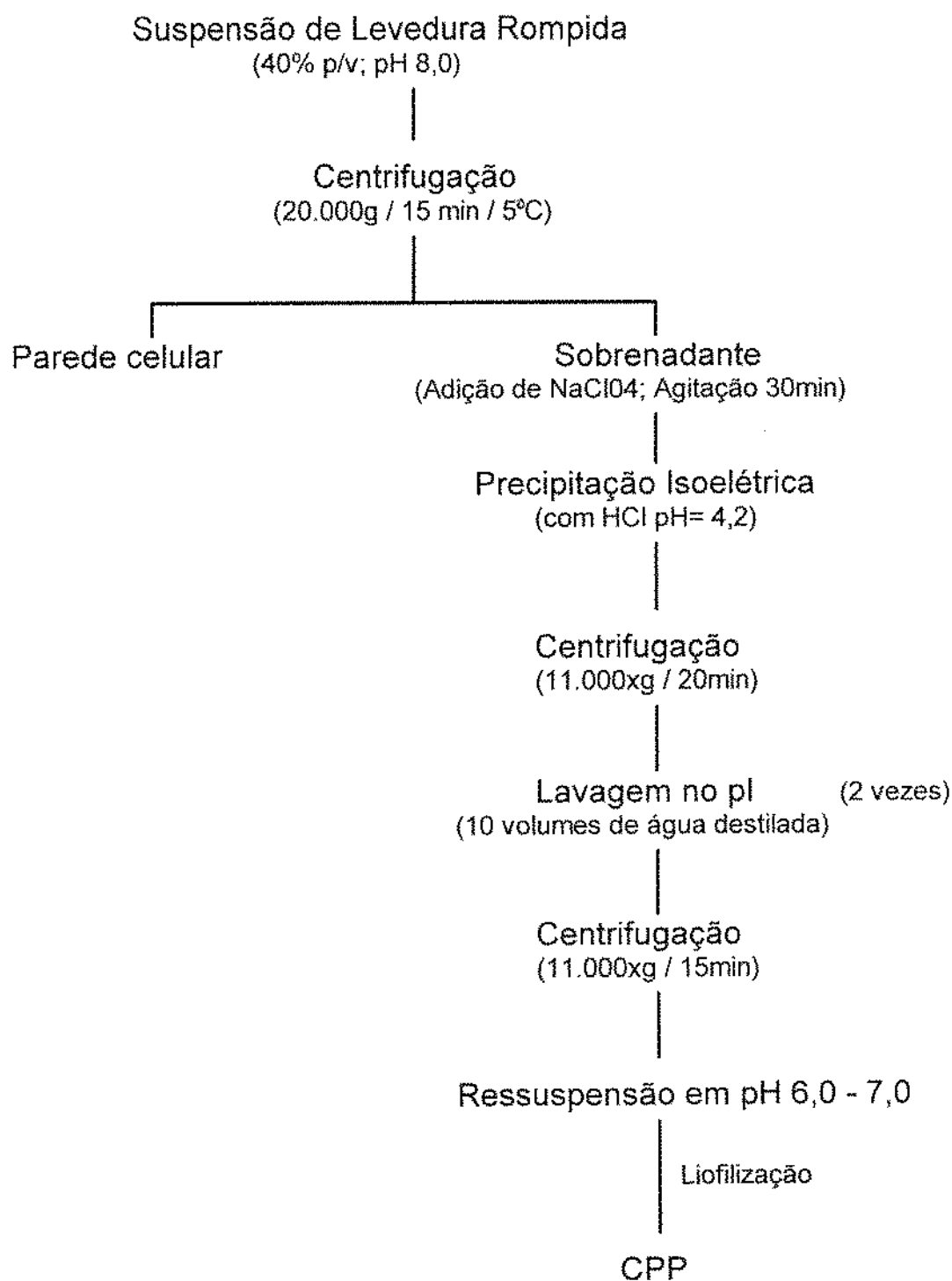


Figura 3. Método de extração da proteína de levedura com perclorato de sódio (CPP).

3.5. Determinação da composição química da biomassa e da proteína isolada

Umidade: determinada segundo a AOAC (1975), em estufa de circulação de ar quente a 105°C até peso constante.

Lipídios totais: segundo procedimento descrito por BLIGHT & DYER (1959), após extração com solventes orgânicos próprios, seguido de determinação gravimétrica.

Proteína bruta: através da dosagem do nitrogênio total (Kjeldahl), AOAC (1975). A conversão da porcentagem do nitrogênio total em proteína bruta foi feita multiplicando-se pelo fator 5,5 REED & NAGODAWITHANA (1991).

Fibra solúvel e insolúvel: determinada pelo tratamento com enzimas digestivas (pepsina / pancreatina), precipitação alcoólica da fração solúvel, incineração e determinação gravimétrica ASP et alii (1983).

Cinzas: determinado nas amostras após carbonização e incineração das amostras em mufla (550°C) de acordo com procedimentos indicados no AOAC (1975).

Carboidrato total: dosagem colorimétrica, utilizando o reagente fenol-ácido sulfúrico pelo método de DUBOIS et alii (1959).

Ácido ribonucléico (RNA): o RNA foi extraído das amostras com ácido perclórico 0,5M à temperatura de 37°C por 2 horas. O conteúdo de RNA foi

determinado espectrofotometricamente com o reagente de orcinol, segundo metodologia descrita por HEBERT et alii (1971).

Composição aminoacídica: aminogramas foram determinados em analisador automático Beckman, com base no procedimento de SPACKMAN et alii (1977), consistindo na hidrólise das amostras protéicas com HCl 6N por 22h a 110°C, evaporação completa do ácido à vácuo, seguido de dissolução dos aminoácidos, em tampão apropriado. Os aminoácidos dissolvidos são injetados na coluna de troca iônica, onde ocorre a separação. A quantificação é feita pela derivatização pós-coluna com ninidrina (2,2-dihidroxi-1,3-dionaidantina) e leitura colorimétrica.

Para determinação do triptofano utilizou-se hidrólise com LiOH 4N durante 24h a 110°C, seguido de quantificação pelo mesmo método.

3.6. Avaliação nutricional *in vitro*

3.6. 1. Escore químico (EQ)

Foi calculado a partir do aminograma utilizando como padrão de referência a FAO/WHO/UNU(1985), de acordo com HENLEY & KUSTER (1994).

$$EQ = \frac{\text{mg de aminoácidos / g N da proteína teste}}{\text{mg de aminoácidos / g N da proteína padrão ou referência}}$$

O EQ é representado pelo menor quociente encontrado entre todos os aminoácidos essenciais; que é determinado pelo aminoácido limitante da proteína experimental.

3.6.2. Digestibilidade *in vitro*

Determinada de acordo com o procedimento preconizado por AKESON & STAHPMAN (1964), no qual é utilizado um sistema enzimático composto por pepsina / pancreatina.

Aliquotas de 0,5g de amostra foram incubadas inicialmente com pepsina (relação enzima e substrato = 1:22) em ácido clorídrico 0,1N a pH de 1,5 por 3h a 37°C, sob agitação constante; a seguir, a reação foi interrompida pela adição de NaOH 0,1N para correção do pH em torno de 8,0 e incubadas por 24h com pancreatina em tampão fosfato pH 8,0 a 37°C, sob agitação constante.

Ao finalizar este período, as proteínas não hidrolisadas pelo sistema enzimático foram precipitadas com ácido tricloroacético 30% e separadas por centrifugação (12.000 xg / 20min). No sobrenadante foi determinado o nitrogênio pelo método semi-micro Kjeldahl .

A digestibilidade foi calculada pela relação:

$$D(\%) = \frac{N_h - N_b}{N_t} \times 100$$

onde,

N_h = nitrogênio no hidrolisado

N_b = nitrogênio do branco (enzima)

N_t = nitrogênio total

3.6.3. Lisina disponível

Para determinação da lisina quimicamente disponível os grupos α e ε -NH₂, desde que estejam livres, reagem com o ácido 2,4,6-trinitrobenzenosulfônico (TNBS), um agente alquilante, resultando como produto o derivado trinitrofenil de coloração amarela, que pode ser quantificado espectrofotometricamente em 346 nm de comprimento de onda .

Uma vez que o grupo N-terminal da cadeia (α -NH₂) como os grupos ε -amino da lisina (ε -NH₂) reagem com o TNBS; é necessário hidrolisar a proteína após reação com TNBS e logo após proceder à separação dos grupos ε -TNP solúveis em água dos grupos α -TNP solúveis em éter etílico KAKADE & LIENER,(1969).

3.6.4. Valor biológico calculado (Vbc)

Segundo SHEFFNER (1967), a qualidade nutricional de uma proteína pode ser estimada pelo índice de aminoácidos essenciais de Oser. O procedimento para o cálculo utiliza como padrão de referência a proteína do ovo integral (His = 2,6; Lys = 7,8; Met + cys = 5,3; Phe + Tyr = 9,3; Leu = 8,8; Ile = 5,9; Val = 7,1; Thr = 4,9 e Try = 1,4 , em g/16gN). Inicialmente é calculado a razão ovo (RO) de cada um dos aminoácidos essenciais (AAE):

$$RO = \frac{AAE \text{ amostra (g/16gN)}}{AAE \text{ padrão (g/16gN)}} \times 100$$

onde,

RO = razão ovo

AAE = aminoácidos essenciais

Os valores da razão ovo, que ultrapassam 100, são corrigidos para este limite máximo, calculando a seguir os logaritmos decimais de cada RO previamente corrigida, logo após é calculada a média aritmética dos valores. Assim, o valor biológico calculado (VBc) corresponde ao antilogaritmo da média aritmética dos logaritmos.

3.6.5. Utilização líquida calculada da proteína (NPUC)

Uma vez determinada a digestibilidade *in vitro* e estimado o valor biológico calculado (VBc), PELLET & YOUNG (1980), estabeleceram que a utilização líquida calculada da proteína obedece à equação a seguir:

$$NPUC = VBc \times Div/100$$

onde,

VBc = Valor biológico calculado

Div = Digestibilidade *in vitro*

3.7. Avaliação nutricional *in vivo*

Ensaio biológico: Para a avaliação nutricional das células de leveduras íntegras (CLI), células de leveduras rompidas (CLR), e concentrado protéico de levedura, obtido com perclorato de sódio (CPP), e do padrão caseína (CAS), foram determinados os seguintes índices nutricionais: balanço nitrogenado (BN), digestibilidade aparente da proteína (Da), valor biológico aparente da proteína (VBa),

utilização líquida aparente da proteína (NPUa) e quociente de eficiência protéica (PER).

Os ensaios biológicos foram realizados com um total de 28 ratos albinos, da linhagem Wistar, com 21 dias de idade, recém desmamados, sendo distribuídos em 4 grupos experimentais, com 7 ratos por grupo.

O peso médio dos animais submetidos a experimentação foi de $54,78 \pm 4,18$ g.

O alinhamento do peso dos animais, para manter uma homogeneidade ponderal nos 4 grupos, foi feito com base no sistema de blocos casualizados, descrito por BENDER et alii (1982).

Durante o experimento os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas individuais de aço inox, onde receberam água e alimentação *ad libitum*. A temperatura do biotério foi mantida a $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e o ciclo, noite e dia, de 12hs controlado automaticamente.

Para este estudo foram preparadas 4 dietas contendo 10% de proteína provenientes de células íntegras de levedura (CLI), células levedura rompida (CLR) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP), além da dieta controle contendo 10% de caseína.

Os animais permaneceram em adaptação às dietas experimentais durante 7 dias, entrando em balanço metabólico a partir da segunda semana.

O controle rigoroso do consumo de dieta e a coleta de excretas (fezes e urina) foi realizado durante 10 dias com a finalidade de determinar o teor de nitrogênio das mesmas pelo método de Kjeldhal.

A composição das dietas utilizadas para a caracterização nutricional das proteínas de leveduras está apresentada na Tabela 1.

Os cálculos dos índices nutricionais foram feitos pelas equações a seguir:

Balanço nitrogenado (BN): refere-se à diferença entre o nitrogênio ingerido (NI) e a soma do nitrogênio excretado nas fezes (NF) e na urina (NU).

$$BN = NI - (NF + NU)$$

Digestibilidade aparente (Da): é dada pela medida do nitrogênio ingerido com a dieta e do nitrogênio eliminado nas fezes, tendo como resultado o nitrogênio absorvido (NA).

$$Da(\%) = \frac{NA}{NI} \times 100$$

$$NA = NI - NF$$

onde: NA = nitrogênio absorvido
NI = nitrogênio ingerido
NF = nitrogênio fecal

Valor biológico aparente (VBa): avalia a porcentagem do nitrogênio absorvido que foi retido (NR) no organismo MITCHELL (1924).

$$VBa(\%) = \frac{NR}{NA} \times 100$$

$$NR = NA - NU$$

onde: NR = nitrogênio retido
NA = nitrogênio absorvido
NU = nitrogênio urinário

Utilização líquida aparente da proteína (NPUa): este índice faz uma avaliação global da utilização biológica da proteína e é medido pelo quociente do nitrogênio retido (NR) no organismo pelo nitrogênio ingerido (NI) com a dieta PELLET & YOUNG (1980).

$$\text{NPUa(\%)} = \frac{\text{NR}}{\text{NI}} \times 100 \quad \text{onde: } \begin{array}{l} \text{NR} = \text{nitrogênio retido} \\ \text{NI} = \text{nitrogênio ingerido} \end{array}$$

TABELA 1. Composição centesimal teórica das dietas utilizadas no ensaio biológico para a determinação do BN, VBa, Da, NPUa e PER das proteínas de levedura.

Componentes	%
Proteína	10,0
Óleo de soja	8,0
Fibra	5,0
Mistura mineral*	3,5
Mistura vitamínica*	1,0
Carboidrato**	72,25
Bitartarato de colina	0,25
Tert-butilhidroquinona	0,0014

* Preparado segundo a AIN-93 conforme REEVES et alii (1993) e mostrados nas tabelas 2 e 3.

** Fornecido por amido de milho puro.

TABELA 2. Mistura mineral AIN-93 G-MX

Ingredientes	g/Kg
Elementos minerais essenciais:	
Carbonato de cálcio anidro - 40,04%	357,00
Fosfato de potássio monobásico - 22,76% P; 28,73% K	196,00
Citrato de potássio, tri-k, monobásico - 36,16% K	70,78
Cloreto de sódio - 39,34% Na; 60,66% Cl	74,00
Sulfato de potássio - 44,87% K; 18,39% S	46,60
Óxido de magnésio - 60,32%	24,00
Citrato férrico - 16,5% Fe	6,06
Carbonato de zinco - 52,14% Zn	1,65
Carbonato de manganês - 47,79% Mn	0,63
Carbonato de cobre - 57,47% Cu	0,30
Iodeto de potássio - 59,3% I	0,01
Selenito de sódio anidro	0,01025
Paramolibdato de amônio.4H ₂ O - 54,34% Mo	0,00795
Elementos minerais potencialmente benéficos:	
Meta-silicato de sódio.9H ₂ O - 9,88% Si	1,45
Sulfato de potássio crômico.12H ₂ O - 10,42% Cr	0,275
Cloridrato de lítio - 16,38% Li	0,0174
Ácido bórico - 17,5% B	0,0815
Fluoreto de sódio - 45,24% F	0,0635
Carbonato de níquel - 45% Ni	0,0318
Vanadato de amônio - 43,55% V	0,0066
Sacarose (q.s.p.)	221,026

Fonte: REEVES et alii (1993)

TABELA 3. Mistura vitamínica AIN-93-VX.

Vitaminas	g/Kg
Ácido nicotínico	3,000
Pantotenato de cálcio	1,600
Piridoxina - HCl	0,700
Tiamina - HCl	0,600
Riboflavina	0,600
Ácido fólico	0,200
D-Biotina	0,020
Cianocobalamina (B-12) (0,1% em manitol)	2,500
Acetato de all-rac- α -tocoferol (E) (500 UI/g)	15,00
Palmitato de all-trans-retinol (A) (500.000 UI/g)	0,800
Colicalciferol (D ₃) (400.000 UI/g)	0,250
Filoquinona (Vitamina K)	0,075
Sacarose (q.s.p.)	974,655

Fonte: REEVES et alii (1993)

Quociente de eficiência protéica (PER): O PER foi determinado, utilizando-se, basicamente, o método descrito pela AOAC (1975), procedimentos 43.183 e 43.187. Foram utilizados 28 ratos (7 ratos por formulação) que foram mantidos em gaiolas de crescimento, onde receberam água e alimento à vontade pelo período de 28 dias. As dietas utilizadas para este ensaio foram as mesmas preparações usadas para o balanço nitrogenado. Os animais foram pesados em intervalos regulares de 7 dias. Ao

término desse período, foram calculados os valores de PER, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{PER} = \frac{\text{Ganho de peso (gramas)}}{\text{Consumo de proteína (gramas)}}$$

3.7.1. Escore de aminoácido corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS)

Para o cálculo do PDCAAS da proteína é utilizado o procedimento preconizado por HENLEY & KUSTER (1994), descrito a seguir.

- Análise aproximada do nitrogênio da amostra.
- Cálculo do conteúdo protéico (NX 5,5)
- Análise do perfil de aminoácidos essenciais .
- Determinação do escore químico
- Perfil de aminoácidos essenciais da proteína padrão da FAO/OMS para o requerimento da faixa etária de 2-5 anos (Lys = 5,8; Leu = 6,6; Ile = 2,8; Thr = 3,4; Trp = 1,1; Val = 3,5; Met + Cys = 2,5; Phe + Tyr = 6,5; His = 1,9 em g/16gN).
- Determinação da digestibilidade *in vivo*.
- Cálculo do PDCAAS:

PDCAAS = Escore químico de aminoácido x digestibilidade aparente da proteína.

3.7.2. Energia absorvida (EA)

Segundo SGARBIERI (1987) a energia bruta de um alimento é a energia química total contida nesse alimento, que é liberada na forma de energia calórica pelo

processo de combustão. Na combustão as substâncias orgânicas do alimento são oxidadas e transformadas em gás carbônico e água.

Normalmente, essa combustão se faz em um aparelho chamado calorímetro e a quantidade de calor produzido na combustão é avaliada pela mudança na temperatura da água contida no aparelho, SILVA (1981).

No presente estudo a energia bruta da dieta (EBD) e a energia bruta das fezes (EBF) foi determinada na bomba calorimétrica isoperibol da Par Instruments Co.

O cálculo da energia absorvida (EA), foi obtida através das seguintes equações:

$$EDC = DC \times EBC/100$$

onde,

EDC= Energia da dieta consumida (kcal)

DC= Dieta consumida (g)

EBC= Energia bruta da dieta em Kcal/100g

$$EEF = QFE \times EBF/100$$

onde,

EEF= Energia excretada nas fezes (Kcal)

QFE= Quantidade de fezes excretadas (g)

EBF= Energia bruta fecal em Kcal/100g

$$EA = EDC - EEF$$

3.8. Ensaio de toxicidade subcrônica.

Para o ensaio de toxicidade subcrônica foram utilizados 140 ratos Wistar machos, recém desmamados, distribuídos da seguinte forma:

- Grupo Zero: constituído por 20 animais, recém desmamados os quais foram sacrificados no início da experiência, para servir como referencial comparativo para os testes séricos e para as determinações realizadas nos órgãos coletados.

- Grupo CAS15: constituído por 20 animais alimentados com dieta contendo 15% de caseína.

- Grupo CLR15: constituído por 20 animais alimentados com dieta contendo 15% de proteína proveniente de células de levedura rompida.

- Grupo CPP15: constituído por 20 animais alimentados com formulação contendo 15% de proteína oriunda de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato.

- Grupo CAS30: constituído por 20 ratos alimentados com preparação contendo 30% de caseína.

- Grupo CLR30: formado por 20 animais alimentados com dieta contendo 30% de proteína fornecida por células de levedura rompida.

- Grupo CPP30: constituído por 20 ratos alimentados com uma formulação contendo 30% de proteína de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato.

O período experimental foi dividido em duas etapas; a primeira com duração de 45 dias e a segunda com duração de 90 dias.

Finalizada cada etapa experimental, 10 ratos de cada grupo (CAS15, CAS30, CLR15, CLR30, CPP15 e CPP30) foram sacrificados para coleta de sangue e órgãos (fígado, rins e cérebro).

As determinações realizadas no sangue e órgãos estão descritas nos itens 3.8.2 e 3.8.4. A coleta de urina foi feita em gaiola metabólica diariamente, nos últimos cinco dias de cada etapa experimental (ver item 3.8.3). Também foi utilizado um grupo denominado Zero constituído por 20 animais, os quais foram sacrificados no início da experiência, para servir como referencial comparativo para os testes séricos BRIGGS & OEHLME (1980) e MOURA (1986).

No decorrer do ensaio os ratos foram pesados e o consumo de ração calculado e registrado cuidadosamente a cada semana em protocolos previamente preparados.

As dietas experimentais deste ensaio foram preparadas de acordo com as recomendações do AIN 93, REEVES et alii (1993), com modificações no conteúdo de proteína, uma vez que foram utilizados níveis de 15% e 30% de proteína.

3.8.1. Quociente de eficácia alimentar

As diferenças de peso corporal dos animais, podem estar relacionadas à quantidade de dieta ingerida, portanto, acompanhando o ganho de peso dos animais e o consumo de alimento, determinou-se o quociente de eficácia alimentar (QEA) calculada pela expressão:

$$QEA = \frac{\text{Ganho de peso total (g)}}{\text{Consumo total de dieta (g)}}$$

3.8.2. Coleta de sangue

O sangue foi retirado através de punção cardíaca e acondicionado em tubos de poliestireno, que foram mantidos em banho-maria a 37°C durante 15 minutos, posteriormente sofreu centrifugação a 3.500 rpm em centrífuga refrigerada SORVAL RC5C durante 10 minutos a 4°C para a separação do soro a ser analisado.

• Determinações bioquímicas no soro

Creatinina: determinado pelo método de LIMA et alii (1985), onde a creatinina reage com picrato alcalino em meio tamponado, após prévia desproteinização com ácido pícrico, obtendo-se um cromóforo com absorção máxima a 510 nm.

Aminotransferases ou transaminases: a atividade das transaminases glutâmico-oxalacética (TGO ou AST) e glutâmico-pirúvica (TGP ou ALT) foi determinada medindo-se a quantidade de oxalato produzido ou piruvato produzido, em condições padronizadas de pH e temperatura. O oxalacetato é instável e se transforma em piruvato. O piruvato reage em meio alcalino com 2,4 dinitrofenilhidrazida (2,4-DNFH) produzindo um composto colorido que é quantificado a 505 nm.

Ácido úrico: o método de dosagem baseia-se na coloração azul obtida pela ação redutora do ácido úrico sobre o reativo fosfotúngstico, em pH básico e presença de alantóina e CO₂. O azul de tungstênio formado absorve radiação no comprimento de onda de 700nm.

Uréia: a dosagem de uréia é determinada pela combinação da ação da urease que reage sobre a uréia produzindo amônia, que por sua vez forma um complexo colorido que absorve a 600nm, com formil formiato de sódio em presença de hipoclorito .

Para as determinações bioquímicas foram utilizados "Kits" de análises clínicas: LABTEST SISTEMA DIAGNÓSTICO LTDA para ácido úrico e CELM (Cia Equipadores de Laboratórios Modernos) para as demais análises.

3.8.3. Coleta de urina

Os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas durante os últimos cinco dias dos experimentos. A urina coletada em erlenmeyer foi recolhida a cada 24 horas e refrigerada a 5°C.

Na urina foram dosados: creatinina, ácido úrico e uréia, de acordo com a metodologia mencionada no item 3.8.2.

3.8.4. Coleta de órgãos

Após cirurgias, os órgãos foram pesados, congelados e liofilizados.

Nos órgãos foram determinados:

- Proteínas totais, pelo método de Kjeldahl, segundo a metodologia da AOAC (1975).
- Lipídios totais: o tecido hepático (100mg) foi liofilizado, homogeneizado em 10mL de isopropanol por 1 minuto. Todos os tubos foram lacrados com parafilme e armazenados por dois dias a 4°C. Após esse período foram centrifugados por 10 minutos a 1000 xg, HAUG & HOSTMARK (1978).

Alíquotas dos sobrenadantes foram então analisadas com "Kit" da LABTEST para lipídios totais onde os lipídios extraídos reagem com o ácido sulfúrico, formando o "ion carbonium", que por sua vez reage com o grupamento carbonil ativado do reagente de cor, produzindo um complexo de cor rosa, que é estabilizado por ressonância e tem absorção máxima em torno de 535 nm.

Os pesos dos órgãos quando comparados com o peso corporal do animal nos forneceu o dado percentagem de órgão com relação ao peso corporal, que aparece citado no item 4.6.3 como %Fig (para o fígado), %Rim (para os rins) e % Cer (para o cérebro).

3.9. Análise estatística

O delineamento experimental dos ensaios biológicos foi feito de acordo com BENDER et alii (1982), pelo delineamento inteiramente casualizado (DIC). As médias dos resultados obtidos para o ensaio biológico e determinações químicas foram submetidas a análise de variância com posterior análise das diferenças entre médias pelo teste de Tukey, ao nível de 95% de confiança. Para esta análise foi utilizado o programa SANEST versão 2.1 (Sistema de Análise Estatística) ZONTA & MACHADO (1988).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ruptura celular

A padronização das condições ótimas para a ruptura mecânica da parede celular de leveduras utilizando o equipamento dynamill, constituiram um processo árduo e demorado, visto que desta etapa depende a posterior recuperação da proteína intracelular na sua forma nativa, que será utilizada para a elaboração do concentrado protéico.

TABELA 4. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total e proteína do sobrenadante de células de leveduras rompidas em diferentes velocidades.

Velocidade (rpm)	1910			2400			3340		
Recirculação	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Mat. seca (%)	5,29	5,08	5,27	4,94	4,81	4,78	5,07	5,06	4,88
Nitr. total (%)	6,48	5,58	6,29	6,74	6,74	6,69	6,62	6,64	6,71
Prot. bruta (%)	40,52	41,14	41,19	42,12	42,14	41,84	41,38	41,50	41,94
Rend. ext. (%)	81,00	82,00	82,00	83,00	83,00	82,00	82,00	83,00	83,00

Os resultados do conteúdo de matéria seca, nitrogênio total e proteína do sobrenadante de células de levedura após rompimento e centrifugação, nas diferentes velocidades de rotação do moinho, estão apresentadas na tabela 4. À primeira vista constatamos que as variáveis velocidades e recirculação não acarretaram mudanças consideráveis nas quantidades recuperadas de matéria seca, nitrogênio total e proteína

bruta no sobrenadante, portanto, este fato permite definir que apenas uma passagem através do moinho, é suficiente para promover a recuperação de 81 a 83% da proteína que constitui o sobrenadante, após rompimento das células frescas.

Visto que a velocidade de rotação não levou a aumento apreciável da extração do componente protéico das células, optou-se, arbitrariamente, pela velocidade intermediária (2.400 rpm) para a segunda etapa de rompimento, donde a concentração da suspensão e o fluxo de alimentação foram aumentados de 25% para 40% e de 2,4 L/h para 4,8 L/h, respectivamente, como mostra a Figura 2. Os dados obtidos na experimentação da segunda etapa, podem ser visualizados na tabela 5. Quando a concentração da suspensão de células foi aumentada verificou-se aumento no teor de matéria seca, sugerindo que o aumento do número de células por mL de suspensão, possibilita um atrito maior entre as células e as pérolas de vidro. Já o fluxo de alimentação dobrado não afetou o rendimento de extração. A elevação da concentração da suspensão celular e do fluxo de alimentação proporcionam a vantagem de obter quantidades maiores de células rompidas em menor espaço de tempo. GAVER & HUYGHEBAERT (1990) trabalhando com levedura de panificação, encontraram que a variação da concentração da suspensão de leveduras de 5%, 10%, 20% e 80% não afetou a eficiência de ruptura do moinho de bolas, (co-ball-mill). Outros pesquisadores como LINBLOM (1977), MOGREN et alii (1974); HUMMEL & KULA (1989) e ARRIOLA et alii (1989) , que trabalharam com diferentes equipamentos de desintegração mecânica através da agitação, da suspensão de células com partículas abrasivas, conseguiram uma ruptura celular oscilando entre 85 a 98% e rendimentos de extração de proteínas variando de 70 a 90%. Assim os resultados obtidos na presente pesquisa coincidem com os já relatados na literatura.

TABELA 5. Conteúdo de matéria seca, nitrogênio total, proteína bruta e rendimento de extração da proteína no sobrenadante de células de levedura (25 e 40%), rompidas na velocidade de 2400 rpm, com fluxo de alimentação de 2,4 e 4,8 L/h.

Amostra	Recirculação	Fluxo (L/h)	Mat. Seca (%)	Nitr. Total (%)	Proteína Bruta (%)	Rendimento (%)
SCLI(25%)	0	2,4	5,05	8,16	51,00	--
	1	2,4	4,94	6,74	42,13	83
	2	2,4	4,81	6,74	42,13	83
SCLI(25%)	0	4,8	5,42	7,69	48,05	--
	1	4,8	4,91	6,99	43,68	91
	2	4,8	4,85	7,40	46,25	96
SCLI(40%)	0	2,4	8,15	8,21	51,31	--
	1	2,4	7,86	7,48	46,75	91
	2	2,4	7,56	7,85	49,06	96
SCLI(40%)	0	4,8	8,56	8,38	52,35	--
	1	4,8	7,81	8,03	50,18	95
	2	4,8	7,56	8,18	51,13	97

SCLI = Suspensão de Células de Levedura Íntegras

4.2. Extração e precipitação da proteína de levedura

Após a ruptura das células de levedura o procedimento mais comum para a extração da proteína, é promover a alcalinização do meio uma vez que ocorre diminuição do pH da suspensão de células rompidas (pH 6) . Portanto deve existir um delicado equilíbrio entre a extractibilidade e pH, para obter rendimentos elevados de extração .

A carga elétrica das proteínas reflete na sua solubilidade. Em valores de pH afastados do ponto isoelétrico as proteínas apresentam cargas semelhantes e as

moléculas se repelem entre si. No entanto, a pH próximo do ponto isoelétrico (pI) as diferenças de cargas diminuem favorecendo a aproximação, agregação e precipitação das proteínas.

A Figura 4 ilustra os dados obtidos no presente estudo, para a curva de solubilidade da proteína de células de leveduras rompidas em função do pH. A solubilidade e consequente extração de proteínas de levedura de cervejaria é superior em pH alcalino do que a pH ácido. Este resultado sugere que a pH acima de 4,0 o número de resíduos carregados negativamente é superior ao número de resíduos carregados positivamente para pHs menores que 4,0.

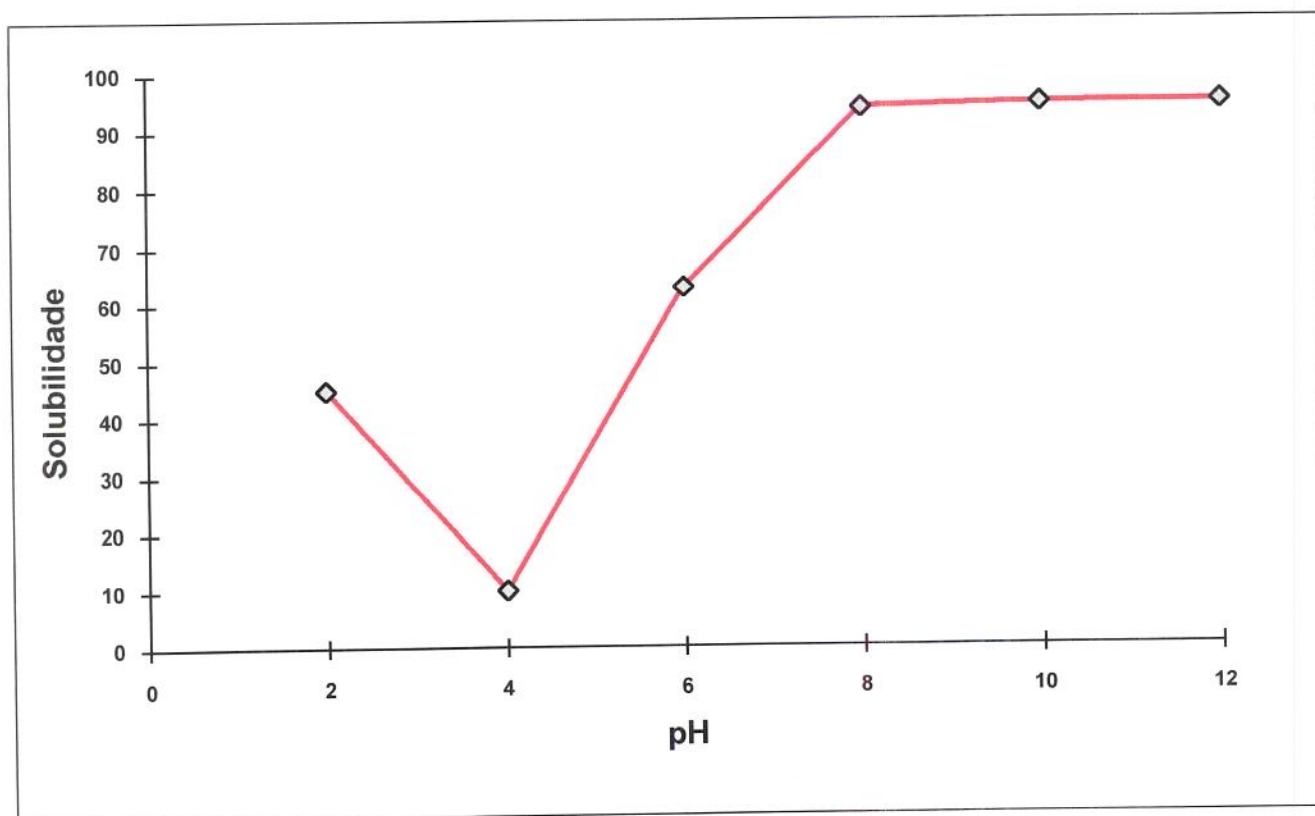


Figura 4. Curva de solubilidade de proteína de células de levedura rompidas em função do pH.

A proteína em estudo mostrou um comportamento de solubilidade semelhante ao da proteína de *Candida utilis*, a qual apresenta o ponto isoelétrico a pH 4,0 e a maior solubilidade a pH 10, SCHACHTEL (1981). SCHWENKE et alii (1980) encontraram que as proteínas de células de *Saccharomyces cerevisiae*, rompidas mecanicamente e liofilizadas, tiveram uma solubilidade máxima do nitrogênio a pH próximo a 9,0 (acima de 75%) e a solubilidade mínima ocorreu numa faixa ampla de pH, oscilando entre 3 e 5 (30%).

Após a extração das proteínas (quantificadas como nitrogênio solúvel) das células de levedura, procedeu-se à precipitação das proteínas extraídas. Na Figura 5 visualiza-se o nitrogênio extraído (NE) a pH 8,0 e o nitrogênio precipitado (NP) a pH 4,2 em células de levedura rompidas, após a primeira e segunda recirculação da suspensão pelo moinho a 2.400 rpm . Vê-se que a quantidade de nitrogênio precipitado na primeira passagem pelo moinho foi maior (75%) quando comparada com a NP (68%) após a segunda recirculação. Cabe ressaltar que na segunda recirculação da suspensão de levedura, houve aumento da temperatura do equipamento . De acordo com a bibliografia consultada o aumento da velocidade de rotação e aumento do número de passagens, leva a um aumento considerável na temperatura de funcionamento dos equipamentos de desintegração mecânica, GAVER & HUYGHEBAERT (1990). Por outro lado FOLLOW et alii (1971) confirmaram que a temperatura de até 30°C a atividade das enzimas de levedura rompida não é afetada.

A redução na quantidade de NP após a segunda passagem pode ser justificada pelas pesquisas realizadas, segundo as quais as leveduras são bioreatores enzimáticos e quando rompidas, os mais diversos substratos são colocados em contato com suas enzimas específicas. No caso da desintegração por atrito e colisão, as proteases intracelulares, dependendo da temperatura e da eficiência do sistema de resfriamento utilizado, não terão sua atividade prejudicada, podendo desta forma causar uma

hidrólise parcial da proteína extraída reduzindo, conseqüentemente a quantidade de proteína isoelétrica recuperada, uma vez que os aminoácidos livres e peptídios de baixo peso molecular serão perdidos no sobrenadante.

A literatura mostra que processamentos que obtiveram um rendimento de 98% de extração de proteínas conseguiram resgatar de 70 a 77% da proteína do sobrenadante no precipitado, LINBLOM (1977).

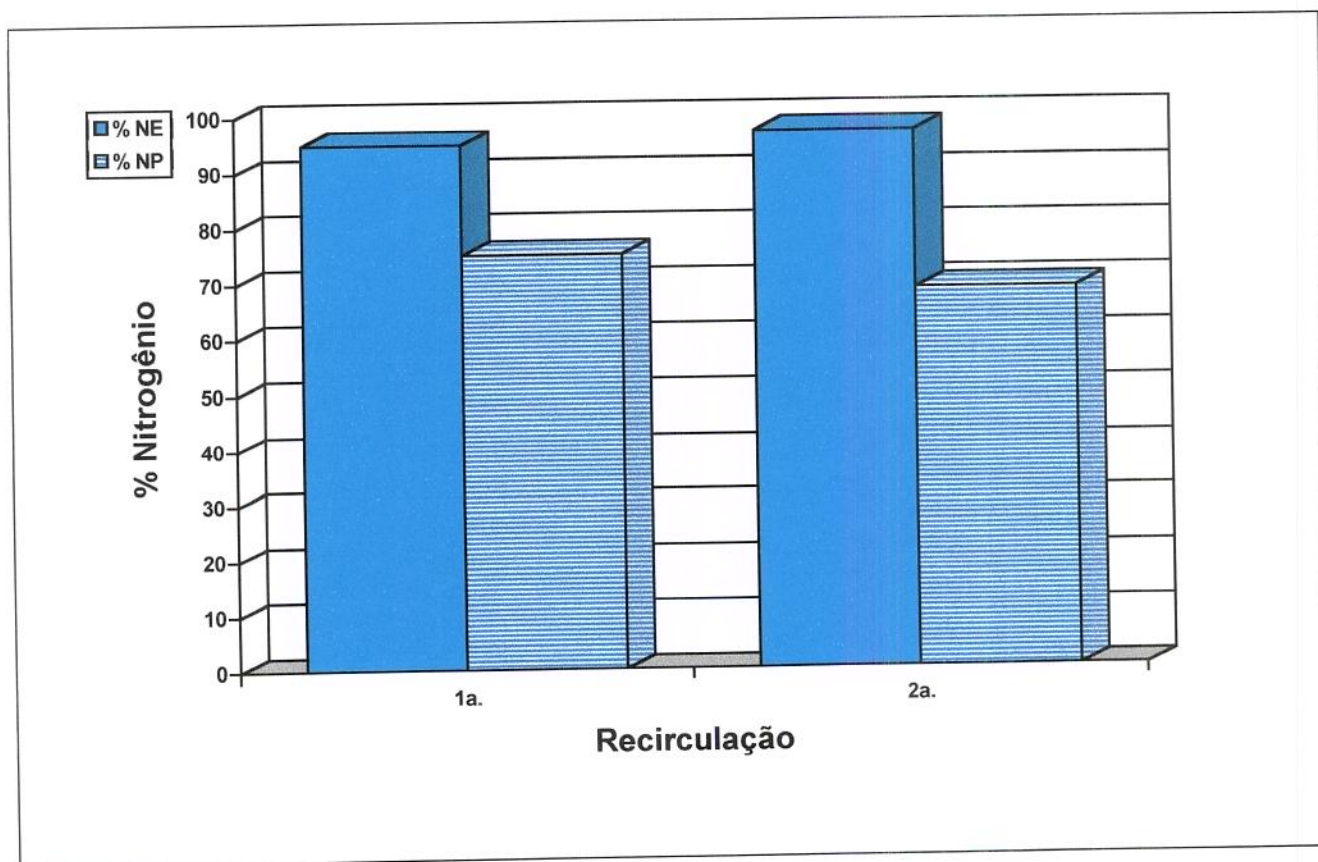


Figura 5. Nitrogênio extraído (NE) a pH 8,0, nitrogênio precipitado (NP) a pH 4,2 em células de leveduras rompidas após a primeira e segunda recirculação da suspensão a uma velocidade de 2400 rpm.

4.3. Composição centesimal de células de leveduras e de concentrado protéico obtido com perclorato

As leveduras de cervejaria possuem um potencial nutricional e comercial importante devido ao fato de produzirem proteínas em grandes quantidades, além de ácidos nucleicos e outros compostos que podem ser utilizados como ingredientes para consumo humano na indústria de alimentos.

A composição química e bioquímica da levedura varia de acordo com o substrato empregado como fonte de nutrientes, da forma de crescimento utilizado, da taxa de crescimento e finalmente, pode ser modificada pela manipulação genética, ROLZ (1990); REED & NAGODAWITHANA (1991).

A Tabela 6 mostra os resultados da composição centesimal aproximada (%) base seca, de células de leveduras íntegras (CLI) e de concentrado protéico obtido com perclorato (CPP). Pelos dados apresentados na Tabela 6, percebe-se que os teores de proteína, cinzas, RNA, carboidratos e lipídios são equivalentes aos valores já relatados por TU et alii (1975), ROSHKOVA et alii (1986), ROLZ (1990) e PÓO & MILLAN (1990) para o gênero *Saccharomyces sp* e para a *Saccharomyces carlsbergensis*, os quais encontraram valores de 40-68 para a proteína, 3-15% para RNA, 1-24% para lipídios e 5-10% de cinzas.

Em todos os trabalhos consultados foi utilizado o fator 6,25 para a conversão do nitrogênio total em proteína. É conhecido que somente 80% do nitrogênio total está na forma de proteína, portanto REED & NAGODAWITHANA (1991) aconselham o uso do fator 5,5, para evitar que a qualidade da proteína seja subestimada em testes de avaliação nutricional.

Segundo HALÁSZ & LÁSZTITY (1991), 60% da proteína isolada de células de levedura por precipitação isoeletrica pode existir na forma de uma nucleoproteína, contendo de 10 a 15% de ácidos nucleicos.

O tratamento de células de levedura rompidas com perclorato de sódio (NaClO_4), têm como finalidade exclusiva a redução do conteúdo de RNA, o qual ingerido em altas concentrações é nocivo para a saúde humana.

TABELA 6. Composição centesimal (% base seca) de células íntegras de levedura (CLI) e de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP).

Componentes (%)	CLI	CPP
Proteínas (NX 5,5)	47,19	78,00
RNA	7,04	2,26
Cinzas	8,55	1,13
Fibra solúvel	9,65	2,65
Fibra insolúvel	2,57	0,49
Lipídios	3,53	6,47
Carboidratos totais	21,52	9,10

Na Tabela 6, observamos que o teor de proteína do concentrado protéico obtido com perclorato (CPP) mostrou um aumento de 47% para 78% quando comparado com as células íntegras. Outro fator positivo da modificação com NaClO_4 deve-se à constatação de que houve redução de 68% do conteúdo de RNA. A extração realizada a pH 8,0 apresenta o inconveniente de que além de ser o ponto de maior solubilidade da proteína também, coincide com o pH onde se tem grande extratibilidade de fibras solúveis lipídios e carboidratos em geral, que atuam como contaminantes da proteína, após a sua precipitação. Portanto observa-se que aproximadamente 42% dos carboidratos totais e 26% das fibras presentes nas células de levedura, passam para o concentrado protéico. Os resultados obtidos para o CPP são compatíveis com os valores encontrados por KINSELLA (1987) para proteína

isolada com NaClO_4 , diferindo apenas na quantidade de carboidratos (3,6%), inferior ao encontrado neste trabalho.

4.4. Composição de aminoácidos de células íntegras de levedura de cerveja e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato

Uma proteína balanceada é aquela, que quando oferecida em quantidade relativamente pequena é capaz de fornecer os aminoácidos essenciais nas quantidades necessárias. O balanço aminoacídico de uma proteína tem uma importância fundamental visto que os aminoácidos ingeridos através da dieta irão, na sua maioria, para a síntese de outras proteínas.

Os dados de composição aminoacídica de células íntegras de levedura da *Saccharomyces sp.* e de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio podem ser vistos na Tabela 7. Pode-se notar que o perfil de aminoácidos essenciais das células íntegras de leveduras (CLI) supera, em todos os aminoácidos, as quantidades recomendadas pela FAO/WHO/UNU para crianças na faixa etária de 2 a 5 anos, excetuando o triptofano que possui uma adequação de 100%, quando confrontado com o padrão. O concentrado protéico de levedura obtido com perclorato apresenta também um balanço de aminoácidos superior ao padrão, porém foi detectada uma ligeira deficiência de metionina, motivo pelo qual o escore químico foi de 92%. Pelos resultados do escore químico, pode-se ver que os aminoácidos sulfurados se apresentaram ligeiramente limitantes.

Os valores da literatura consultada se mostraram inferiores aos resultados encontrados neste trabalho para a biomassa de levedura (CLI). PÓO & MILLÁN (1990) obtiveram um escore químico de 48% para aminoácidos sulfurados em levedura seca de cervejaria .

Para o concentrado protéico obtido com perclorato, os resultados, encontrados são semelhantes aos citados por KINSELLA (1987) que também obteve um EQ igual a 92% para aminoácidos sulfurados.

TABELA 7. Composição aminoacídica de células íntegras de levedura (CLI), de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP), em g/100g de proteína e escore químico (EQ) dado em %.

Aminoácidos	CLI	CPP	Padrão FAO*
Lys	7,13	8,78	5,8
Leu	8,84	8,62	6,6
Ile	5,64	5,09	2,8
Thr	6,16	4,07	3,4
Trp	1,10	1,39	1,1
Val	6,20	5,91	3,5
Met + Cys	2,84	2,30	2,5
Phe + Tyr	9,98	8,79	6,3
His	2,06	2,77	1,9
Met	2,50	1,82	
Phe	5,30	4,96	
Glu	13,15	9,88	
Asp	11,98	11,66	
Ser	6,13	3,68	
Pro	4,45	3,16	
Ala	7,07	5,55	
Gly	4,93	4,14	
Arg	4,11	4,96	
EQ (%)	100,00	92,00	

* Padrão de referência protéica FAO/WHO/UNU 1985 (necessidades de aminoácidos essenciais para crianças de 2 a 5 anos de idade).

Em um trabalho sobre fracionamento e utilização de levedura de panificação, SEELEY (1977) cita que os valores de metionina para as células e para a proteína isolada foram de 1,5 e 1,9%, respectivamente. A lisina apresentou escores químicos de 142% para as células de levedura e 147% para o isolado protéico, quando comparada com o padrão ovo. Em muitos casos encontram-se correlações positivas e significativas entre o escore químico e os índices de valor protéico determinados por ensaios biológicos, porém, em outros não. Aparentemente, as discrepâncias que surgem são devidas a diferenças na composição dos alimentos e nas transformações que as proteínas podem sofrer durante o preparo do alimento para o consumo e no próprio organismo, principalmente na digestão e absorção dos aminoácidos. Em outras palavras, a determinação da concentração de aminoácidos na proteína ou no alimento, por métodos químicos, não oferece nenhuma garantia que tais aminoácidos estejam ou não disponíveis biologicamente, SGARBIERI (1987).

4.5. Valor nutricional

4.5.1. Avaliação *in vitro*

Os resultados das determinações *in vitro* são apresentados na tabela 8. Ao observar a Tabela 7, nota-se que a quantidade de lisina quantificada, refere-se ao conteúdo total deste aminoácido, porém, não reflete o valor que de fato está biodisponível para o organismo.

A porcentagem de lisina disponível nas células íntegras de levedura foi 79,8% do conteúdo total da proteína enquanto que no concentrado protéico de levedura obtido com perclorato a lisina disponível foi 57,6% do total. Significando que o tratamento

utilizado para a obtenção do CPP provocou diminuição da lisina disponível embora o teor de lisina total tenha sido mais elevado no CPP do que no CLI (Tabela 7).

Vários textos científicos afirmam que os tratamentos alcalinos de proteínas alimentícias, utilizados para a solubilização e purificação de proteínas para preparar isolados e concentrados protéicos podem causar a diminuição da biodisponibilidade de aminoácidos e do valor nutricional global, CHEFTEL et alii (1989). O tratamento com álcali pode levar à formação de novos aminoácidos, tais como lisinoalanina, lantionina, ornitoalanina sendo possível que nestas transformações participem os aminoácidos cistina, lisina, arginina e provavelmente serina, visto que esses aminoácidos são limitantes, juntamente com a lisina na maioria das proteínas utilizadas na alimentação, podendo desta forma diminuir consideravelmente o seu valor nutricional, ANGLEMIER & MONTGOMERY (1989). Além disso o tratamento alcali promove a racemização de aminoácidos transformando a forma L em D-aminoácidos, menos biodisponíveis.

TABELA 8. Teor de lisina disponível (LD), digestibilidade da proteína "in vitro" (Dig), valor biológico calculado (VBc) e utilização líquida da proteína (NPUc).

Índices	CLR (1)	CPP (2)
LD (g/100g proteína)	5,69	5,06
Dig (%)	83,06	91,72
VBc (%)	86,22	83,83
NPUc (%)	71,61	76,89

(1) Células de levedura rompidas mecanicamente .

(2) Concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio.

O concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP) apresentou uma digestibilidade *in vitro* superior ao valor determinado para as células de levedura rompidas. Isto indica que a presença de parede celular nas células de levedura rompidas interfere no processo de digestão da proteína, uma vez que a parede celular possui proteínas estruturais que não podem ser hidrolisadas pelas enzimas digestivas, além do que, possivelmente, algumas proteínas intracelulares podem ter-se associado a fragmentos de parede celular no momento da ruptura e/ou liofilização, dificultando a digestão.

A proteína de células de levedura rompidas (CLR) apresentam Dig, semelhante às proteínas de farinhas de sorgo obtidas por diferentes processos de moagem e suplementadas com 15% de farinha de soja (84%), BOOKWALTER et alii (1987). Na mesma pesquisa cita-se que a digestibilidade para a proteína de farinha de trigo suplementada com 15% de farinha de soja foi 97,1% para a amostra não cozida e 94% para a amostra cozida. Portanto, conclui-se que a proteína de levedura possui um comportamento semelhante ao de outras proteínas vegetais, quando submetidas a digestão enzimática.

Os índices, de valor biológico calculados (VBc) para as CLR foi apenas 2% maior ao valor calculado para a CPP. Já o NPUc foi 5% maior na CPP quando comparado com as CLR. Estes resultados podem ser justificados em função da composição aminoacídica das duas amostras que é muito semelhante e também porque a digestibilidade do CPP foi 9% maior do que a de CLR.

A proteína de células de *Candida utilis* NRRL Y660, cultivada em diferentes substratos, da indústria açucareira, apresentou uma digestibilidade *in vitro* que variou de 95 a 97%, GÓMEZ et alii (1986).

O escore do aminoácido limitante primário (EALP) e o escore de aminoácido corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS) das proteínas de levedura, são

apresentados na Figura 6. O PDCAAS foi 0,82, 0,83 e 0,85 para os tratamentos CPP, CLI e CLR, respectivamente. Estes índices foram inferiores aos obtidos para o isolado protéico de soja e carne bovina (PDCAAS=1,0), sendo no entanto superior a outras proteínas de origem vegetal, HENLEY & KUSTER (1994).

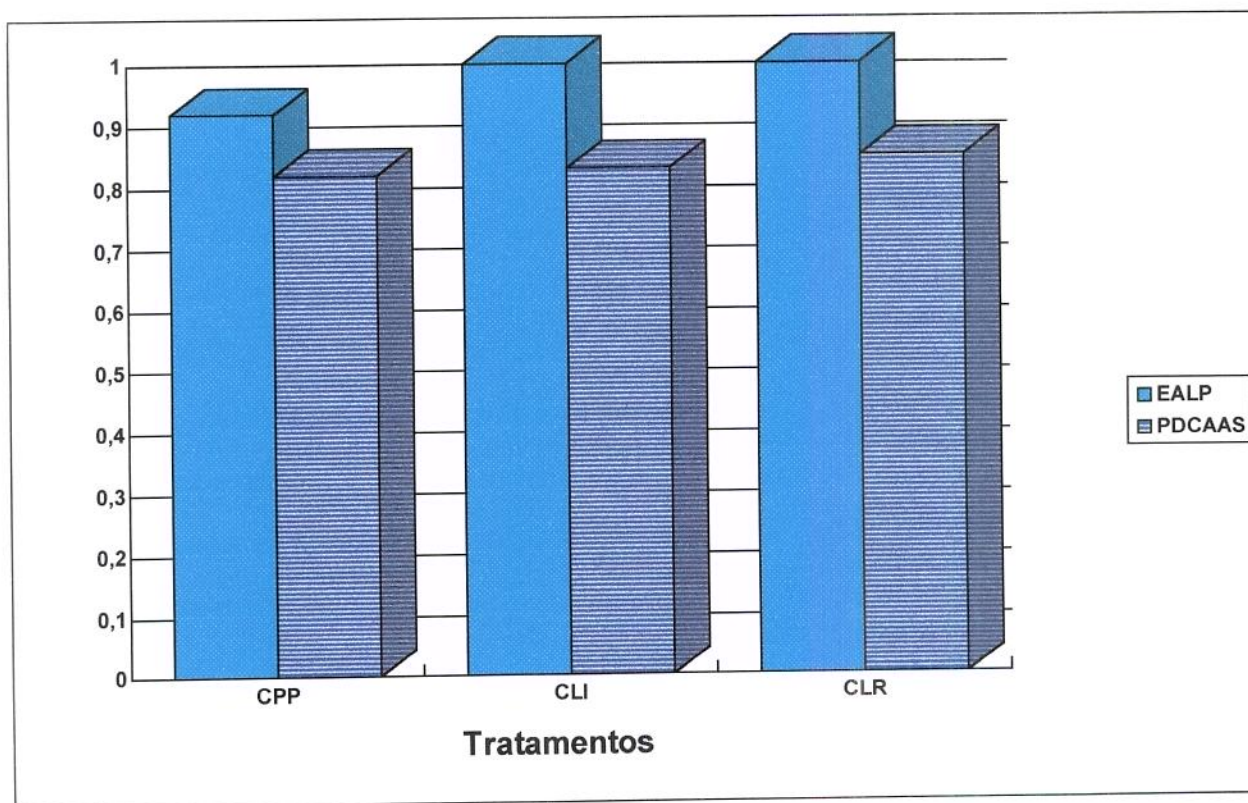


Figura 6. Escore do aminoácido limitante primário (EALP) e escore de aminoácido corrigido pela digestibilidade *in vivo* (PDCAAS) da proteína de células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP).

4.5.2. Ensaio biológico com ratos Wistar

A literatura sobre ensaios biológicos com ratos, camundongos, porcos, aves, etc., revela que as leveduras mais utilizadas para avaliação nutricional, como fonte

protéica, tem sido: *Saccharomyces cerevisiae*, *S. fragilis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Candida utilis*, *C. tropicalis*, cultivadas nos mais variados substratos.

A levedura de cervejaria tem sido pouco estudada para fins nutricionais, provavelmente pelo seu sabor amargo, em virtude da presença de compostos tanínicos e resinosos do lúpulo que são aderidos à parede celular da levedura durante a fermentação, DWIVEDI & GIBSON (1970).

Balanço nitrogenado. O nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio fecal (NF), nitrogênio urinário (NU) e balanço nitrogenado de ratos que receberam dietas contendo 10% de proteínas provenientes de células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP) e caseína (CAS), são apresentados na Tabela 9. A quantidade de nitrogênio ingerido para os tratamentos CLI, CLR, CAS foi estatisticamente igual, ao nível de 5% de probabilidade, diferindo portanto do tratamento CPP, o qual mostrou um índice NI de aproximadamente 77% quando comparado com a caseína. A quantidade excretada de nitrogênio fecal foi maior nas preparações com células íntegras de levedura e células rompidas, quando comparadas com as formulações contendo concentrado protéico. A diferença significativa ($p \leq 0,05$) de excreção de NF entre os tratamentos com células de levedura e o concentrado protéico, confirma que as enzimas digestivas do rato, não são capazes de clivar completamente as ligações que estabilizam a estrutura da parede celular, conseqüentemente a proteína que constitui a parede celular, não está disponível para ser absorvida, o que faz com que nitrogênio seja perdido nas fezes. O nitrogênio urinário (NU) da mesma forma que o nitrogênio fecal foi superior para as formulações contendo levedura quando confrontado com os valores determinados para o concentrado, o que sugere a presença de nitrogênio na forma de

ácido úrico, que constitui o principal produto do catabolismo das purinas, excretados predominantemente pela urina (71%), MOTTA (1989).

TABELA 9. Nitrogênio ingerido (NI), nitrogênio fecal (NF), nitrogênio urinário (NU) e balanço nitrogenado (BN) de ratos que receberam dietas contendo 10% de proteína proveniente de células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico de levedura (CPP) e caseína (CAS).

Tratamento	NI (mg)	NF (mg)	NU (mg)	BN (mg)
CLI	2.402,16a ± 200,94	418,04a ± 61,66	291,33a ± 78,68	1.692,78bc ± 153,96
CLR	2.583,97a ± 280,80	379,67a ± 62,80	264,05ab ± 106,00	1.940,26ab ± 225,33
CPP	1.866,34b ± 188,61	202,98b ± 33,36	196,31bc ± 126,93	1.467,04c ± 109,99
CAS	2.439,26a ± 281,92	193,75b ± 45,18	163,84c ± 78,34	2.081,67a ± 282,95
D.M.	0,29	0,05	0,08	0,26
C.V. (%)	6,81	8,94	18,21	7,92

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem ao nível de 5% de significância.
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação.

O nitrogênio retido (BN) foi maior para a caseína e menor para o concentrado (CPP), tendo-se revelado estatisticamente semelhante para as dietas contendo proteínas de CLI e CLR.

Confrontando os dados de nitrogênio retido (BN) e nitrogênio ingerido (NI) verificamos que os tratamentos CLI e CLR apesar de terem apresentado médias muito parecidas ao padrão (CAS), a quantidade de nitrogênio retido de ambas formulações

com células de levedura foi inferior à caseína. Isto pode ter sido ocasionado pelas fibras que formam a parede celular que diminuem a disponibilidade de nutrientes, pelo aumento da espessura da camada de água inativa e pela redução da motilidade intestinal. As fibras solúveis agem como uma coluna cromatográfica, formando um gel no intestino e capturando pequenas moléculas, afetando, assim, a absorção de nutrientes e a ação de enzimas digestivas, ANDERSON & GUSTAFSON (1987).

Na Figura 7 podem ser observados os resultados comparativos de proteína consumida (PC) e ganho de peso (GP) durante 10 dias de BN, o que permite visualizar a eficiência que as proteínas dos 4 tratamentos possuem, para promover o crescimento dos animais. Os tratamentos CLR e CLI, tiveram comportamento parecido para o consumo de proteína e ganho ponderal. Por outro lado a caseína demonstrou o melhor desempenho de crescimento, enquanto que a dieta CPP registrou o menor ganho de peso dentre as proteínas testadas.

Com os dados da Tabela 9, foram calculados os índices de digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa), utilização líquida da proteína (NPUa), apresentados na Tabela 10.

A digestibilidade aparente da proteína (Da) foi mais elevada para a caseína, seguida do concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP), do tratamento com CLR e CLI. Para o índice Da, todos os tratamentos diferiram estatisticamente entre si. Estes resultados são compatíveis com os achados por HERNÁNDEZ et alii (1985) para levedura *Saccharomyces carlsbergensis* (81%) e para a caseína (91%). Por outro lado CARRASCO & MENDOZA et alii (1991) em estudo realizado com *Kluveromyces marxianus var. lactis*, lograram valores de digestibilidade (93%) superiores aos obtidos na presente pesquisa.

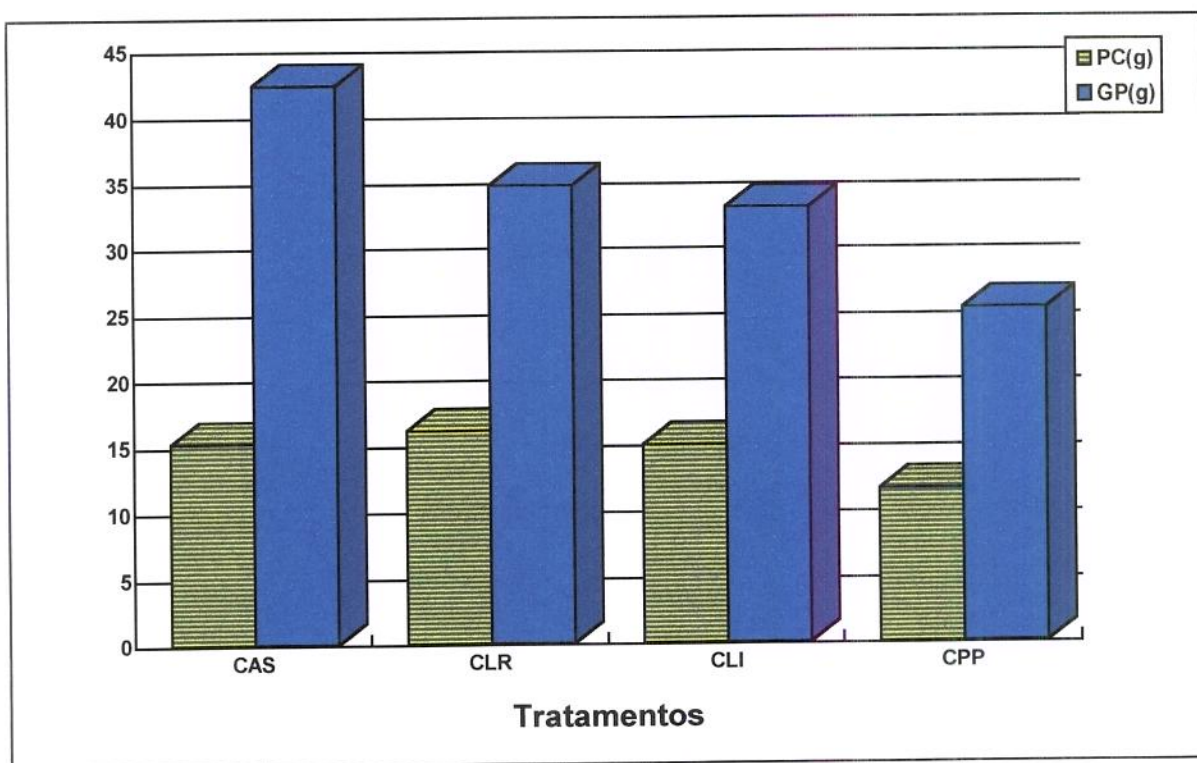


Figura 7. Consumo de proteína (PC) e ganho de peso (GP) durante os 10 dias de balanço nitrogenado de ratos Wistar que receberam dietas contendo 10% de proteínas de células íntegras (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico obtido com perclorato de sódio (CPP) e caseína (CAS).

A digestibilidade aparente das dietas contendo células de levedura, foi inferior à digestibilidade dos concentrados protéicos, possivelmente porque que a fibra que compõe a parede não é degradada pelas secreções gástricas e intestinais dos monogástricos, ROEHRIG (1988), o que justifica o maior volume de fezes excretado por CLI (13,42g) e CLR (13,11g) quando comparadas com excreção dos concentrados CAS (10g) e CPP (8,18g).

O valor biológico da proteína das dietas CPP, CLR e CLI não apresentaram diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre si, porém o melhor índice de VBa foi o da formulação de caseína, que foi maior em termos absolutos e diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) em relação aos outros tratamentos. Isto indica que a proteína de levedura em

estudo possui um balanço aminoacídico adequado capaz de suprir as necessidades orgânicas e de repor as perdas endógenas de produtos nitrogenados. Os resultados encontrados diferem dos citados na literatura, visto que as médias encontradas por SAMMÁN et alii (1993) foram de 75% e 70% para proteína de *Torula utilis* e *Saccharomycopsis lipolytica* suplementada com metionina. O valor biológico determinado para *Saccharomyces carlsbergensis* foi 72%, HERNÁNDEZ et alii (1985) e 52,7% para levedura de panificação, SAMMÁN & FARIAS (1993).

De acordo com FERRER et alii (1985), a suplementação de farinha de milho com células de *Candida utilis* rica em lisina na proporção de 1:2,5 favoreceu o aumento do valor biológico (88%).

Outro índice que alcançou valor maior para a caseína, foi o NPUa, as preparações CPP, CLR e CLI mostraram médias de 79%, 75% e 70,48%, respectivamente. As médias obtidas para utilização líquida da proteína apresentaram o mesmo comportamento estatístico da digestibilidade aparente.

Contrariamente à similaridade verificada entre os valores encontrados para os três tratamentos com proteínas de leveduras, os resultados relatados por DELANEY et alii (1975) foram significativamente inferiores (NPU = 67%) aos apresentados neste estudo, o que, em princípio, poderia ser interpretado como uma superioridade do valor protéico da levedura utilizada neste estudo, uma vez que no estudo de DELANEY et alii (1975) observou-se, após a adição de metionina, elevação do NPU para 84%.

A proteína de *Saccharomyces carlsbergensis* teve seu índice de NPU determinado por HERNÁNDEZ et alii (1985), a partir de ensaios biológicos realizados com ratos Wistar, encontrando que a dieta preparada com 10,3% de proteína de células teve um NPU igual a 58%.

Quando comparados os índices nutricionais *in vitro* calculados pelo método de OSER com aqueles determinados em experiências *in vivo*, é constatado que a

digestibilidade, o valor biológico e a utilização líquida da proteína tiveram médias ligeiramente inferiores para os índices obtidos por cálculo. Esta diferença de acordo com SGARBIERI (1987) advém do uso da proteína de ovo integral como padrão, a qual apresenta um excesso de aminoácidos essenciais principalmente os sulfurados, e dessa forma tende a subestimar o valor biológico de grande número de proteínas, particularmente as que são limitantes em aminoácidos sulfurados.

TABELA 10. Digestibilidade aparente (Da), valor biológico aparente (VBa) utilização líquida da proteína (NPUa) e quociente de eficiência protéica (PER) de ratos alimentados com dietas contendo 10% de proteínas de células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP) e caseína (CAS).

Tratamentos	Da (%)	VBa (%)	NPUa (%)	PER
CLI	82,66d ± 1,64	85,29b ± 3,76	70,48d ± 2,93	2,14b ± 0,12
CLR	85,36c ± 1,32	88,02b ± 4,56	75,10c ± 3,41	2,16b ± 0,16
CPP	89,13b ± 1,37	88,64b ± 6,43	79,01b ± 5,95	2,07b ± 0,14
CAS	92,13a ± 1,20	92,47a ± 3,98	85,18a ± 3,50	3,27a ± 0,29
D.M.	0,88	3,99	3,85	0,26
C.V. (%)	0,55	2,43	2,68	5,93

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem ao nível de 5% de significância
D.M. = desvio padrão da média ; C.V. = coeficiente de variação.

Quociente de eficiência protéica. O quociente de eficiência protéica (PER) constitui um método bastante simples que permite medir e comparar a qualidade protéica de diferentes proteínas, no entanto as condições devem ser padronizadas: o aporte energético deve ser suficiente, a taxa de proteína administrada na quantidade adequada, assim como os demais nutrientes. A maioria dos pesquisadores trabalham com níveis de 9-10% de proteínas na dieta como recomenda a AOAC (1975).

Na Tabela 10 observa-se que o quociente de eficiência protéica foi superior para a caseína, quando comparado com as 3 preparações contendo proteínas de levedura, não tendo havido diferença significativa para o PER entre as dietas contendo levedura.

Os valores de PER encontrados são semelhantes aos relatados por SEELEY (1977), PER=2,2 para isolado protéico de levedura de panificação, livre de ácidos nucléicos e para células de levedura de cerveja desidratada, PER=2,0.

Igualmente, JENKINS & MITCHELL (1989) em ensaio biológico realizado com ratos Sprague Dawley, alimentados com dietas contendo 10% de proteínas fornecidas por autolisado de levedura, conseguiram um valor de PER de 66% (expresso como porcentagem da proteína padrão caseína). Da mesma forma os valores de PER, registrados neste estudo variaram de 63 a 66% da caseína nos tratamentos com levedura.

É preciso analisar cuidadosamente os resultados das comparações com a literatura, uma vez que existe grande variabilidade nos valores relatados, porque as condições de ensaio podem ter sido distintas em consequência do uso de diferentes linhagens ou espécies de levedura e sobretudo porque a literatura consultada, na sua totalidade, usa o fator 6,25 para o cálculo da proteína. Como observado por ROLZ (1990) qualquer comparação entre composição química, bioquímica e valor nutricional

de leveduras podem ser irrelevantes, se as condições nas quais foi obtida não são especificadas.

A Figura 8 ilustra a evolução ponderal de ratos alimentados com dietas contendo 10% de proteínas fornecidas por células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico obtido com perclorato (CPP) e caseína (CAS). Observa-se que o ganho de peso para os tratamentos CLR, CLI e CPP foi inferior ao ganho de peso na dieta com caseína embora a ingestão de proteína, para os tratamentos CLR, CLI e CAS (1,55g/dia, 1,45g/dia e 1,44g/dia, respectivamente) tenha sido estatisticamente igual ($p \leq 0,05$). Os animais alimentados com CPP tiveram ingestão protéica menor (1,1g/dia).

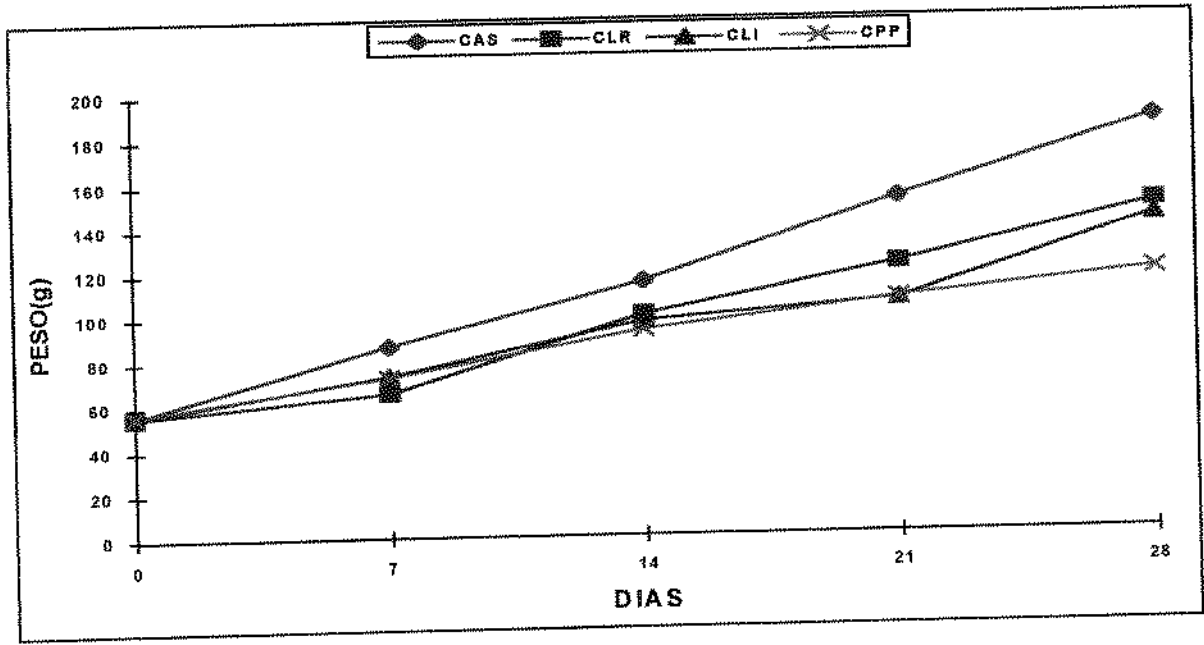


Figura 8. Curvas de crescimento de ratos alimentados com dietas contendo 10% de proteínas fornecidas por células íntegras de levedura (CLI), células de levedura rompidas (CLR), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio (CPP) e caseína (CAS).

Energia absorvida. A medida do consumo da dieta e a coleta de fezes, por um período de 10 dias, possibilitou o cálculo da energia consumida na dieta (EDC), energia excretada nas fezes (EEF) e da energia absorvida (EA).

Os dados da dieta consumida (DC), quantidade de fezes excretadas (QFE), energia bruta da dieta (EBD), energia bruta fecal (EBF), energia da dieta consumida (EDC), energia excretada nas fezes (EEF) e energia absorvida, estão na Tabela 11. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para as variáveis dieta consumida (DC), energia da dieta consumida (EDC) e energia absorvida (EA) dos tratamentos CLI, CLR e CAS. Os resultados das médias das mesmas variáveis para o concentrado protéico obtido com perclorato (CPP) foram sempre inferiores aos das três dietas anteriormente referidas.

Os grupos que apresentaram maiores quantidades de fezes excretadas (QFE) e portanto obtiveram médias aritméticas superiores para a energia excretada nas fezes (EEF) foram o CLI e CLR. Para as variáveis QFE e EEF os grupos alimentados com células de levedura, mostraram diferenças estatísticas em relação àqueles que receberam dietas contendo concentrados protéicos de levedura e caseína. Comparando os dados da Tabela 9 com os resultados da energia absorvida, constata-se que o nitrogênio retido, afetou negativamente a utilização da energia no tratamento CPP.

BRADLEY & SAVAGE (1995) encontraram em pesquisas com aves que células não autoclavadas, de *Saccharomyces cerevisiae*, quando adicionadas a dietas isocalóricas e isoprotéicas, promovem um aumento da eficiência de utilização energética das dietas com consequente redução da excreção de energia bruta nas fezes. Segundo os autores este fato pode ou não estar relacionado com a atividade da fitase presente nas células de levedura ativa. Neste sentido cabe ressaltar que embora as aves e os ratos apresentem sistemas digestivos diferentes, as dietas com células íntegras de levedura (CLI) e células de levedura rompidas (CLR) utilizadas nesta pesquisa,

apresentaram valores menores de energia bruta fecal, quando comparados com o concentrado protéico de levedura.

TABELA 11. Dieta consumida (DC), quantidade de fezes excretadas (QFE), energia bruta da dieta (EBD), energia bruta fecal (EBF), energia da dieta consumida (EDC), energia excretada nas fezes (EEF) e energia absorvida (EA) durante o balanço nitrogenado de ratos alimentados com produtos a base de levedura e caseína.

Índices	CLI	CLR	CPP	CAS	D M	C.V. (%)
DC(g)	151,65a ± 12,68	151,22a ± 16,43	113,36b ± 11,45	148,16a ± 17,12	17,54	6,71
QFE(g)	13,38a ± 1,52	13,11a ± 2,24	8,18b ± 0,99	9,10b ± 1,44	1,74	8,58
EBD(Kcal/100g)	410,74d ± 0,00	418,79b ± 0,00	415,18c ± 0,00	422,77a ± 0,00	0,00	0,00
EBF(Kcal/100g)	409,11c ± 0,00	402,23d ± 0,01	426,59a ± 0,00	415,37b ± 0,04	0,03	0,00
EDC(Kcal)	622,89a ± 52,10	633,27a ± 68,82	470,64b ± 47,56	626,36a ± 72,39	73,62	6,76
EEF(Kcal)	54,92a ± 6,21	54,92a ± 8,98	34,91b ± 4,24	37,76b ± 5,98	7,01	8,40
EA(Kcal)	567,97a ± 46,29	580,55a ± 60,36	435,73b ± 43,86	588,60a ± 66,82	66,71	6,63

Médias seguidas por letras distintas na horizontal diferem ao nível de 5% de significância.
DM= Desvio padrão da média ; C.V= Coeficiente de variação

4.6. Estudos de toxicidade subcrônica

Nos estudos de toxicidade subcrônica são utilizados sempre dois níveis para a proteína teste e para o padrão utilizado, neste ensaio foi registrado rigorosamente o consumo de alimentos, o que possibilita ter um diagnóstico do desempenho da proteína de levedura quando utilizada como única fonte de aminoácidos. O peso do animal acompanhado semanalmente é um bom indicador da eficiência da proteína para promover crescimento.

Os desequilíbrios e inadequações da proteína contribuem para o surgimento de modificações na composição química do organismo, portanto, pesquisando os tecidos que compõem o órgão, aliados às possíveis observações clínicas e exames bioquímicos realizados no sangue e na urina, pode-se ter um bom perfil toxicológico da proteína em experimentação.

4.6.1. Ganho de peso, consumo e quociente de eficácia alimentar

Na Figura 9 pode-se observar a curva de crescimento de ratos sacrificados com 7 semanas que receberam dietas contendo níveis de 15 e 30% de caseína (CAS15 e CAS30), células de levedura rompida (CLR15 e CLR30) e concentrado protéico obtido com perclorato (CPP15 e CPP30). Verifica-se que os ratos que receberam dietas contendo caseína mostraram um crescimento superior às preparações de levedura, sendo que as dietas contendo células de levedura rompidas (CLR15 e CLR30) apresentaram um desempenho de crescimento significativamente melhor que as formulações CPP15 e CPP30. O ganho de peso (GP) apresentou a melhor média para o tratamento CAS30 seguido de CAS15 e CLR15.

É necessário ressaltar que durante as duas primeiras semanas de ensaio, os animais alimentados com as dietas CLR15 e CLR30, apresentaram diarreia intensa,

mesmo assim, não foi registrada perda de peso em nenhum dos 40 animais que formaram os dois grupos, o que explica o ganho de peso semelhante ao dos ratos alimentados com as preparações de CPP neste período. Após este período crítico os animais sofreram uma adaptação à dieta e a excreção fecal voltou à normalidade.

Este fato sugere que o aumento dos níveis protéicos das dietas foi acompanhado de um acréscimo na quantidade de fibra final das dietas, devido à presença da parede celular das células de levedura rompidas. Vários autores destacaram o efeito laxativo das fibras, ANDERSON & GUSTAFSON (1987) e ROBERTFROID (1993).

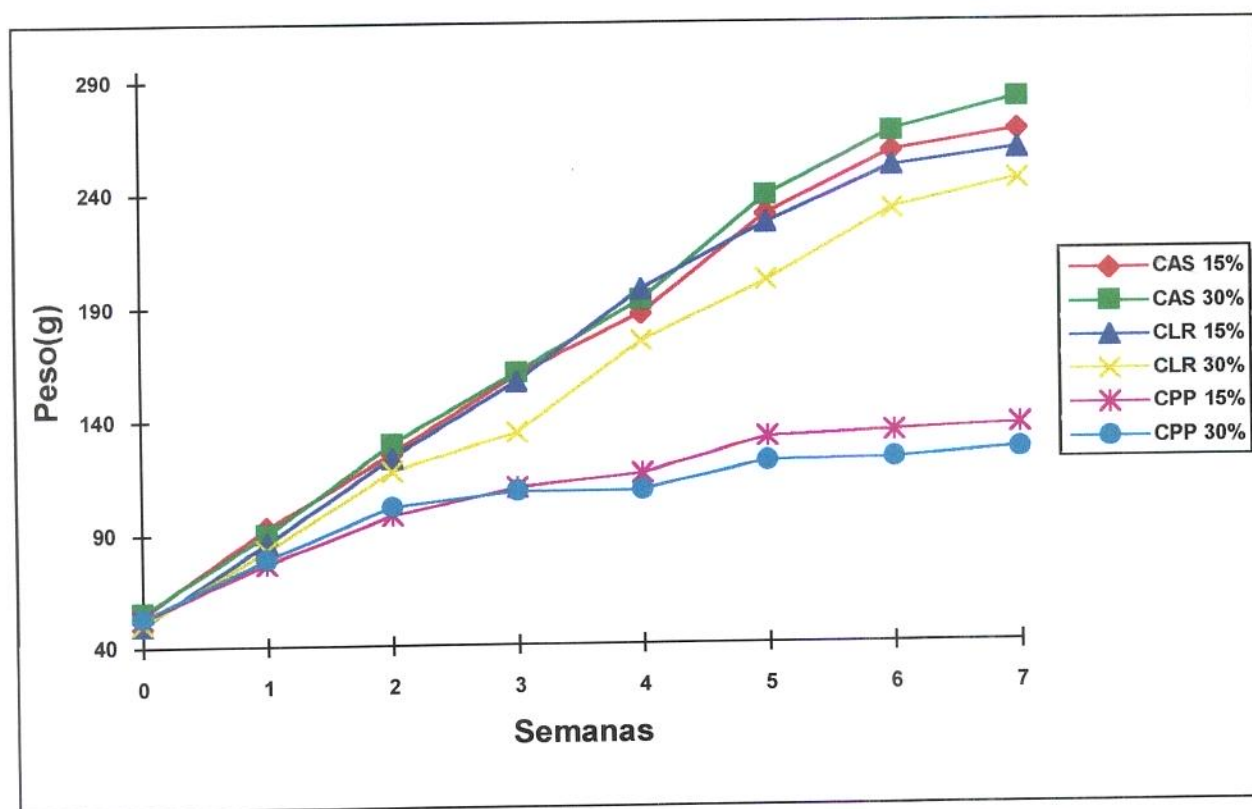


Figura 9. Curvas de crescimento de ratos sacrificados com 7 semanas em dietas contendo níveis protéicos de 15 e 30% de caseína (CAS15 CAS30), células de levedura rompidas (CLR15 e CLR30) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP15 e CPP30).

Os dados referentes aos valores médios da dieta consumida, proteína consumida, ganho de peso e quociente de eficiência alimentar, para ratos alimentados durante 45 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura são apresentados na Tabela 12.

Os ratos que receberam o tratamento CLR15, ingeriram maior quantidade de dieta quando comparados com os demais tratamentos. Os animais alimentados com dieta CPP30 consumiram apenas 23,17% da quantidade de dieta consumida pelo grupo CLR15. Constatou-se que o aumento do teor de proteína ocasionou uma diminuição da ingestão para todos os grupos, principalmente para os grupos CLR e CPP os quais reduziram em 39% e 40% o consumo de proteína respectivamente.

De acordo com ANDERSON (1989) dietas hiperprotéicas podem inibir a ingestão de alimentos em consequência das mudanças plasmáticas e cerebrais dos níveis de aminoácidos essenciais em ratos. Por exemplo, foi observado que ratos alimentados com dietas hiperprotéicas mostraram níveis plasmáticos elevados de aminoácidos ramificados, que pode influenciar o mecanismo de controle do apetite. As mudanças provocadas no comportamento alimentar podem ocorrer de duas formas:

- De forma direta devido à elevação dos níveis de aminoácidos ramificados livres no *pool* cerebral.
- Indiretamente, pelo bloqueio cerebral da elevação dos níveis de outros aminoácidos (neutros) que utilizam o mesmo sistema carreador para alcançar a barreira hematocefálica. A diminuição da concentração cerebral destes aminoácidos compromete a ingestão uma vez que servem como precursores para a síntese de neurotransmissores envolvidos no controle do mecanismo da fome e da saciedade.

A diminuição no consumo de dieta no tratamento CLR30, quando confrontado com a formulação CLR15, pode ter sido causada também pelo fato que o aumento do teor protéico, traz consigo a consequente elevação da quantidade de fibras da dieta. Em

estudos realizados por CUMMINGS (1978) e ELLIS & APLING (1981) foi evidenciado que as fibras solúveis retardam o esvaziamento do estomago, uma vez que diminuem a acidez do suco gástrico, favorecendo assim a saciedade e levando a uma sensação de plenitude por tempo maior.

TABELA 12. Dieta consumida (DC), proteína consumida (PC), ganho de peso (GP) e quociente de eficiência alimentar (QEA) para ratos alimentados durante 45 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteína.

Tratamento	DC (g)	PC (g)	GP (g)	QEA
CAS15	806,09b ± 28,72	120,35d ± 4,29	212,03b ± 16,56	0,26bc ± 0,02
CAS30	774,87b ± 87,76	240,75a ± 27,27	225,63a ± 15,76	0,30b ± 0,04
CLR15	846,52a ± 46,99	130,79c ± 7,26	208,37b ± 19,10	0,25c ± 0,03
CLR30	516,45c ± 31,35	150,85b ± 9,16	194,56c ± 18,36	0,38a ± 0,05
CPP15	311,97d ± 47,79	47,13f ± 7,21	83,36d ± 16,85	0,27bc ± 0,07
CPP30	196,17e ± 42,35	59,87e ± 12,93	72,54e ± 8,94	0,38a ± 0,05
D.M.	36,17	8,24	9,38	0,04
C.V. (%)	3,96	4,15	3,56	7,24

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem ao nível de 5% de significância

D.M.= Desvio da média

C.V.= Coeficiente de variação

Não foi observada diferença significativa no consumo de dieta dos tratamentos com caseína, uma vez que o grupo CAS30, teve uma redução de apenas 4% na variável DC quando comparado com o grupo na dieta CAS15.

No que se refere a proteína consumida (PC), nota-se que os seis tratamentos foram significativamente diferentes entre si ao nível de 5% de probabilidade. Embora o consumo de dieta tenha sido inferior nos grupos contendo 30% de proteína teste, foi notada uma ingestão de proteína maior por parte destes grupos quando comparados aos de 15%. Segundo ANDERSON (1989), estudos têm sido realizados sobre a habilidade do rato em regular a ingestão protéica no dia a dia. Nestes estudos, foram oferecidas dietas diferindo apenas no conteúdo de proteínas e carboidratos. Uma das dietas possuindo baixo teor de proteína e rica em carboidrato, a outra com alto teor protéico e pobre em carboidrato. As dietas foram mantidas isocalóricas por substituição de carboidratos por proteínas (ou vice-versa). Ambas dietas foram equilibradas com respeito ao teor de vitaminas, minerais e contendo uma densidade calórica semelhante porque o conteúdo de gordura foi o mesmo para ambas.

Foi observado que os ratos, mesmo alimentados com dietas contendo até 65% de proteínas, regularam sua ingestão protéica a proporções constantes, que correspondiam a 33% e/ou 35% da energia ingerida na dieta, portanto, quando a ingestão de energia se ajusta às necessidades calóricas do rato, a ingestão de proteína não é afetada.

Em relação ao quociente de eficiência alimentar (QEA) verifica-se que não houve diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os tratamentos CLR30 e CPP30 uma vez que mostraram médias aritméticas iguais e superiores aos demais tratamentos. A menor média correspondeu à formulação CLR15, embora tenha mostrado diferença significativa em relação às dietas CAS15 e CPP15. Este resultado demonstra que as

dietas CLR30 e CPP30 foram capazes de promover um maior ganho de peso por grama de dieta consumida durante o período de experimentação de 45 dias.

Observou-se que o crescimento dos ratos das dietas CPP15 e CPP30, sacrificados com 13 semanas, foi bastante inferior ao crescimento dos ratos das preparações à base de caseína e de células de levedura rompidas, além do que foi constatada uma ligeira perda de peso para os grupos CPP15 e CPP30 por volta da nona semana, o que pode ser melhor visualizado na Figura 10. Cabe ressaltar que embora tenham perdido peso, o grupo CPP30 teve uma pequena recuperação ponderal na 11 semana, a qual manteve até o final do experimento.

Resultados semelhantes aos aqui apresentados, foram obtidos por MARIATH (1981), em que ratos Wistar alimentados com dietas contendo 25% de proteína isolada de levedura de cerveja, sem redução do teor de ácidos nucléicos, mostraram um crescimento menor quando confrontados com o grupo controle (caseína 25%).

A Tabela 13 mostra os valores de dieta consumida, proteína consumida, ganho de peso e quociente de eficiência alimentar, para ratos alimentados durante 90 dias, correspondentes a cada um dos tratamentos. Observou-se que os grupos tratados com caseína apresentaram um consumo de dieta superior, os grupos CLR15 e CLR30 tiveram um consumo intermediário e os grupos CPP15 e CPP30 por sua vez, obtiveram médias bastante inferiores. É oportuno destacar que o comportamento de consumo alimentar ao final de 90 dias, diferiu daquele seguido pelos animais no fim de 45 dias de experimentação, onde à medida que aumentava o teor de proteína na dieta o consumo era reduzido significativamente, portanto o nível de proteína na dieta não alterou o consumo de dieta para os tratamentos com caseína e células de levedura rompidas para ambos os níveis, apenas os tratamentos CPP15 e CPP30 mostraram diferenças significativas ($p \leq 0,05$), traduzidas pela diminuição da ingestão quando o conteúdo de proteína foi elevado para 30%. ANDERSON (1989) explica, este

resultado argumentando que animais alimentados com dietas hiperprotéicas, inicialmente apresentam uma depressão da ingestão, a qual volta rapidamente ao normal, devido ao aumento da capacidade metabólica para catabolizar aminoácidos.

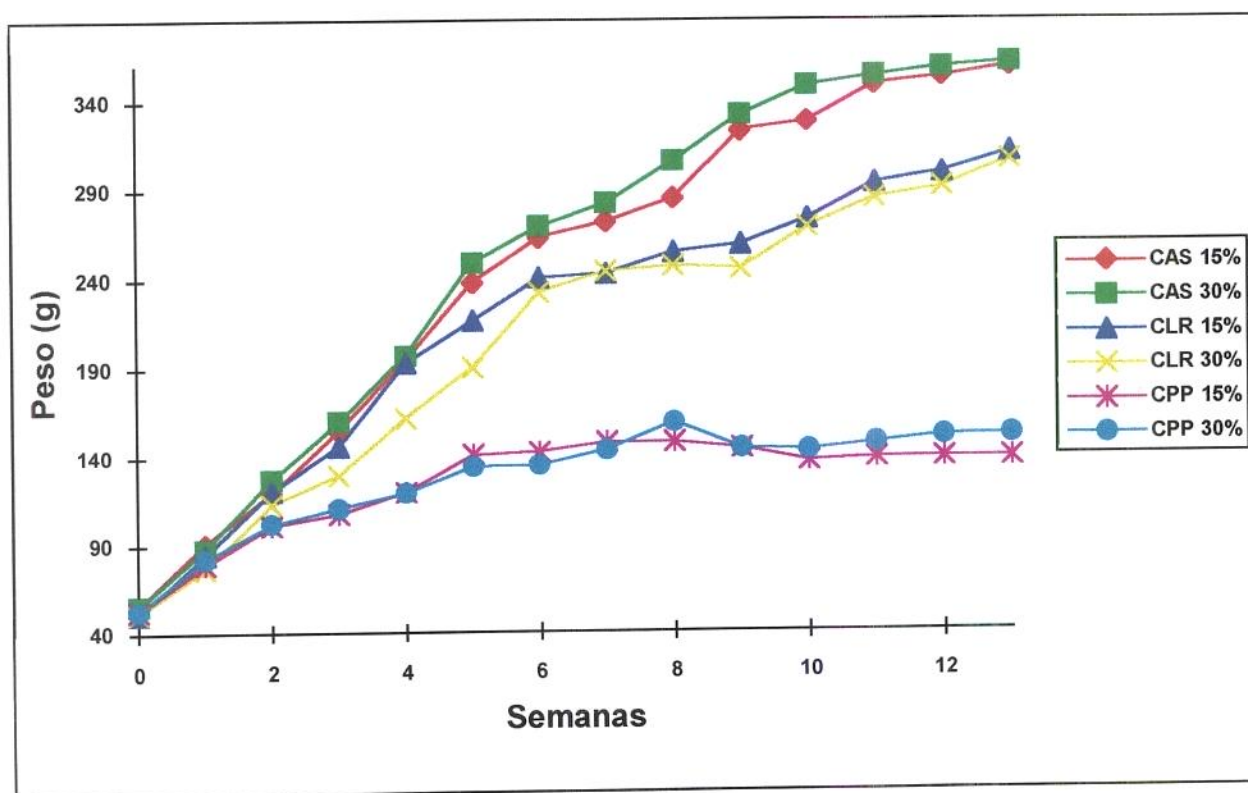


Figura 10. Curva de crescimento de ratos sacrificados com 13 semanas que receberam dietas contendo níveis protéicos de 15 e 30% de caseína (CAS15 CAS30), células de levedura rompida (CLR15 e CLR30) e concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP15 e CPP30).

No que se refere a proteína consumida, foi notado consumo maior para o tratamento CAS30 e o menor consumo protéico correspondeu à formulação CPP30. Para esta variável verificou-se diferença estatística entre todos os tratamentos ao nível de 5% de significância.

Como discutido anteriormente na Figura 10 o ganho de peso foi superior para os preparados de caseína e inferior para os concentrados de levedura. Por outro lado o ganho de peso intragrupos tratados com CAS, CLR e CPP mostrou igualdade estatística ($p \leq 0,05$) mesmo tendo apresentado médias aritméticas diferentes.

O melhor quociente de eficácia alimentar foi registrado para os ratos da preparação CPP30, já os animais da dieta CPP15 apresentaram o menor índice, o qual correspondeu a 40% da média do tratamento CPP30 e a 57% do valor

TABELA 13. Dieta consumida (DC), proteína consumida (PC), ganho de peso (GP) quociente de eficiência alimentar (QEA) para ratos alimentados durante 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de produtos à base de levedura e caseína.

Tratamento	DC	PC	GP	QEA
CAS15	1.441,91a ± 97,02	215,28c ± 14,48	303,56a ± 19,92	0,21b ± 0,01
CAS030	1.424,72a ± 91,67	442,66a ± 28,48	305,92a ± 20,88	0,22b ± 0,02
CLR15	1.254,76b ± 60,55	193,86d ± 9,36	259,67b ± 19,04	0,21b ± 0,01
CLR30	1.229,50b ± 52,55	359,14b ± 15,35	255,05b ± 23,31	0,21b ± 0,02
CPP15	753,24c ± 25,53	113,81e ± 3,86	86,40c ± 5,16	0,12c ± 0,01
CPP30	337,02d ± 26,12	102,86f ± 7,97	99,48c ± 13,83	0,30a ± 0,05
D.M.	38,75	9,46	16,33	0,02
C.V. (%)	2,27	2,51	4,71	6,03

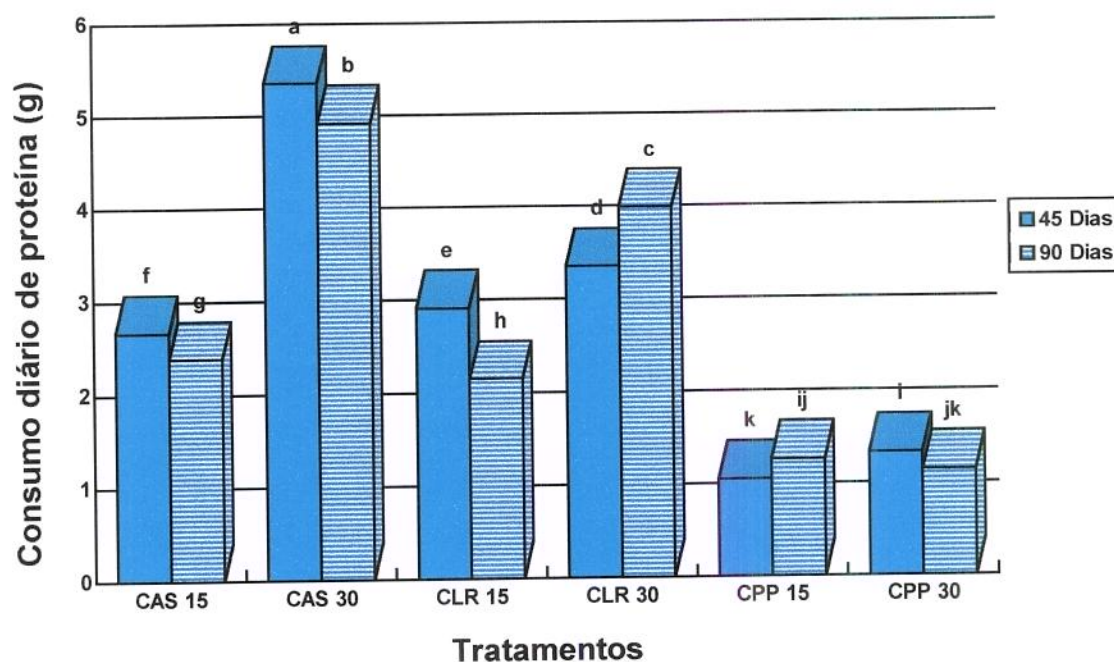
Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem ao nível de 5% de significância.

D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação

alcançado pelo preparado de caseína com o mesmo nível protéico, o que indica que o tratamento CPP15 alcançou menor ganho de peso, por grama de dieta consumida.

Em investigação realizada em ratos que receberam dietas contendo 25% de proteínas provenientes de isolado protéico de levedura de cervejaria e caseína, MARIATH (1981) verificou respostas similares às observadas neste estudo, uma vez que os animais alimentados com isolado protéico de levedura durante 91 dias apresentaram ganho de peso e quociente de eficácia alimentar inferior à caseína. Ambos trabalhos possuem um ponto em comum, qual seja extração protéica em condições alcalinas, o que leva a considerar que este tratamento pode resultar em redução da biodisponibilidade dos aminoácidos da proteína prejudicando assim o aproveitamento biológico, que se reflete no ganho de peso e consequentemente no QEA. Em pesquisa realizada com extração alcalina de proteína de *Candida utilis* ANCHOR et alii (1981) verificaram um aumento da racemização de aminoácidos, formação de lisinoalanina e diminuição da lisina disponível.

Quando se faz uma relação comparativa do consumo diário de proteína durante 45 e 90 dias como se vê na Figura 11, todos os tratamentos, com exceção das preparações CLR30 e CPP15, apresentaram uma diminuição significativa ($p \leq 0,05$) do consumo protéico. Isto é devido ao declínio do requerimento protéico do rato com a idade após o desmame, desta forma as necessidades nutricionais ao redor dos três meses de idade são consideravelmente menores do que a quantidade requerida durante a fase mais ativa do crescimento, ROGERS (1979).

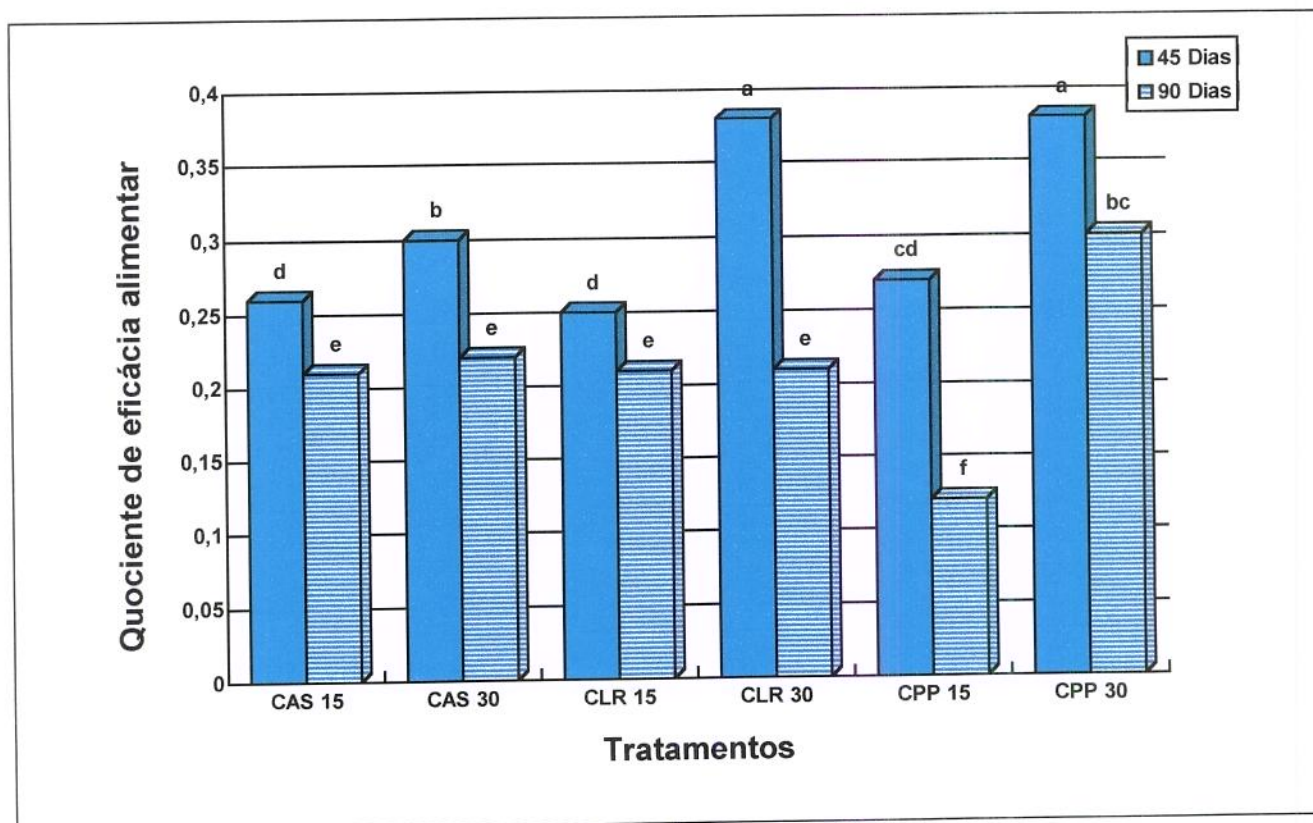


Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 11. Proteína consumida diariamente por ratos alimentados durante 45 e 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura obtidas por diferentes tratamentos.

Cabe destacar que o consumo diário de proteína das dietas CPP15 e CPP30 oscilou entre 1,05 e 1,33 g/dia, o que é muito semelhante ao consumo diário (1,09 g/dia) mostrado pelo grupo alimentado com dieta contendo 10% de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato de sódio durante 28 dias. É conhecido que a deficiência de proteína resulta numa diminuição do consumo alimentar, do ganho de peso, perda de pelos e pelos ásperos (sem brilho), sintomas que foram detectados nos animais das formulações CPP15 e CPP30 para ambos períodos de ensaio.

Na Figura 12 visualiza-se que o quociente de eficácia alimentar sofreu também uma redução do tempo 45 para o tempo 90, que variou entre 20 a 56% para todos os tratamentos.



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 12. Quociente de eficácia alimentar para ratos alimentados por períodos de 45 e 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura.

Estes resultados coincidem com os encontrados por COZZOLINO (1982), que observou que em ensaios biológicos de longa duração com ratos ocorre diminuição considerável dos valores do quociente de eficácia alimentar, em função do tempo.

4.6.2. Influência de proteína de levedura em alguns índices bioquímicos, determinados no soro sangüíneo e na urina de ratos Wistar

Níveis séricos de aminotransferases. Vários autores têm procurado correlacionar as alterações nas atividades de enzimas teciduais e sangüíneas com a qualidade da proteína ingerida e a integridade morfológica e funcional de alguns órgãos, ROGERS (1979); RINGLER & DABICH (1979); BRIGGS & OEHLME (1980) e HESSEL et alii (1996).

A Tabela 14 relaciona os níveis sangüíneos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos Wistar, correspondente a cada um dos tratamentos para ambos períodos (45 dias e 90 dias). Verificou-se que os níveis de aspartato aminotransferase nos ratos sacrificados com 45 dias (AST₄₅) mostraram uma elevação acima do normal nos tratamentos CAS15 e CAS30, os quais apresentaram igualdade estatística ao nível de 5% de significância. Os demais grupos mostraram índices que encontram-se dentro da faixa de variação normal. Os animais alimentados com as preparações CAS15 e CAS30, embora apresentassem um aumento anormal da AST₄₅, não apresentaram sinais clínicos de doença, conservando portanto, a aparência de ratos normais e saudáveis.

Na determinação de aspartato aminotransferase para o tempo de 90 dias (AST₉₀) percebeu-se que houve diminuição dos níveis de atividade desta enzima, para os tratamentos CAS e CLR nos dois níveis protéicos, por outro lado nos tratamentos CPP15 e CPP30 observou-se um incremento dos níveis quando comparada com a AST₄₅, valores estes que superam os limites de variação normal deste índice. Os ratos do grupo CLR30 obtiveram o menor índice, porém está dentro da faixa de variação normal. De acordo com RAVEL (1995), em injúrias benígnas de rins, fígado e músculo

TABELA 14. Níveis sanguíneos de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em ratos Wistar alimentados com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína, por períodos de 45 e 90 dias.

Tratamento	AST ₄₅ (U/I)	ALT ₄₅ (U/I)	AST ₉₀ (U/I)	ALT ₉₀ (U/I)
ZERO	67,58 c ± 10,64	18,34 d ± 1,83	67,58 b ± 10,64	18,34 c ± 1,83
CAS 15	91,08 a ± 2,64	32,13 c ± 1,24	65,19 b ± 6,79	17,30 c ± 3,82
CAS 30	93,64 a ± 1,64	32,74 c ± 14,08	60,41 bc ± 6,56	17,64 c ± 2,97
CLR 15	71,76 c ± 3,26	15,91 d ± 0,98	52,76 cd ± 4,93	11,28 d ± 2,33
CLR 30	71,39 c ± 2,15	18,10 d ± 1,27	49,36 d ± 6,94	9,50 d ± 3,26
CPP 15	77,09 b ± 6,69	41,81 a ± 7,30	85,14 a ± 7,24	33,95 b ± 7,47
CPP 30	77,63 b ± 7,46	38,06 b ± 4,91	85,39 a ± 12,65	39,50 a ± 6,24
D.M.	4,89	2,91	10,01	4,94
C.V. (%)	2,40	3,99	5,82	9,08

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância.

D.M.= desvio da média

C.V.=coeficiente de variação

esquelético, os níveis séricos de AST podem estar ligeira e/ou moderadamente aumentados por períodos curtos de tempo, em alguns casos podem permanecer dentro dos limites de referência considerados normais. O mesmo autor destaca um extenso

grupo de doenças que são acompanhadas por elevações discretas e/ou moderadas dos níveis de AST entre as quais se incluem hepatites agudas em fase de recuperação, hepatite crônica, cirrose ativa, congestão passiva do fígado, disfunções hepáticas induzidas por drogas, obstruções do ducto biliar extra-hepático, mononucleose infecciosa, na esteatose hepática, inflamação muscular (infecciosa ou não infecciosa), infarto intestinal, pancreatite agudas e hipotireoidismo.

Quando analisados os dados correspondentes à alanina aminotransferase com 45 dias (ALT₄₅) e com 90 dias (ALT₉₀), nota-se que as dietas com caseína alcançaram níveis de ALT₄₅ discretamente acima do limite de referência normal. Os valores de ALT₄₅ e ALT₉₀, dos tratamentos CLR15 e CLR30 foram significativamente inferiores ($p \leq 0,05$) aos níveis apresentados pelos tratamentos com caseína para ambos períodos. Contrariamente ao comportamento da ALT para os grupos que receberam CLR, os animais alimentados com os concentrados protéicos de levedura (CPP15 e CPP30) registraram médias superiores às preparações com caseína.

É importante destacar que houve uma redução considerável dos níveis de ALT₉₀ para todos os tratamentos quando confrontado com os resultados obtidos aos 45 dias (ALT₄₅). Segundo LIMA et alii (1989), como a ALT existe em maior quantidade no hepatócito do que em outros tecidos, o seu aumento, mesmo não sendo maior que o da AST, possui um maior significado clínico como sinal de lesão hepática.

Os níveis de ALT estão elevados geralmente no mesmo grau e frequência que a AST na hepatite viral, mononucleose infecciosa e na injúria celular hepática induzida por drogas. A ALT, tem sido usada predominantemente para ajudar a confirmar a origem hepática de um aumento da AST, RAVEL (1995).

De acordo com os autores acima citados a relação AST/ALT pode dar uma idéia do grau de lesão do hepatócito. A relação inferior a 1,0, sugere lesão citoplasmática do hepatócito (hepatite infecciosa aguda, mononucleose infecciosa,

obstruções extra-hepáticas) e quando igual ou superior a 1,0 revela lesões citoplasmáticas e mitocondriais do hepatócito (cirrose, esteatose, injúrias produzidas por drogas, hepatite crônica). As informações esclarecedoras destes dois autores no caso dos tratamentos que apresentaram um aumento concomitante de ambas aminotransferases, permitem sugerir a possibilidade de que os animais destes grupos apresentem lesões citoplasmática e/ou mitocondrial do hepatócito, visto que a relação AST/ALT variou entre 1,84 e 2,8.

Com respeito à diminuição dos valores de AST₉₀ e ALT₉₀ nos grupos alimentados com as preparações CLR15 e CLR30, BELDA (1977) explica que os níveis de AST e ALT diminuem em função da quantidade de proteína da ração, sendo esta redução mais visível em ratos, alimentados com proteínas limitantes em metionina.

Na busca da causa do aumento da atividade das aminotransferases para os tratamentos CPP15 e CPP30 aos 45 e 90 dias vários trabalhos foram consultados ROGERS (1979); MOURA (1986); NAYAK (1987) e VIJAYALAKSHMI & MOTLAG (1990 e 1992) o que permitiu especular que a elevação dos níveis séricos destas enzimas possa ser devida a:

- Ingestão qualitativa e quantitativa inadequada de proteínas que provocaram um desequilíbrio nutricional, o qual por sua vez ocasionou modificações estruturais e funcionais do fígado.
- A lesão de mitocôndrias hepáticas por resíduo de perclorato que possa ter ficado como contaminante no concentrado protéico.

Níveis séricos e urinários de creatinina. Os resultados dos níveis sanguíneos e urinários de creatinina (CR) em ratos Wistar alimentados durante 45 e 90 dias, com dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína encontram-se

relacionados na Tabela 15. Foi notado que os maiores níveis de creatinina no soro sanguíneo aos 45 dias (CRS₄₅) foram encontrados nas dietas CAS30 e CAS15 (iguais estatisticamente $p \leq 0,05$). Médias intermediárias foram apresentadas pelos grupos (CLR15 e CLR30). Os menores valores foram obtidos para os ratos do grupo Zero (recém desmamados), embora os grupos CPP15 e CPP30 apresentassem médias aritméticas superiores ao grupo Zero, estes três tratamentos foram iguais estatisticamente ao nível de 5% de significância. Nas amostras de creatinina no soro sanguíneo aos 90 dias (CRS₉₀) verificou-se que houve uma redução dos índices para os grupos CAS15 e CAS30 de aproximadamente 59%, quando confrontados com os resultados dos mesmos tratamentos aos 45 dias. Os animais tratados com as dietas CLR15, CLR30, CPP15 e CPP30, apresentaram resultados opostos aos obtidos pelas dietas contendo caseína, uma vez que os índices de CRS₉₀ apresentaram aumentos de 54, 53, 68 e 59%, respectivamente.

No caso das determinações de creatinina na urina para os tempos 45 dias (CRU₄₅) e 90 dias (CRU₉₀) detecta-se que todos os tratamentos mostraram igualdade estatística ($p \leq 0,05$) para a variável CRU₄₅. De modo geral percebe-se redução considerável dos níveis de creatinina urinária dos 45 dias para 90 dias em todos os tratamentos, excetuando as preparações CPP15 e CPP30, que apresentaram uma elevação dos teores de creatinina urinária de 20 e 33%, respectivamente.

Os valores de creatinina no soro sanguíneo para ambos os tempos, encontram-se acima dos limites de referência normal para todos os tratamentos. Por outro lado as médias encontradas neste estudo para a variável creatinina urinária, coincidem com os resultados obtidos por MARIATH (1981), uma vez que tanto nos estudos com 28 e 91 dias, utilizando dietas contendo 10 e 25% de isolado protéico de levedura e caseína, encontrou-se que a excreção de creatinina diminuiu ao longo do tempo nos ratos

TABELA 15. Níveis sanguíneos e urinários de creatinina (CR) em ratos Wistar alimentados durante 45 e 90 dias, com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína.

Tratamento	CRS45 (mg/dL)	CRS90 (mg/dL)	CRU45 (g / L)	CRU90 (g / L)
ZERO	0,90 c ± 0,05	0,90 c ± 0,05	n.d	n.d
CAS15	2,49 a ± 0,14	1,03 c ± 0,04	1,35 a ± 0,27	1,05 b ± 0,29
CAS30	2,54 a ± 0,20	1,04 c ± 0,13	1,50 a ± 0,41	0,93 b ± 0,12
CLR15	1,40 b ± 0,13	2,15 a ± 0,09	1,16 a ± 0,11	1,09 b ± 0,47
CLR30	1,35 b ± 0,11	2,06 a ± 0,13	1,26 a ± 0,04	1,29 ab ± 0,50
CPP15	1,03 c ± 0,03	1,73 ab ± 0,85	1,47 a ± 0,58	1,76 a ± 0,78
CPP30	1,00 c ± 0,10	1,59 b ± 0,30	1,28 a ± 0,37	1,70 a ± 0,55
D.M.	0,19	0,43	0,35	0,59
C.V. (%)	4,74	11,19	10,69	18,47

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância.

D.M.= desvio da média; C. V.= coeficiente de variação

Valores normais de creatinina sérica: 0,20 - 0,80 mg/dL (HARKNESS , 1993)

CRS45: Níveis de creatinina no soro sanguíneo após 45 dias de ensaio

CRS90: Níveis de creatinina no soro sanguíneo após 90 dias de ensaio

CRU45: Níveis de creatinina na urina após 45 dias de ensaio

CRU90: Níveis de creatinina na urina após 90 dias de ensaio

n.d: não determinado

alimentados com caseína e aumentou para os tratamentos com isolado protéico de levedura.

Segundo KOPPLE (1989) os níveis de creatinina sérica por si só não avaliam de forma eficiente a função renal, para tanto o diagnóstico definitivo pode ser dado quando os resultados de creatinina são associados à ingestão protéica e uréia sanguínea e urinária.

A redução nos níveis de creatinina urinária dos 45 dias para 90 dias, nos tratamentos com caseína e CLR, é justificado com base em RAVEL (1995) mostrando que a excreção da creatinina diminui com a idade. Por outro lado MUNRO & CRIM (1989) afirmam que a excreção de creatinina tem sido utilizada também como uma medida para avaliar a depleção muscular, uma vez que se assume que o teor de creatinina no músculo é praticamente constante.

De acordo com MOTTA (1989) a diminuição da filtração glomerular é caracterizada por elevação dos níveis plasmáticos, com a consequente redução da excreção urinária.

O aumento nos níveis de creatinina ocorreu de forma concomitante na urina e no sangue dos ratos alimentados com concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP). Portanto os dados encontrados sugerem depleção muscular, produto da baixa ingestão protéica apresentada pelos grupos tratados com dietas CPP15 e CPP30. Isto porque, mesmo que a análise de aminoácidos tenha apresentado adequação quantitativa com o padrão FAO/WHO/UNU (1985), provavelmente os aminoácidos presentes podem não estar 100% biodisponível. Sendo assim redução da biodisponibilidade da lisina para o concentrado protéico de levedura e uma possível inadequação da metionina disponível, poderiam causar uma mobilização destes aminoácidos das reservas musculares para preservar a síntese protéica endógena, fato este que estaria caracterizado pela elevação da creatinina sérica e urinária. Portanto, a

hipótese de uma possível redução da velocidade de filtração glomerular fica descartada.

Níveis sanguíneos e urinários de uréia. Os resultados da Tabela 16 demonstram que a qualidade e quantidade das proteínas não influenciaram estatisticamente os níveis sanguíneos de uréia com 45 dias (URS₄₅) nos tratamentos Zero, CAS15, CAS30, CLR15, e CLR30. Os tratamentos CPP15 e CPP30 apresentaram os menores valores, porém os resultados de todos os tratamentos encontram-se dentro dos limites de referência normal para ratos albinos sadios (5,0 - 29,0 mg/dL), MITRUKA & RAWNSLEY (1981) .

O aumento do teor de proteína da dieta nas dietas com caseína, causou uma elevação da taxa de URS₉₀ de aproximadamente 43%, resultado que apresentou uma diferença estatística ao nível de 5% de significância para os grupos CAS15 e CAS30. Os tratamentos com células de levedura rompidas , também mostraram um discreto aumento no índice de URS₉₀ em função do aumento do conteúdo protéico da dieta, mesmo assim as médias foram estatisticamente iguais. O conteúdo protéico das dietas CPP15 e CPP30 não provocou mudanças consideráveis nos níveis de URS₉₀, no entanto observou-se uma redução de aproximadamente 16% na taxa de uréia sanguínea da coleta realizada com 45 dias , para as amostras tomadas aos 90 dias . De acordo com LOWE et alii (1985) a redução da ingestão alimentar provoca diminuição da taxa de uréia sanguínea.

O aumento dos níveis sanguíneos de uréia aos 90 dias, sugere que esta elevação possa ter sido provocada pelo excesso de ingestão protéica e pela idade mais avançada dos ratos neste período, RAVEL (1995).

TABELA 16. Níveis sangüíneos e urinários de uréia (UR) em ratos Wistar alimentados com dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína durante 45 e 90 dias.

Tratamento	URS45 (mg/dL)	URS90 (mg/dL)	URU45 (mg/24h)	URU90 (mg/24h)
ZERO	12,48 ab ± 1,62	12,48 d ± 1,62	n.d.	n.d.
CAS15	13,13 a ± 0,89	26,84 b ± 5,03	14,48 b ± 2,69	27,50 b ± 9,68
CAS30	14,89 a ± 2,31	47,39 a ± 8,37	55,49 a ± 14,93	58,16 a ± 12,31
CLR15	13,95 a ± 2,66	14,73 cd ± 4,12	18,04 b ± 3,69	11,65 c ± 2,46
CLR30	14,43 a ± 1,51	17,23 c ± 3,69	18,86 b ± 2,69	27,88 b ± 1,37
CPP15	9,16 c ± 3,24	7,81 e ± 1,22	16,78 b ± 4,75	27,76 b ± 3,44
CPP30	9,34 b c ± 3,29	7,89 e ± 1,23	17,47 b ± 7,67	28,64 b ± 4,25
D.M.	3,29	3,43	7,24	7,63
C.V.(%)	10,22	6,91	12,51	10,24

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância.
D.M.= desvio da média; C.V.= coeficiente de variação

Valores normais de uréia sérica : 5,0 - 29,0 mg/dL (MITRUKA & RAWNSLEY , 1981)
15,0 - 21,0 mg/dL (HARKNESS , 1993)

URS45: níveis de uréia no soro sangüíneo após 45 dias de ensaio

URS90: Níveis de uréia no soro sangüíneo após 90 dias de ensaio

URU45: Níveis de uréia na urina após 45 dias de ensaio

URU90: Níveis de uréia na urina após 90 dias de ensaio

n.d.: não determinado

A excreção urinária de uréia foi superior no grupo CAS30 para ambos períodos quando comparada com os demais grupos, cujas médias aritméticas, embora

diferentes, não revelaram significância estatística, excetuando o grupo CLR, que obteve média significativamente inferior para as amostras URU₉₀.

Foi observado ao longo do tempo, um aumento dos níveis de uréia urinária para todos os grupos. Comportamento contrário ao mencionado anteriormente foi verificado apenas para a preparação CLR15.

Alterações no metabolismo das proteínas, estimulados por aumentos ou reduções na ingestão protéica alteram o teor de uréia sangüínea. Estas alterações são detectadas facilmente pela medida de excreção de uréia urinária. Deste, modo, dieta rica em proteínas, febre e estresse, podem elevar os níveis de uréia por aumentarem o catabolismo protéico, teores reduzidos são encontrados em períodos de baixa ingestão de proteínas ou de aumento de síntese protéica, MOTTA (1989).

As reduções das taxas sangüíneas e / ou urinárias podem estar associadas também a doenças hepáticas, LIMA (1989), fato que pode explicar os resultados sangüíneos encontrados para as amostras CPP e a diminuição da excreção urinária apresentada pelo grupo CLR15.

Contrariamente aos resultados observados nesta pesquisa HERNÁNDEZ-ROSALES et alii (1985) encontraram que ratos alimentados com dietas contendo 21% de proteína de *Candida utilis* apresentaram taxas inferiores de uréia para a caseína e superiores para a proteína de levedura após 30 dias de ensaio. Por outro lado verificaram que a uréia sérica continuou aumentando nos animais tratados com levedura aos 60 dias do período experimental. Associados a estes índices bioquímicos, os grupos alimentados com a biomassa de levedura apresentaram mudanças morfológicas significativas no sistema excretor renal, as quais incluíam dilatações dos túbulos e calcificações microscópicas, detectadas através de estudos histológicos.

Níveis sanguíneos e urinários de ácido úrico. A Tabela 17 apresenta os níveis sanguíneos e urinários de ácido úrico em ratos Wistar para cada tratamento estudado.

Constatou-se que os níveis séricos de ácido úrico (AUS) apresentaram valores normais para todos os tratamentos durante ambos períodos experimentais.

A variável AUS₄₅ foi superior para a formulação CLR30, os valores inferiores corresponderam aos grupos CAS15 e Zero, os outros grupos alcançaram médias aritméticas intermediárias e iguais estatisticamente entre si ($p \leq 0,05$). Neste sentido acredita-se que as maiores taxas séricas de ácido úrico observadas pelo grupo CLR30, advêm do maior teor de ácidos nucleicos fornecidos por esta formulação, uma vez que a diminuição do consumo protéico verificada dos 45 dias para 90 dias, foi acompanhada de uma redução dos níveis de AUS.

Os resultados de AUS₉₀ foram estatisticamente iguais para os tratamentos CAS15, CAS30, CPP15 e CPP30. Os índices séricos de ácido úrico obtidos não sugerem a presença de doenças renais. Segundo MOTTA (1989) níveis séricos elevados de ácido úrico são encontrados após a ingestão de dietas ricas em purinas ou em consequência de uma drástica redução na ingestão dietética total, resultando em aumento do desdobramento tecidual.

Os resultados encontrados confirmam os dados obtidos por WASLIEN et alii (1970), os quais verificaram um aumento no teor plasmático de ácido úrico e na excreção urinária após ingestão de dietas hiperprotéicas à base de leveduras.

PÓO & MILLÁN (1990) verificaram respostas opostas às constatadas neste ensaio, já que a ingestão de dietas contendo 24% de proteínas de *Saccharomyces carlsbergensis*, não modificaram os níveis de ácido úrico plasmático em aves.

Com relação a excreção urinária de ácido úrico (AUU) nota-se que as dietas preparadas com proteínas de levedura apresentaram níveis de AUU₄₅ superiores à

TABELA 17. Níveis sanguíneos e urinários de ácido úrico (AU) em ratos Wistar alimentados com preparações contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína por períodos de 45 e 90 dias.

Tratamento	AUS45 (mg/dL)	AUS90 (mg/dL)	AUU45 (mg/24h)	AUU90 (mg/24h)
ZERO	1,45 c ± 0,58	1,45 d ± 0,58	n.d	n.d
CAS15	1,65 c ± 0,69	2,14 c ± 0,25	34,84 d ± 8,47	91,53 ab ± 3,42
CAS30	2,89 b ± 0,31	2,14 c ± 0,30	47,23 c ± 7,82	79,20 ab ± 2,02
CLR15	3,12 b ± 0,55	3,35 a ± 0,52	52,07 bc ± 13,89	106,89 ab ± 2,41
CLR30	5,36 a ± 1,89	2,84 b ± 0,18	82,32 a ± 9,46	114,58 a ± 5,63
CPP15	2,19 bc ± 0,88	2,52 bc ± 0,75	57,26 b ± 1,84	59,41 b ± 4,91
CPP30	2,21 bc ± 0,57	2,18 c ± 0,59	82,76 a ± 2,74	97,62 ab ± 18,00
D.M.	1,06	0,45	8,35	50,03
C.V. (%)	15,16	7,41	5,71	22,20

Medias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação

Valores normais de ácido úrico sanguíneo: 1,20 - 7,50 mg/dL (MITRUKA & RAWNSLEY , 1981)
AUS45: Níveis de ácido úrico no soro sanguíneo após 45 dias de ensaio
AUS90: Níveis de ácido úrico no soro sanguíneo após 90 dias de ensaio
AUU45: Níveis de ácido úrico na urina após 45 dias de ensaio
AUU90: Níveis de ácido úrico na urina após 90 dias de ensaio
n.d: não determinado

caseína. Os tratamentos CPP15 e CPP30 apresentaram médias que superaram em 43% os valores de excreção da dieta CAS30.

O aumento dos níveis de ácido úrico para os tratamentos com células de levedura rompida foram ocasionados provavelmente pela degradação dos ácidos nucleicos que foram consumidos juntamente com a dieta. A elevação dos níveis de ácido úrico no tratamento CPP30 pode ser de origem endógena, uma vez que o concentrado protéico sofreu redução química do teor de ácido ribonucleico. Vários autores sugeriram que o ácido úrico endógeno seria formado a partir da hipoxantina do ácido inosínico presente no tecido muscular, MOURA (1986); MUNRO & CRIM (1989) e RAVEL (1995).

A excreção urinária continuou a elevar-se para todos os tratamentos na tomada de amostra com 90 dias. A excreção de AUU₉₀ foi superior para a dieta CLR30 e inferior para o tratamento CPP15, as quais foram diferentes estatisticamente ($p \leq 0,05$). Os demais tratamentos tiveram médias intermediárias e iguais, ao nível de 5% de probabilidade. De acordo com SARWAR et alii (1986) a ingestão de dietas contendo 20% de proteínas provenientes de levedura (*Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*) resultaram no aumento do volume de urina (3,5 vezes) e na elevação dos níveis de alantoína plasmática e urinária (2,5 vezes) quando comparados com os valores da caseína.

O aumento dos níveis de AUU₉₀ nos tratamentos com caseína e concentrado protéico de levedura para taxas próximas das alcançadas pelo tratamento CLR30, reforçam a hipótese de estar ocorrendo elevada síntese endógena de ácido úrico através do metabolismo tissular.

4.6.3. Resultados da análise de órgãos

Fígado. O fígado é um órgão de vital importância no metabolismo de proteínas porque é no fígado que ocorre a desaminação dos aminoácidos, formação de uréia para a remoção da amônia dos líquidos orgânicos, formação das proteínas plasmáticas e interconversões entre os diferentes aminoácidos e outros compostos importantes para os processos metabólicos do organismo. Portanto, é muito susceptível a injúrias causadas por desequilíbrios nutricionais, principalmente pelo consumo de proteínas de baixa qualidade ou quantidade, insuficiente.

Os resultados mostrados na Tabela 18 evidenciam que os ratos alimentados com caseína 30% durante 45 dias (PFig45) apresentaram um fígado de maior peso. A menor média do ensaio correspondeu à dieta CPP30. Apenas os tratamentos com células de levedura rompidas no níveis 15 e 30% apresentaram igualdade estatística.

O peso do fígado expresso como percentagem do peso corporal (%Fig) para ratos sacrificados aos 45 dias de experimento mostrou que as formulações preparadas com caseína (15 e 30%) alcançaram médias superiores e estatisticamente diferentes ($p \leq 0,05$) quando comparadas com os outros tratamentos. A média inferior da variável %Fig correspondeu à dieta CPP30. Por outro lado, os grupos com células rompidas para ambos níveis protéicos apresentaram médias intermediárias, porém estatisticamente diferentes entre si. Estes resultados são concordantes com os dados encontrados por ROBBINS & SEELEY (1977) que registraram um aumento da relação fígado/ peso corporal (%) quando o teor de células de levedura na dieta era elevado.

Aos 90 dias de ensaio a maior média para a variável peso de fígado (PFig90) continuou a ser do tratamento com caseína 30%, o menor peso de fígado correspondeu ao concentrado protéico de levedura, dieta com 15% de proteína (CPP15).

TABELA 18. Peso de fígado (PFig) e percentagem de fígado em relação ao peso corporal (%Fig) de ratos que receberam durante 45 e 90 dias dietas contendo 15 e 30 % de proteínas de levedura e caseína.

Tratamento	Pfig45 (g)	%Fig45 (%)	PFig90 (g)	%Fig90 (%)
ZERO	1,92 f ± 0,27	3,62 d ± 0,28	1,92 f ± 0,27	3,62 a ± 0,28
CAS15	11,70 b ± 1,53	4,38 a ± 0,47	12,43 b ± 0,92	3,46 b ± 0,25
CAS30	12,25 a ± 0,93	4,36 a ± 0,29	13,12 a ± 1,58	3,63 a ± 0,32
CLR15	10,24 c ± 1,19	3,96 c ± 0,35	9,86 c ± 1,79	3,17 d ± 0,48
CLR30	10,23 c ± 0,97	4,17 b ± 0,15	10,18 c ± 0,98	3,34 c ± 0,38
CPP15	5,38 d ± 0,69	3,95 c ± 0,16	4,41 e ± 0,24	3,17 d ± 0,15
CPP30	4,73 e ± 0,46	3,77 d ± 0,23	5,51 d ± 0,73	3,39 bc ± 0,34
D.M.	0,54	0,16	0,57	0,12
C.V. (%)	4,04	2,42	4,25	2,19

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação

PFig45: Peso do fígado aos 45 dias

%Fig45: Percentagem de fígado em relação ao peso corporal aos 45 dias

PFig90: Peso de fígado aos 90 dias

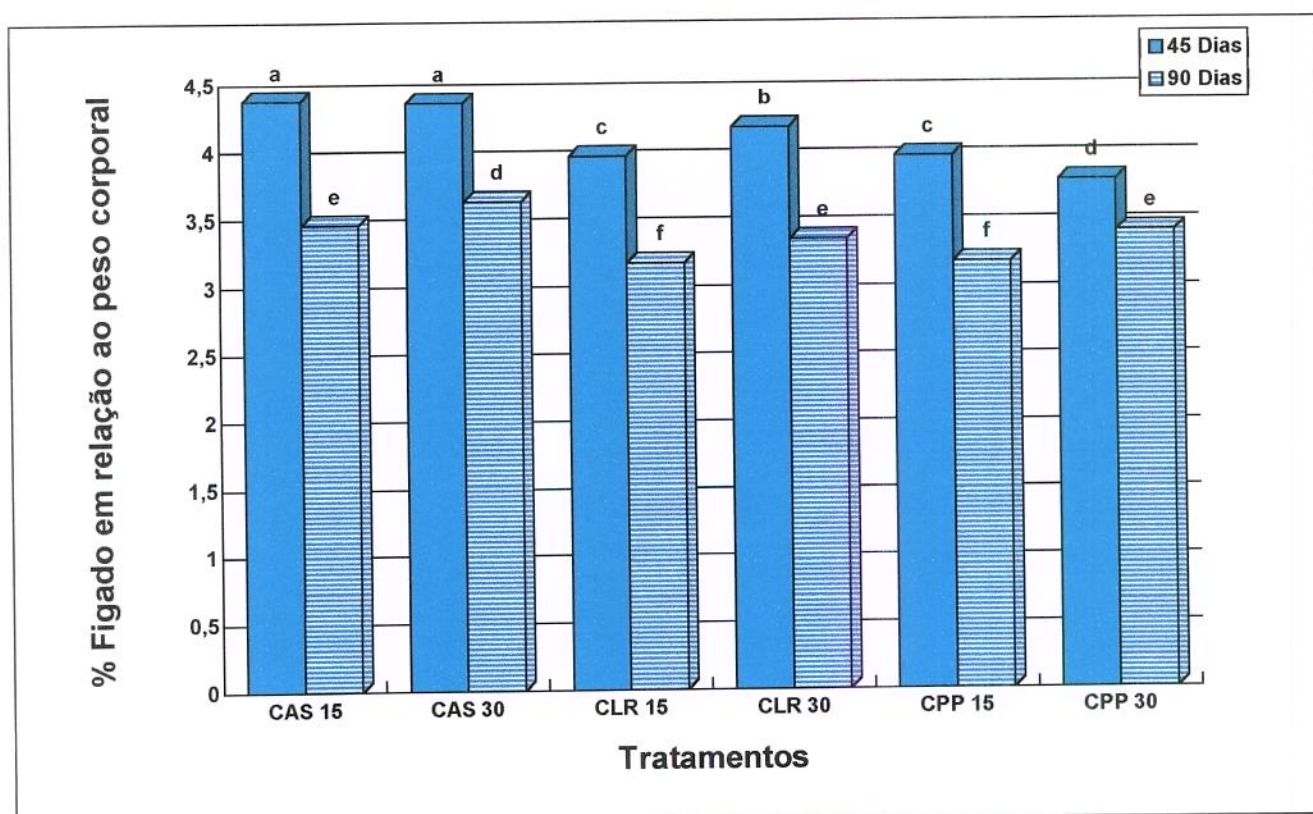
%Fig90: Percentagem de fígado em relação ao peso corporal aos 90 dias

No decorrer do experimento foi detectada uma diminuição do peso do fígado nos tratamentos CLR15 e CPP15 de 3,7% e 18%, respectivamente. Este resultado, a

princípio pode ser interpretado como uma alteração da síntese protéica hepática ocasionada pelo aporte inadequado de aminoácidos essenciais.

A percentagem de fígado em relação ao peso corporal aos 90 dias (% Fig 90) mostrou uma redução com valores semelhantes para todos os tratamentos, sendo que com exceção do tratamento CAS30, as demais formulações obtiveram valores inferiores ao grupo Zero.

A relação comparativa da percentagem de fígado em relação ao peso corporal (% Fig) durante 45 e 90 dias, correspondente a cada um dos tratamentos pode ser melhor visualizada na Figura 13. Percebe-se que o tempo e o teor protéico da dieta



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 13. Percentagem de fígado em relação ao peso corporal (% Fig) de ratos Wistar que receberam dietas durante 45 e 90 dias contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína.

influenciaram significativamente esta variável, visto que no decorrer do tempo houve um visível decréscimo desta relação e as dietas contendo 30% de proteínas registraram média superiores.

Os dados de lipídios totais (LTF) e proteínas totais (PTF) de fígado de ratos Wistar que receberam dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína durante 45 e 90 dias são apresentados na Tabela 19. Observa-se que a proteína de levedura de cervejaria ocasionou aumento dos níveis de gordura hepática e consequente redução do teor de proteína no órgão em ambos períodos de tempo.

Na Figura 14 pode-se constatar que o teor de lipídios totais aumentou ao longo do tempo para todos os grupos, porém o aumento dos LTF₄₅ para o LTF₉₀, não foi significativo ($p \leq 0,05$), no entanto os grupos alimentados com proteínas de levedura mostraram médias superiores e estatisticamente diferentes.

O maior conteúdo de lipídios hepático acumulados no decorrer do ensaio pertenceram aos grupos CPP15 e CPP30. Estes dados foram compatíveis com os encontrados por JENKINS & MITCHELL (1989), os quais mostraram aumento da quantidade de lipídios a nível hepático em ratos alimentados com autolisado de levedura.

Sabe-se que dietas deficientes em colina, ácido pantotênico, proteínas ou aminoácidos como a treonina, histidina ou metionina causam rigidez, amarelamento e distensão de hepatócitos, ocasionados por acúmulo de gordura, ROGERS (1979); CHURCH & POND (1988).

O elevado aumento dos lipídios hepáticos nos tratamentos aliado à coloração castanho-amarelada do fígado nos ratos alimentados com as dietas CLR e CPP aos 90 dias, caracterizam a presença de esteatose hepática.

A percentagem de proteínas totais em fígado de ratos alimentados contendo 15 e 30% de proteínas de levedura de cervejaria e caseína durante 45 e 90 dias pode ser visualizada na Figura 15. Observa-se que os tratamentos CAS30, CLR15, CLR30,

TABELA 19 - Lipídios totais no fígado (LTF) e proteínas totais no fígado (PTF) de ratos Wistar que receberam dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína durante 45 e 90 dias.

Tratamento	LTF ₄₅ (%)	PTF ₄₅ (%)	LTF ₉₀ (%)	PTF ₉₀ (%)
ZERO	4,56 b ± 0,03	23,79 e ± 0,24	4,56 c ± 0,03	23,79 c ± 0,24
CAS15	4,90 b ± 0,10	26,30 cd ± 0,43	5,36 c ± 0,31	27,15 ab ± 0,20
CAS30	5,09 b ± 0,05	30,54 a ± 0,84	5,52 c ± 0,77	28,38 a ± 0,60
CLR15	7,08 a ± 0,19	25,93 cd ± 0,15	11,05 b ± 0,75	22,94 c ± 1,01
CLR30	7,11 a ± 0,45	28,19 b ± 0,62	9,02 b ± 0,21	26,46 b ± 0,44
CPP15	7,60 a ± 0,43	24,95 de ± 0,05	16,91 a ± 0,24	18,47 d ± 0,45
CPP30	7,86 a ± 0,21	26,78 bc ± 0,25	17,48 a ± 1,61	18,43 d ± 0,84
D.M.	0,90	1,45	2,82	1,24
C.V. (%)	1,99	0,76	3,93	0,73

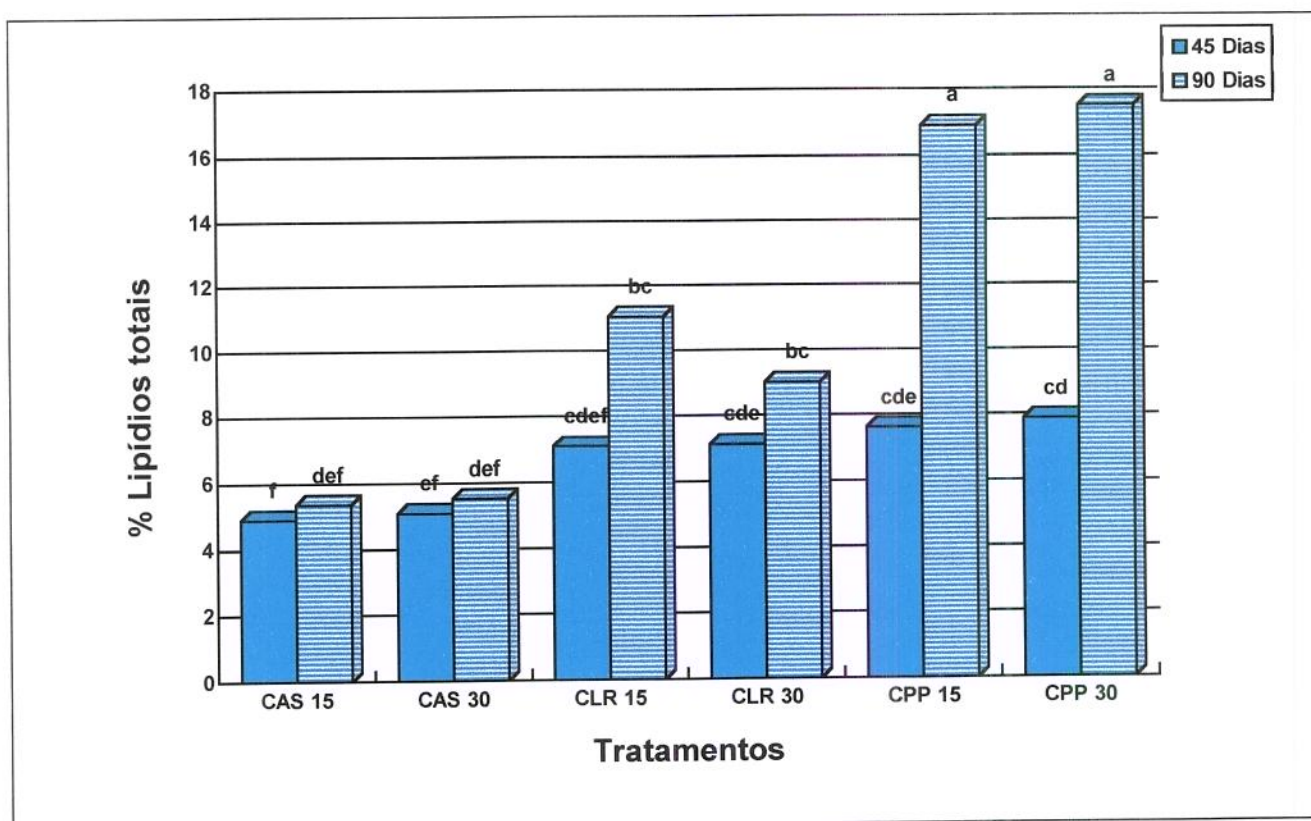
Medias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância.
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação.

LTF₄₅: Percentagem de lipídios totais no fígado de ratos Wistar com 45 dias de ensaio

PTF₄₅: Percentagem de proteínas totais no fígado de ratos Wistar com 45 dias de ensaio

LTF₉₀: Percentagem de lipídios totais no fígado de ratos Wistar aos 90 dias de ensaio

PTF₉₀: Percentagem de proteínas totais no fígado de ratos Wistar aos 90 dias de ensaio

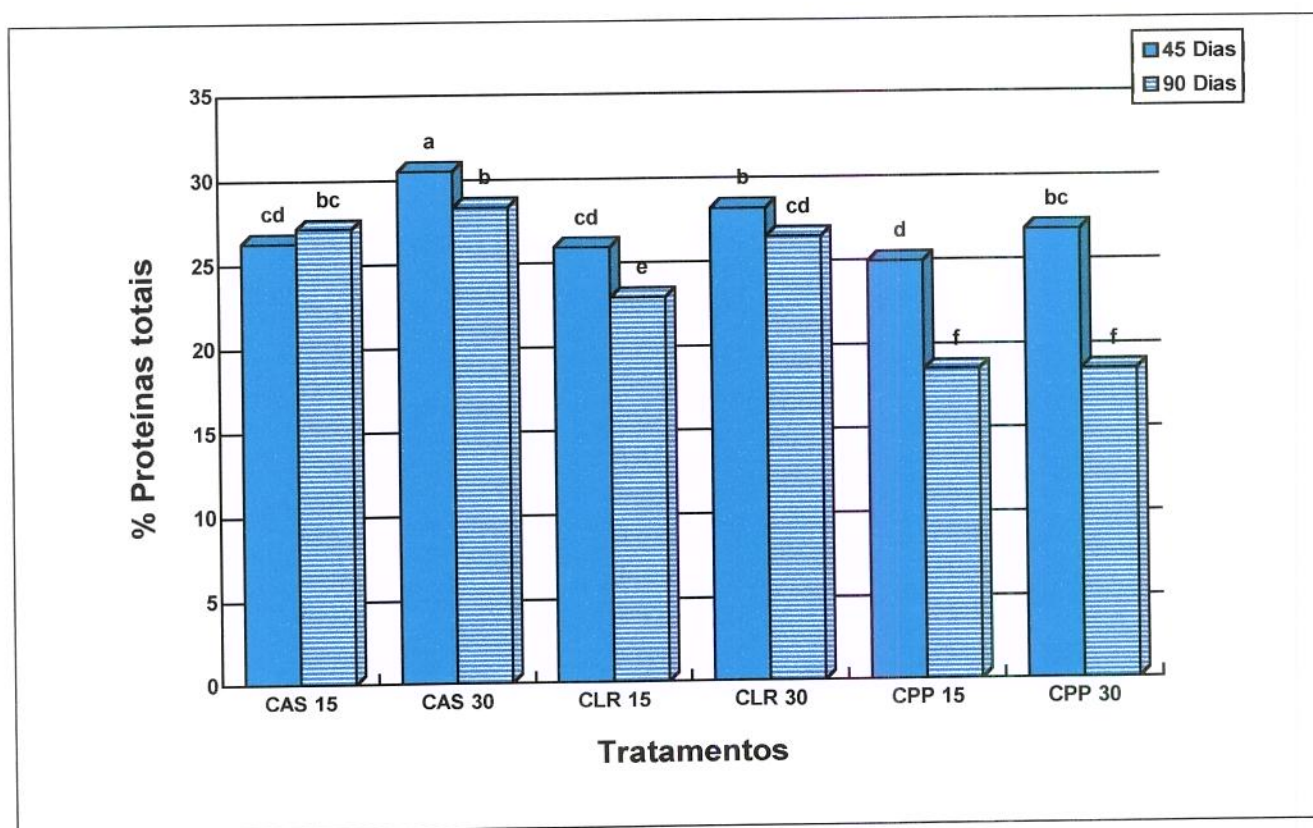


Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 14. Percentagem de lipídios totais em fígados de ratos Wistar alimentados com dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura de cervejaria e caseína durante 45 e 90 dias.

CPP15 e CPP30 mostraram diminuição dos níveis protéicos hepáticos de um período para outro de forma significativa ($p \leq 0,05$). A redução dos níveis protéicos do fígado dos grupos CPP15 e CPP30 foi consideravelmente maior do que os demais grupos, cujas médias aritméticas foram inferiores ao grupo Zero. Este resultado sugere diminuição da síntese protéica após o 45º dia em função do aumento dos lipídios hepáticos, porém esta diminuição parece estar mais acentuada nos grupos em dietas a base de concentrado protéico de levedura devido à ingestão inferior apresentada por eles.

Segundo WIDDOWSON (1989) em estados severos de desnutrição, ocorrem perdas de algumas proteínas hepáticas ocasionadas pela diminuição do conteúdo de RNA e diminuição do número de células .



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 15. Percentagem de proteínas totais em fígados de ratos Wistar alimentados com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura de cervejaria e caseína durante 45 e 90 dias.

Rins. Os dados de peso de rins (PRim) e percentagem de rins em relação ao peso (% Rim) para cada um dos tratamentos estão registrados na Tabela 20.

A formulação CAS30 alcançou as maiores médias para a variável PRim para ambos tempos de ensaio quando comparadas com as outras dietas. O menor valor correspondeu ao grupo Zero. O teor de proteína da dieta não afetou o peso do rim dos

tratamentos CLR15 e CLR30 nos dois tempos da experiência. Das proteínas testes os grupos CPP30 (45 dias) e CPP15 (90 dias) mostraram um desempenho inadequado para o PRim.

TABELA 20. Peso de rins (Prim) e % de rins em relação ao peso corporal (% Rim) de ratos submetidos ao consumo de dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína por períodos de 45 e 90 dias.

Tratamentos	PRim 45 (g)	%Rim 45	PRim 90 (g)	%Rim 90
ZERO	0,57 f ± 0,05	1,07 a ± 0,04	0,57 f ± 0,05	1,07 a ± 0,04
CAS15	1,63 c ± 0,14	0,61 d ± 0,05	2,09 b ± 0,12	0,58 d ± 0,03
CAS30	2,04 a ± 0,17	0,73 b ± 0,04	2,40 a ± 0,27	0,66 b ± 0,05
CLR15	1,74 b ± 0,13	0,68 c ± 0,05	1,83 c ± 0,14	0,59 d ± 0,03
CLR30	1,72 b ± 0,16	0,70 bc ± 0,03	1,89 c ± 0,26	0,62 c ± 0,06
CPP15	0,95 d ± 0,09	0,70 bc ± 0,04	0,74 e ± 0,05	0,53 e ± 0,03
CPP30	0,89 c ± 0,03	0,71 b ± 0,05	0,90 d ± 0,07	0,59 d ± 0,02
D.M.	0,04	0,04	0,10	0,66
C.V. (%)	1,94	2,89	3,91	1,59

Médias seguidas por letras distintas na vertical; diferem entre si ao nível de 5% de significância.
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação

PRim = Peso de rins com 45 dias.

%Rim45 = Percentagem de rins em relação ao peso corporal com 45 dias.

PRim90 = Peso de rins com 90 dias.

%Rim90 = Percentagem de rins em relação ao peso corporal com 90 dias.

Para a variável %Rim₄₅ não foi constatada diferença estatística para os tratamentos CAS30, CLR30, CPP15 e CPP30, às quais alcançaram médias aritméticas muito próximas. A maior média de % Rim foi do grupo Zero.

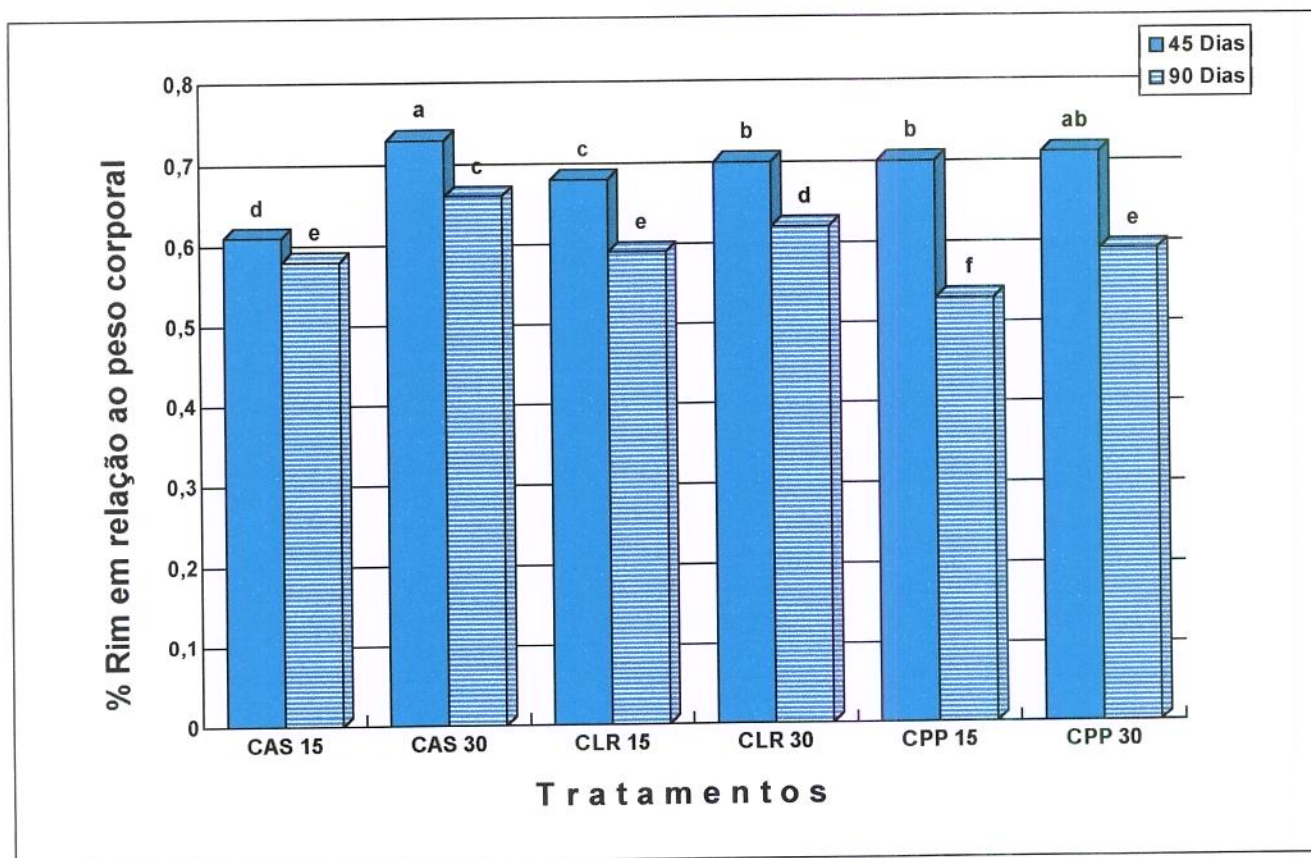
A %Rim₉₀ mostrou igualdade estatística entre os tratamentos CAS15, CLR15 e CPP30. No tempo experimental de 90 dias a qualidade protéica parece não ter influenciado a relação %Rim, embora o aumento do conteúdo protéico parece ter melhorado os resultados dessa relação. De acordo com KOPPLE (1989) o rim é um dos órgãos que menos alterações sofre com a qualidade protéica, mas em estados de consumo de dietas hipoprotéicas têm sido observadas diminuições da filtração glomerular.

A Figura 16 ilustra a percentagem de rins em relação ao peso corporal para cada tratamento. Verifica-se que a relação diminuiu significativamente para cada tratamento ($p \leq 0,05$) ao longo do tempo. WIDDOWSON (1989) afirma que os rins aumentam de peso lentamente após o nascimento e que a relação percentual deste órgão com o peso corporal é pequena e decresce com o aumento da idade.

A Tabela 21 mostra os resultados de lipídios totais de rins (LTR) e proteínas totais de rins (PTR) de ratos submetidos ao consumo de dietas contendo 15 e 30% de proteínas. Os resultados mostram que os teores de lipídios renais aos 45 dias (LTR₄₅) foram iguais estatisticamente nos vários tratamentos, embora tenham apresentado médias aritméticas diferentes.

A formulações CPP30, CPP15 e CLR30 apresentaram os maiores valores absolutos de LTR₉₀, sendo estatisticamente iguais. Níveis intermediários foram obtidos pelas preparações com caseína. O menor valor foi mostrado pelo grupo Zero. Este resultado sugere que os concentrados protéicos de levedura e as células de levedura rompidas a 30% de proteína promoveram um aumento dos LTR.

Na Figura 17, quando se estabelece a relação de lipídios totais entre os tratamentos, conclui-se que o tempo de exposição às dietas não foi um fator determinante no aumento dos lipídios renais, uma vez que os valores para cada tratamento em ambos períodos permaneceram praticamente inalterados.



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 16. Percentagem de rins em relação ao peso corporal (% Rim) de ratos alimentados durante 45 e 90 dias com dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína.

TABELA 21- Lipídios totais de rins (LTR) e proteínas totais de rins (PTR) de ratos submetidos a consumo de dietas contendo 15 e 30% de proteínas de levedura e caseína por períodos de 45 e 90 dias.

Tratamento	LTR ₄₅ (%)	PTR ₄₅ (%)	LTR ₉₀ (%)	PTR ₉₀ (%)
ZERO	4,45 b ± 0,37	19,06 a ± 0,03	4,45 d ± 0,37	19,06 b ± 0,03
CAS15	5,42 ab ± 0,07	17,36 d ± 0,08	5,51 bc ± 0,31	17,32 b ± 0,06
CAS30	5,48 ab ± 0,10	17,63 c ± 0,01	5,54 bc ± 0,09	17,46 f ± 0,06
CLR15	5,75 ab ± 0,46	16,86 e ± 0,06	5,37 c ± 0,42	19,14 a ± 0,07
CLR30	5,91 a ± 0,72	16,91 e ± 0,02	5,84 ab ± 0,25	17,94 e ± 0,04
CPP15	6,35 a ± 0,38	18,41 b ± 0,12	6,12 a ± 0,15	18,13 d ± 0,09
CPP30	6,06 a ± 0,07	18,64 b ± 0,03	6,17 a ± 0,50	18,63 c ± 0,08
D.M.	1,40	0,17	0,35	0,01
C.V.(%)	3,47	0,13	0,87	0,08

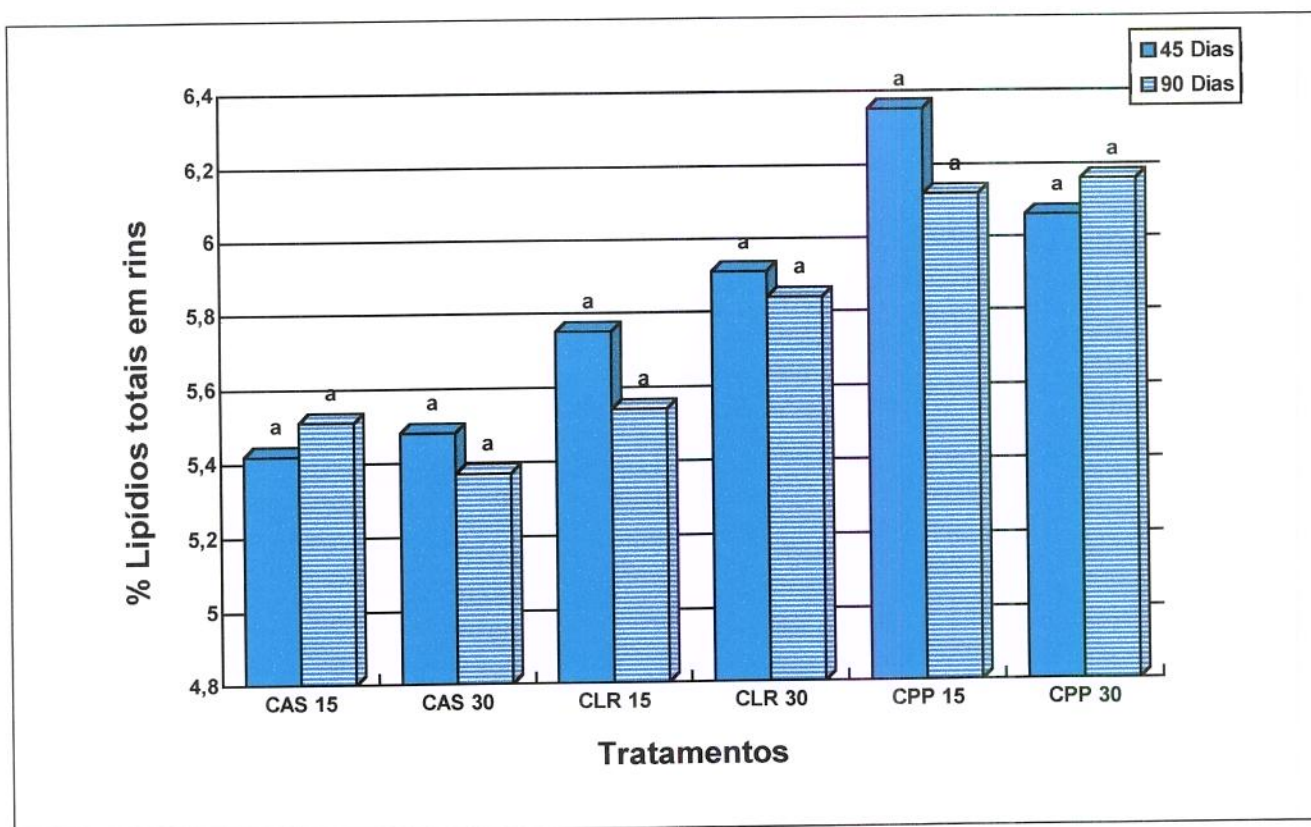
Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância.
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação

LTR₄₅: Percentagem de lipídios totais em rins com 45 dias.

PTR₄₅: Percentagem de proteínas totais em rins com 45 dias

LTR₉₀: Percentagem de lipídios totais em rins com 90 dias

PTR₉₀: Percentagem de proteínas totais em rins com 90 dias



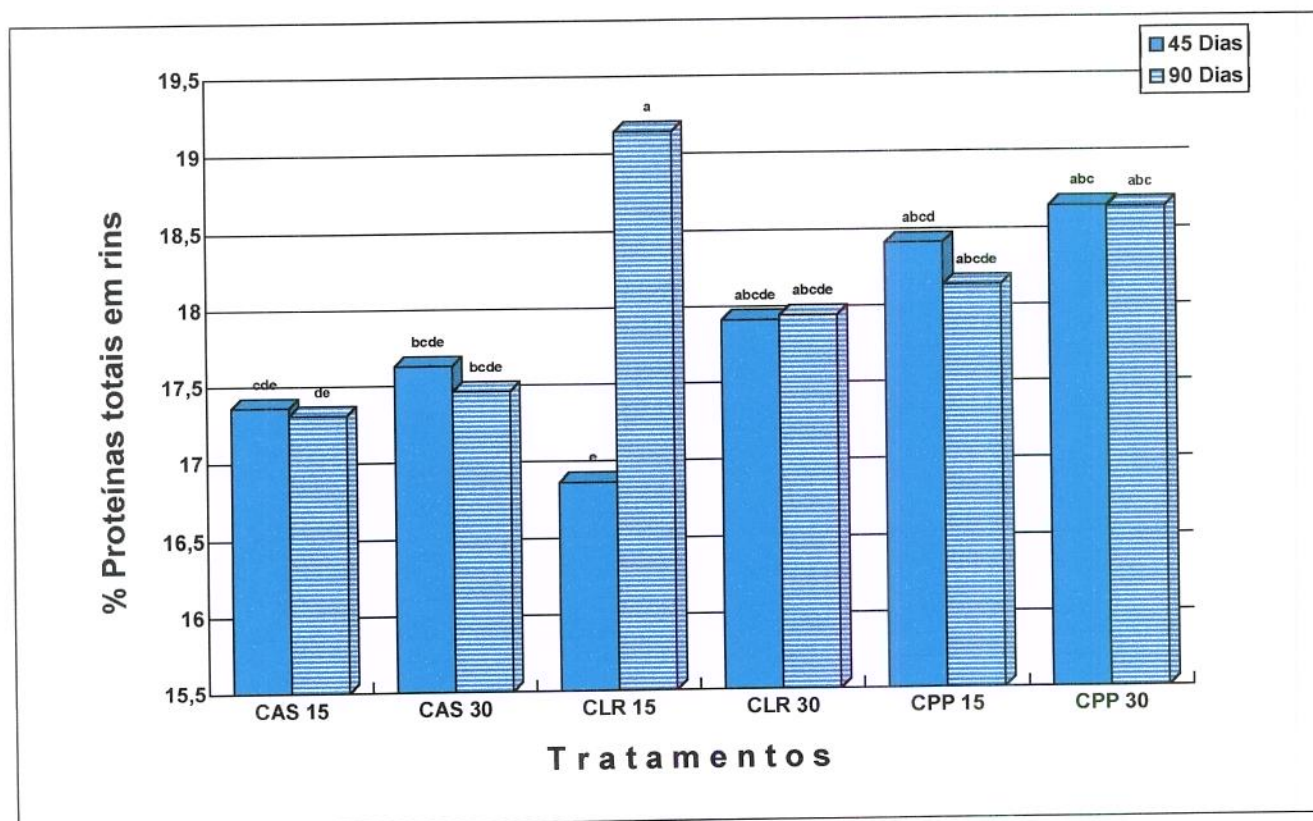
Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 17. Percentagem de lipídios totais de rins de ratos Wistar alimentados com dietas contendo níveis protéicos de 15 e 30% provenientes de células de levedura rompidas (CLR15 e CLR30), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP15 e CPP30) e caseína como padrão (CAS15 e CAS30) por períodos de 45 e 90 dias.

Todos os tratamentos experimentais apresentaram teores de proteínas totais de rins (PTR), inferior ao tratamento Zero para ambos tempos do ensaio.

Na Figura 18 pode-se observar que apenas o tratamento CLR15 apresentou um aumento significativo no teor protéico no decorrer do período experimental. Este aumento pode estar associado às altas taxas de excreção urinária de ácido úrico apresentados por este grupo aos noventa dias de ensaio. Uma possível retenção de

ácido úrico nos tecidos renais poderia levar à superestimar o teor protéico deste órgão, uma vez que o fator de conversão para a proteína nestas determinações foi 6,25. Resposta semelhante à encontrada neste ensaio foi relatada por PÓO & MILLAN (1990) que verificaram um incremento da concentração renal de ácido úrico em frangos alimentados com *Saccharomyces carlsbergensis*.



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 18. Percentagem de proteínas totais em rins de ratos Wistar alimentados com dietas contendo níveis de 15 e 30% de proteínas provenientes de levedura rompidas (CLR15 e CLR30), concentrado protéico de levedura obtido com perclorato (CPP15 e CPP30) e caseína (CAS15 e CAS30) durante 45 e 90 dias de ensaio.

Cérebro. O peso do cérebro e a % de cérebro em relação ao peso corporal (% Cer) de ratos que receberam dietas com 15 e 30% de proteínas de leveduras de cervejaria durante 45 e 90 dias são mostrados na Tabela 22.

O peso do cérebro aos 45 dias foi maior nos tratamentos CAS15 e CAS30. O menor peso do cérebro foi apresentado pelo grupo Zero. As médias aritméticas dos demais tratamentos obtiveram valores próximos aos da caseína, mesmo assim na análise estatística diferiram ao nível de 5% de significância do tratamento CAS15.

A variação estatística dos tratamentos para a variável PCer90, foi basicamente o mesmo apresentado aos 45 dias.

A relação %Cer45 foi superior para o grupo Zero. As médias obtidas pelas dietas CPP15 e CPP30 foram significativamente ($p \leq 0,05$) superiores aos tratamentos com caseína. As dietas CLR15 e CLR30 apresentaram médias intermediárias e estatisticamente diferentes entre si. Por outro lado, a relação %Cer90 para as formulações com células de levedura rompidas (CLR15 e CLR30) apresentaram médias iguais.

Observando a Figura 19 pode-se visualizar que houve uma pequena redução da relação %Cer de 45 dias para 90 dias. Esta diminuição da %Cer mesmo que pequena foi estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). A redução da %Cer não é provocada por mudanças no peso do cérebro do animal e sim pela capacidade que a dieta possui em incrementar o peso corporal do animal. Desta forma observa-se que as dietas que tiveram maior ganho de peso apresentaram uma relação %Cer inferior aos outros tratamentos. Segundo COZZOLINO (1982) o crescimento cerebral não é muito prejudicado pela dieta porque este órgão no rato se desenvolve até os 21 dias de vida.

Tabela 22. Peso de cérebro (Pcer) e % de cérebro em relação ao peso corporal (% Cer) de ratos que receberam dietas com 15 e 30% de proteína durante 45 e 90 dias.

Tratamento	PCER ₄₅ (g)	%CER ₄₅	PCER ₉₀ (g)	%CER ₉₀
ZERO	1,46 c ± 0,05	2,76 a ± 0,12	1,46 e ± 0,05	2,70 a ± 0,12
CAS15	1,84 a ± 0,06	0,69 d ± 0,03	1,89 a ± 0,08	0,53 d ± 0,04
CAS30	1,83 ab ± 0,07	0,65 e ± 0,03	1,92 a ± 0,06	0,53 d ± 0,04
CPR15	1,79 b ± 0,06	0,70 d ± 0,05	1,86 b ± 0,06	0,60 c ± 0,04
CLR30	1,80 b ± 0,08	0,74 c ± 0,05	1,84 b ± 0,08	0,60 c ± 0,03
CPP15	1,72 c ± 0,08	1,27 b ± 0,14	1,56 d ± 0,06	1,12 b ± 0,04
CPP30	1,62 d ± 0,07	1,29 b ± 0,09	1,69 c ± 0,05	1,10 b ± 0,07
D.M.	0,04	0,04	0,03	0,06
C.V. (%)	1,40	2,00	0,90	3,36

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem entre si ao nível de 5% de significância.
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação

PCER₄₅ = Peso do cérebro com 45 dias de ensaio.

%CER₄₅ = Percentagem de cérebro em relação ao peso corporal com 45 dias de ensaio.

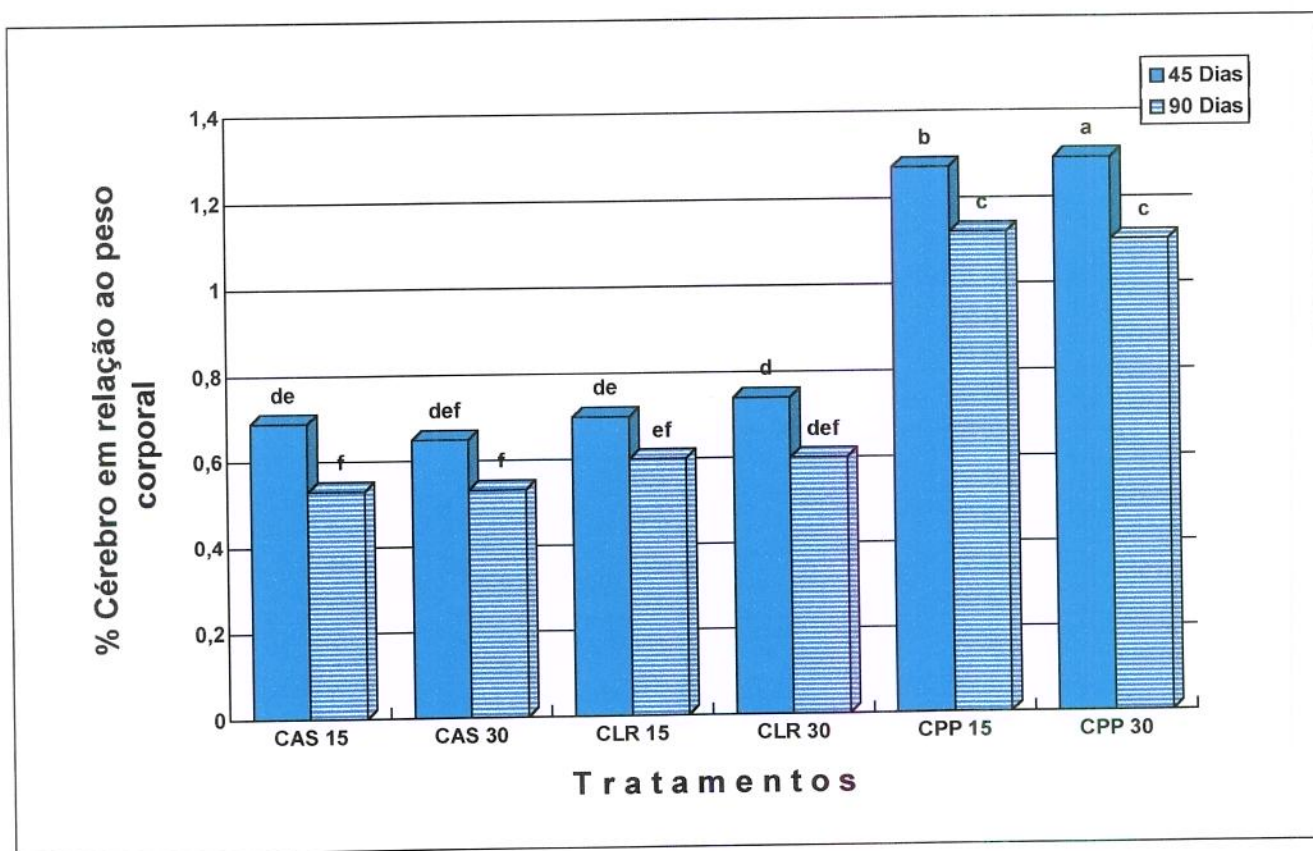
PCER₉₀ = Peso do cérebro com 90 dias de ensaio.

%CER₉₀ = Percentagem de cérebro em relação ao peso corporal com 90 dias de ensaio.

A Tabela 23 apresenta os dados de lipídios totais (LTC) e proteínas totais (PTC) de cérebros de ratos alimentados com dietas contendo proteínas de levedura.

Detectou-se que não houve diferença estatisticamente significativa nos teores de LTC₄₅ e LTC₉₀ para os tratamentos com caseína, células de levedura rompidas e concentrado protéico de levedura.

Visualizando na Figura 20, constata-se que o nível e a qualidade da proteína não influenciou a taxa de lipídios cerebrais de cada grupo no período de ensaio.



Médias seguidas por letras distintas diferem entre si ao nível de 5% de significância.

Figura 19. Percentagem de cérebro em relação ao peso corporal (% Cer.) de ratos submetidos a dietas contendo 15 e 30% de proteína de levedura e caseína, por períodos de 45 e 90 dias.

As médias de PTC₄₅ e PTC₉₀ para os 6 tratamentos foram superiores à média do grupo Zero. Os valores médios de proteínas totais apresentados pelos ratos de cada formulação foram muito próximos embora as preparações CAS15 e CLR15 tenham diferido estatisticamente ($p \leq 0,05$) das outras quatro dietas (iguais ao nível de 5% de probabilidade).

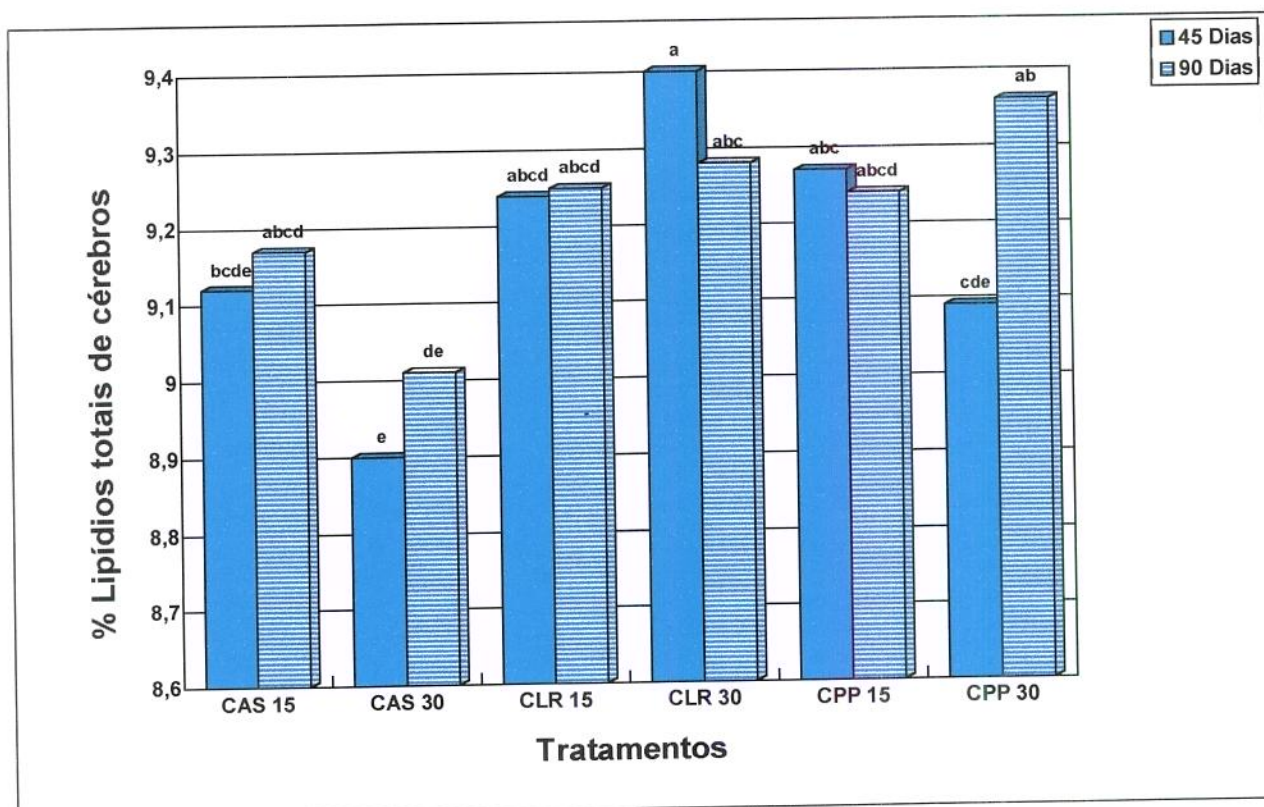
TABELA 23. Lipídios totais do cérebro (LTC) e proteínas totais do cérebro (PTC) de ratos que receberam dietas contendo 15 e 30% de proteínas provenientes de produtos à base de levedura de cervejaria e caseína por períodos de 45 e 90 dias.

Tratamento	LTC ₄₅ (%)	PTC ₄₅ (%)	LTC ₉₀ (%)	PTC ₉₀ (%)
ZERO	8,41 b ± 0,06	15,16 d ± 0,14	8,41 b ± 0,06	15,16 b ± 0,14
CAS15	9,12 a ± 0,17	16,94 a ± 0,04	9,17 a ± 0,11	16,62 a ± 0,01
CAS30	8,90 ab ± 0,43	16,52 b ± 0,01	9,01 a ± 0,35	16,48 a ± 0,02
CLR15	9,24 a ± 0,50	16,01 c ± 0,01	9,25 a ± 0,68	16,76 a ± 0,02
CLR30	9,40 a ± 0,27	16,57 b ± 0,02	9,29 a ± 0,39	16,63 a ± 0,25
CPP15	9,27 a ± 0,46	16,47 b ± 0,03	9,24 a ± 0,37	16,79 a ± 0,05
CPP30	9,09 a ± 0,29	16,65 b ± 0,13	9,37 a ± 0,35	16,66 a ± 0,02
D.M.	0,59	0,27	0,50	0,39
C.V. (%)	0,91	0,23	0,77	0,33

Médias seguidas por letras distintas na vertical diferem ao nível de 5% de significância.

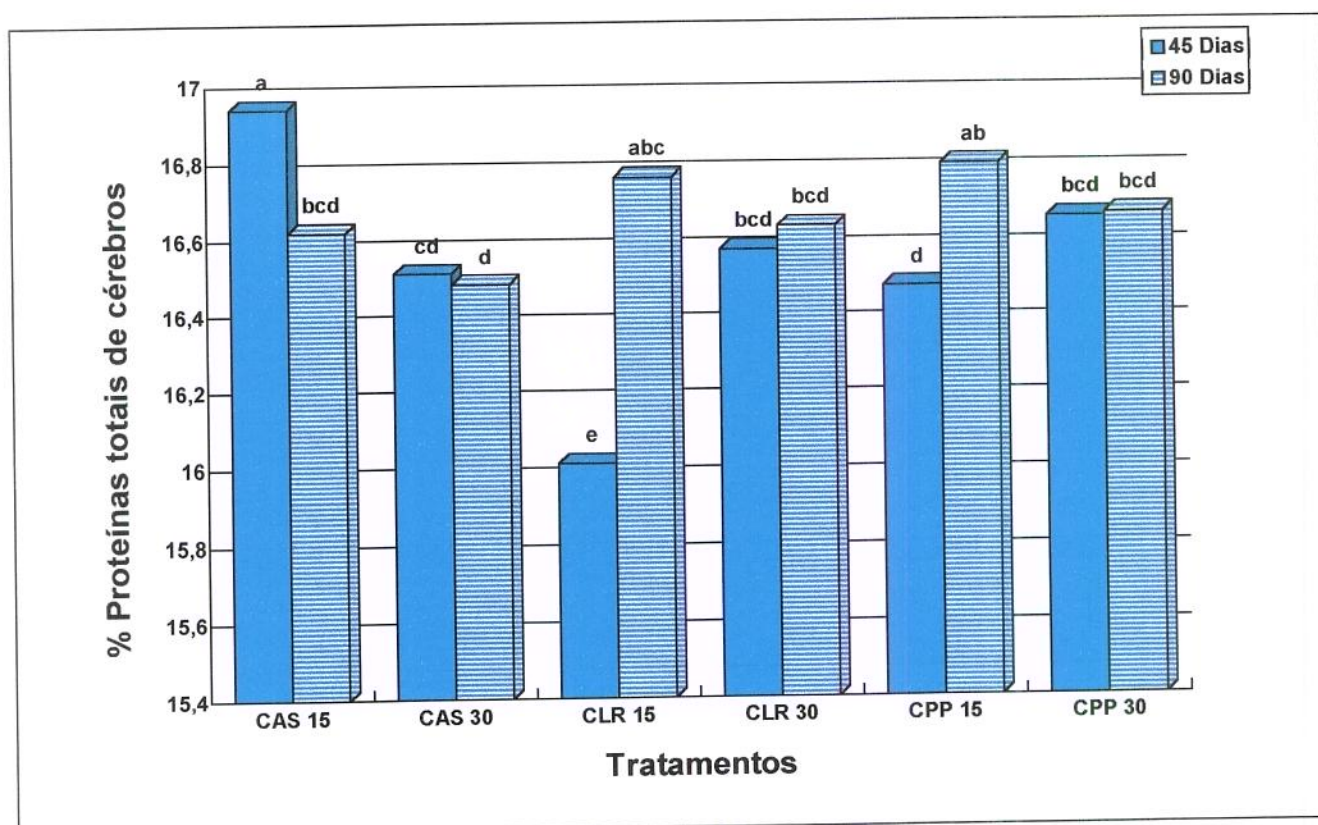
D.M.= desvio padrão da média; C.V.= coeficiente de variação
LTC₄₅ = Percentagem de lipídios totais em cérebros aos 45 dias.
PTC₄₅ = Percentagem de proteínas totais em cérebros aos 45 dias.
LTC₉₀ = Percentagem de lipídios totais em cérebros aos 90 dias.
PTC₉₀ = Percentagem de proteínas totais em cérebros aos 90 dias.

Na Figura 21 encontram-se relacionados comparativamente os resultados de proteínas totais no cérebro para o tratamento correspondente. Aqui verifica-se que os tratamentos CAS15, CLR15 e CPP15 apresentaram diferença estatística entre os dados coletados com 45 dias e a tomada de amostra com 90 dias. Foi observada igualdade estatística para as mesmas variáveis nos grupos alimentados com 30% de proteína.



Médias seguidas por letras distintas diferem ao nível de 5% de significância.

Figura 20. Percentagem de lipídios totais de cérebros de ratos Wistar que receberam formulações contendo proteína (15 e 30%) de células de levedura rompidas, concentrado protéico obtido com perclorato e caseína por períodos de 45 e 90 dias.



Médias seguidas por letras distintas diferem ao nível de 5% de significância.

Figura 21. Percentagem de proteínas totais de cérebros de ratos Wistar que receberam formulações contendo proteína de células de levedura rompidas, concentrado protéico de levedura obtido com perclorato e caseína (15 e 30%) por períodos de 45 e 90 dias.

4.7. Considerações finais

Segundo MASON (1994) a dieta para um indivíduo (humano) normal, compatível com a boa saúde, deve conter 15% de proteína, 6% de gorduras poliinsaturadas, 12% de monoinsaturadas, 10% de gordura saturada, 10% de açúcar e 57% de carboidratos complexos. Portanto, uma dieta adequada deve incluir os nutrientes essenciais em quantidades ótimas e com as calorias necessárias.

A proteína é um nutriente vital a qual deve ser consumida para prover os aminoácidos essenciais que o organismo necessita para sua manutenção, para reparação dos tecidos, para os processos vitais, para o seu crescimento e para seu desenvolvimento.

A maioria das proteínas são deficientes em um ou mais aminoácidos essenciais, motivo pelo qual devem ser consumidas na dieta várias fontes protéicas dietárias simultaneamente.

As proteínas são fornecidas por tecidos de animais e plantas, como tal refletem constituintes destes tecidos. Neste sentido o NRC (1989) e a FAO/WHO/UNU (1985) estabeleceram que 40 a 50% das proteínas da dieta devem ser de origem animal e de 50 a 60% podem ser fornecidas por plantas.

Considerando que a NCR (1989) estabeleceu que a mulher padrão deve consumir 2.200 Kcal/dia e que a dieta adequada terá 15% de proteína, então 330 Kcal/dia da dieta serão de origem protéica. Caso os produtos de levedura estudados neste trabalho atuem como única fonte protéica, deveriam ser consumidos 106g de concentrado protéico de levedura, obtido com perclorato, e 175g de células de levedura rompidas para suprir as recomendações quantitativas, porém não supre as necessidades qualitativas.

Sabe-se que a levedura em alimentação humana nunca será consumida como única fonte protéica e muito menos em níveis extremos (15 e 30%) como os utilizados neste estudo. Portanto é pouco provável que sejam observadas em humanos, as alterações orgânicas verificadas nos testes toxicológicos realizados neste trabalho, com ratos.

Atualmente várias indústrias brasileiras têm incorporado a levedura à lista de produtos comercializados. Indústrias farmacêuticas e de alimentos como a Gilton, Merck, Whitehall, Hebron, Eurofarma, Knorr, Ajinomoto e outras usam a levedura

como ingredientes suplementares de sopas, molhos, massas, e como coadjuvante terapêutico de processos infecciosos gastrointestinais e ginecológicos.

Revisão recente sobre o papel dos ácidos nucléicos e nucleotídeos em nutrição humana, CARVER & WALKER (1995) sugere que a complementação da dieta com alimentos ricos em nucleotídeos poderá melhorar o funcionamento do sistema imunológico, estimular o crescimento do tecido intestinal e melhorar o metabolismo lípidico e hepático. Os componentes dos ácidos nucléicos podem se tornar essenciais ao organismo quando seu suprimento endógeno é insuficiente e suas necessidades estão aumentadas por um crescimento rápido, em indivíduos com doenças relacionadas à imunossupressão ou em injúrias intestinais e/ou hepáticas

Neste sentido, os resultados desta pesquisa sugerem a levedura como uma boa fonte protéica alternativa que poderá suplementar alimentos para uso humano e animal quando utilizada de forma racional e criteriosa, além da necessidade de se incrementar as pesquisas com derivados de levedura, particularmente na área de bioquímica nutricional visando elucidar o mecanismo de ação de seus componentes e a sua importância como alimento fisiologicamente funcional.

5. CONCLUSÕES

1. O método de ruptura mecânica (Dynamill) é eficiente na ruptura da parede celular de levedura, permitindo a extração de 97% da proteína sem afetar as suas propriedades nutritivas e funcionais.
2. As proteínas da biomassa de *Saccharomyces sp.* possuem um perfil aminoacídico que atende os requerimentos do padrão da FAO/WHO/UNU (1985).
3. O perclorato de sódio revelou-se um ótimo reagente para a remoção de ácidos nucléicos, embora este tratamento químico tenha ocasionado a diminuição do teor de lisina disponível do concentrado, resultando em diminuição do valor protéico para o crescimento.
4. O ensaio biológico com ratos Wistar confirmou que os produtos de levedura possuem um bom valor protéico e que o VBa e NPUa encontrados nesta pesquisa, foram superiores aos valores compilados na literatura consultada. Os valores de PER, VBa e NPUa das formulações com levedura equivaleram a 65%, 94% e 88%, respectivamente, das médias aritméticas da caseína para estes índices.
5. O ensaio de toxicidade subcrônica (90 dias) com ratos mostrou que os animais alimentados com dietas contendo 15 e 30% de concentrado protéico de levedura obtido com perclorato, cresceram menos e apresentaram um baixo consumo de dieta, comparado com os grupos que receberam células de levedura rompidas e caseína.
6. As preparações com células de levedura rompida (15 e 30%) provocaram diminuição dos níveis sangüíneos de aminotransferases. Por outro lado, foi confirmado um aumento acima dos limites de referência normal destas enzimas na dieta contendo concentrado protéico de levedura. Os demais parâmetros séricos e urinários não mostraram alterações que indiquem a presença de patologias renais.
7. A composição de lipídios e proteínas totais em órgãos, acusou alterações no fígado de todos os grupos tratados com dietas a base de levedura. As modificações lipídicas encontradas neste órgão são características de esteatose hepática. Os rins e o cérebro

não apresentaram mudanças consideráveis que confirmem possíveis lesões destes órgãos.

8. Os produtos derivados da levedura não devem ser utilizados como única fonte protéica na dieta; associados a estes devem ser consumidas outras fontes protéicas, com a finalidade de suplementar as possíveis deficiências aminoacídicas para evitar efeitos fisiológicos indesejáveis dos mesmos com o objetivo de torná-los alimentos compatíveis com a boa alimentação.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABU-RAWAIDA, A.S.; BANAT, I.M. & HAMDAN, I.Y. Reduction of nucleic acid content in cell biomass of methanol utilizing mixed culture by heat treatment. **Biotechnology Letters**, Kew, v.10, n.8, p 527-602, ago., 1988.
- AKESON, W.R. & STAHPMAN, M.A. A pepsin pancreatin digest index of protein quality evaluation. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.83, n.1, p.257-261, feb. , 1964.
- ALAIS, C. & LINDEN, G. **Food biochemistry**; Translator Morton I. e Whitehead, A. 1st. ed. London: Ellis Horwoow Limited, 1991. 222p.
- ALVAREZ LEITE, J.I. Cromo em suporte nutricional: aspectos básicos e aplicativos. **Revista da Sociedade Brasileira de Nutrição Parenteral**, Porto Alegre, v.10, n.3, p.15-19, ago/dez, 1987.
- ANCHOR, I.M.; RICHARDSON, T. & DRAPER, N.R. Effect of treating *Candida utilis* with acid or alkali, to remove nucleic acids on quality of the protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.29, n.1 , p.27-33, feb., 1981.
- ANDERSON, G.H. Metabolic regulation of food intake. In: SHILS, M.E. & YOUNG, V.R. **Modern nutrition in health and disease**. 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p,557-583. Chap. 30.
- ANDERSON, J.W. & GUSTAFSON, N.J. Dietary fiber in disease prevention and treatment. **Comprehensive Therapy**, Ayer, v.13, n.1, p.43-53, n.d, 1987.
- ANGLEMIER, A.F. & MONTGOMERY, M.W. Aminoácidos, péptidos y proteínas. In: FENEMA, O.R. **Introducción a la ciencia de los alimentos**. Barcelona: Reverté, 1989. p.239-330. Cap.5.
- AOAC (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis of the Association of Official Analitical Chemists**. 12nd ed. Washington, D.C., 1975.

- ARRIOLA, M.C.; ZEPEDA, M.; ROLZ, C. A proten concentrate from distillery yeast and its application to supplement corn tortillas. **Archivos Latinoamericano de Nutrición**, Caracas, v.39, n.4, p.565-575, Dic, 1989.
- ASP, N.G.; JOHANSSON, C.G.; HALLMER, H. & SILJESTRÖM, M. Rapid enzymatic assay of insoluble and soluble dietary fiber. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.476-482, jun., 1983.
- BAKER, D.H.; LINDSAY, J.R.; & WEISBROTH, S.H. **The laboratory rat**. New York: Academic Press, 1979. v.I. 228p.
- BARNETT, J.A. The taxonomy of the genus *Saccharomyces meyer ex rees*: a short review for non-taxonomists. **Yeast**, New York, v.8, n.1, p.1-23, jan, 1992.
- BELDA, M.C.R. **Influência da qualidade da proteína e da quantidade de ração ingerida nos níveis hepáticos de lipase e transaminases glutâmico pirúvica e glutâmico-oxaloacética em ratos**. São Paulo, 1977. Dissertação (Mestre em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- BENASSI, V.T.; CAMARGO, CR.O. & CIACCO, C.F. Caracterização química e redução do conteúdo de ácidos nucléicos das células de levedura (*Saccharomyces spp.*) provenientes da produção de álcool de cana. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.10, n.2, p.249-260, jul./dez., 1990.
- BENDER, F.E.; DOUGLAS, L.W. & KRAMER, A. **Statistical methods for food and agriculture**. Westport : Avi Publishing Company, 1982. p.91-94.
- BLIGH, E.G.; DYER, W.J. A rapid method of total lipid extration and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, Ottawa, v.37, n.7, p.911-917, 1959.
- BOOKWALTER, G.N.; KIRLEIS, A.W. & MERTZ, E.T. In vitro digestibility of protein milled sorghum and other processed cereals with and without soy-fortification. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.6, p.1577-1579, dec., 1987.

- BRADLEY, G.L. & SAVAGE, T.F. The effect of autoclaving a yeast culture of *Saccharomyces cerevisiae* on Turkey, poult performance and the retention of gross energy, and selected minerals. **Animal Feed Science and Technology**, Elsevier, v.55, n.1-2, p.1-7, sept, 1995.
- BRESSANI, R. The use of yeast in human foods. In MATELES, R.I. & TANNENBAUM, S.R. **Single cell protein**. Massachussets: MIT Press, 1968. 480p.
- BRIGGS, G.B. & OEHLME, F.W. Toxicology. In: BAKER, H.J.; LINDSAY, J.R. & WEISBROTH, S.H. **The laboratory rat**. Orlando : Academic Press Inc., 1980. v.II, P.103-118.
- CARRASCO de MENDOZA, M.S.; BASÍLICO, J.C.; UMANSKY, G. & SCARINCI, H.E. Estudio del valor biológico de la proteína unicelular de *Kluyveromyces marxianus* var. *lactis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.41, n.1, p.72-79, mar., 1991.
- CARVER, J.D. & WALKER, W.A. The roles of nucleotides in human nutrition. **Nutritional Biochemistry**, Elsevier, v.6, p.58-72, n.d, 1995.
- CHEFTEL, J.C.; CUQ, J.L. & LORIENT, D. **Proteínas alimentarias: bioquímica, propriedades funcionais, valor nutritivo, modificações químicas**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A., 1989. 346p.
- CHIAO, J.S. & PETERSON, W.H. Yeasts: methionine and cystine contents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.1, n.16, p.1005-1008, oct., 1953.
- CHURCH, D.C. & POND, W.G. **Basic nutrition and feeding**. 3th ed. New York: John Wiley & Sons, 1988. 425p.
- COZZOLINO, S.M.F. **Valor nutricional da biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*: estudo em gerações sucessivas de ratos**. São Paulo, 1982. 147p. Tese (doutor em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- CUMMINGS, J.H. Nutritional implications of dietary fiber. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Philadelphia, v.31, n.10, p.21-29, oct., 1978.

- CURRIE, J.A.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. Release of protein from baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by disruption in an industrial agitator mill. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.14, n.5, p. 725-736, sept., 1972.
- DABBAH, R. Unconventional source of nutrition may become necessary alternative solutions ... if there is not enough land to feed the world's population: protein from microorganisms. **Food Technology**, Chicago, v.24, n.6, p.35-42, jun, 1970.
- DAMODARAN, S. & KINSELLA, J. The use of chaotropic salts for separation of ribonucleic acids and proteins from yeast nucleoproteins. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.25, n.3, p.761-770, mar., 1983.
- DAMODARAN, S. & KINSELLA, J.E. Dissociation of yeast nucleoprotein complexes by chemical phosphorylation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.32, n.5, p.1030-1032, oct., 1984.
- DELANEY, R.A.M.; KENNEDY, R. & WALLEY, B.D. Composition of *Saccharomyces fragilis* biomass grown on lactose permeate. **Journal of the Science of Food Agriculture**, London, v.26, n.8, p.1177-1186, aug., 1975.
- DESHPANDE, S.S. & NIELSEN, S.S. In vitro digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of heat-stable protease inhibitors. **Journal of Food Science**, Chicago, v.52, n.5, p.1330-1334, may, 1987.
- DESMONTS, R. Utilização do levedo na alimentação da criança. **Pediatria Prática**, São Paulo, v.39, p.7-18, n.d, 1968.
- DILLON, J.C. Les méthodes d'évaluation de la valeur nutritive des protéines en alimentation humain: évolution des concepts et des méthodes. **Cahier de Nutrition et Diététique**, Paris, v.26, n.3, p.224-229, juin, 1992.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, Washington, v.28, n.3, p.350-356, mar., 1958.
- DWIVEDI, B.K. & GIBSON, D.L. Processing of spent brewer's yeast for food use. **Canadian Institute of Food Technology Journal**, Ottawa, v.3, n.3, p.110-112, jul., 1970.

- DZIEZAK, J.D. Yeasts and yeast derivatives: applications. **Food technology**, Chicago, v.41, n.2, p.122-125, feb., 1987.
- EDEBO, L & MAGNUSSON, K. E. Desintegration of cells and protein recovery. **Pure Applied Chemistry**, Washington, v.36, n.3, p.325-338, mar., 1973.
- ELLIS, P.R. & APLING, E.C. Guar bread: acceptability and efficacy combined: studies on blood glucose, serum insulin and satiety in normal subjects. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.46, n.2, p.267-276, feb., 1981.
- EVANGELISTA, J. **Tecnología de alimentos**. 2ª ed. Rio de Janeiro : Livraria Atheneu Editora, 1989. 652p.
- FAO/ WHO/ UNU. **Energy and protein requeriments**. Report of the Joint FAO/ WHO/ UNU Expert Consultation Technical Report. Series no 724, FAO/ WHO and the United Nations University, Geneva, 1985.
- FENEMA, O.R. **Introducción a la ciencia de los alimentos**. 1ra. ed. Barcelona: Editora Reverté, 1989. 445p
- FERREIRA-PINTO, G & ARAUJO-NETO, J.S. Limits for single cell protein utilization in human feeding. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.22, n.1, p.49-63, mar., 1972.
- FERRER, J.I.; PRIDA, C.M.B. & HERNÁNDEZ, F.R. Complementación de harina de maíz con una mutante de *Candida utilis* rica en lisina. **Revista de Ciencias Biológicas**, Habana, v.16, n.2, p.199-202, abr., 1985.
- FOLLOW, M.; HETHERINGTON, P.J.; DUNNILL, P. & LILLY, M.D. Release of enzymes from baker's yeast by disruption in an industrial homogeneizer. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.13, n.4, p.549-560, apr., 1971.
- GÁLVEZ, A. ; RAMÍREZ, M.J. & GARCÍA-GARIBAY, M. Chemical composition of a mixture of single-cell protein obtained from *Kluyveromyces fragilis* and whey proteins. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.40 , n.2 , p. 252-262, jun., 1990.

- GAVER, D. & HUYGHEBAERT, A. Optimization of yeast cell disruption with a newly designed bead mill. **Enzyme Microbiology and Technology**, Guilford, v.13, n.8, p.665-671, aug., 1990
- GIERHART, D.L. & POTTER, N.N. Effects of RNA removal methods on composition and functional properties of *Candida utilis*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.43, n.6, p.1705-1713, ago., 1978.
- GÓMEZ, R.; SUÁREZ, M. & GARCÍA, L. Producción de proteína unicelular con otros sustratos de la industria azucarera. **Revista ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar**, Habana, v.20, n.2, p.1-5, mayo/agost. 1986.
- GONZÁLEZ, N. & LÓPEZ, M.S. Ácidos nucleicos de la levadura *Kluyveromyces fragilis*. **Revista ICIDCA Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar**, Habana, v.20, n.1, p.15-19, Ene./Abr. 1986.
- GUYTON, A.C. **Tratado de fisiología médica**; Trad. de Alcyr Kraemer e outros. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Interamericana Ltda, 1984. 926p.
- HALÁSZ, A. & LÁSZTITY, R. **Use of yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1991. 312p.
- HARKNESS, J.E. **Biología e clínica de coelhos e roedores**; Trad. de LOPEZ de SOUZA, N. e outros. 1. ed. São Paulo: Livraria Roca, 1993. p.48-55.
- HAUG, A. & HOSTMARK, A.T. Lipoprotein lipases and tissue lipids in rat fed fish oil or coconut oil. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.117, n.6, p.1011-1017, jun., 1978.
- HEBERT, D.; PHIPPS, P.J. & STRANGER, R.E. Chemical analysis of microbial cell. In: NORIS, J.R. & RIBBORS, P.W. **Methods of microbiology**. London: Academic Press, 1971. v.5B. 695p.
- HEDENSKOG, G.; MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v.15, n.1, p.129-142, jan., 1973.

- HENLEY, E.C. & KUSTER, J.M. Protein quality evaluation by protein digestibility - corrected amino acid scoring. **Food Technology**, Chicago, v.48, n.4, p.74-77, apr., 1994.
- HERNÁNDEZ, F.; URBAY, C.M. & ILLNAIT, J. Estudio nutricional de la levadura *Saccharomyces carlsbergensis* en ratas. **Revista de Ciencias Biológicas**, Habana, v.16, n.2, p.203-205, abr., 1985.
- HERNÁNDEZ-ROSALES, F.; SANABRIA, J.G.; URBAY, C.M. & ILLNAIT, F. Efectonefrotóxico en ratones alimentados con *Candida utilis*. **Revista de Ciencias Biológicas**, Habana, v.15, n.2, p.193-198, abr., 1985.
- HESEL, G.; DE-SANTI-NETO, D. & COLLARES, E.F. Correlation between the severity of acute hepatic necrosis induced by acetaminophen and serum aminotransferase levels in fasted and sucrose fed rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v.29, n.6, p.793-796, jun., 1996.
- HUANG, Y.T.; KINSELLA, J.E. Phosphorilation of yeast protein: reduction of ribonucleic acid and isolation of yeast protein concentrate. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v.18, p.1690-1698, 1986.
- HUMMEL, W. & KULA, M.R. Simple method for small - scale disruption of bacteria and yeast. **Journal of Microbiological Methods**, Elsevier, v.9, n. 1, p.201-209, 1989.
- ICIDCA. **Manual de los derivados de la caña de azúcar**. Habana: GEPLACEA-PNUD, 1988. 252p.
- JENKINS, Y.M. & MITCHELL, G.V. Nutritional assesment of twelve protein foods ingredients. **Nutrition Research**, Washington, v.9, n.1, p.83-92, jan., 1989.
- KAKADE, M.L. & LIENER, I.E. Determination of available lysine in proteins. **Analytical Biochemistry**, New York, v.27, n.2, p.273-280, feb., 1969.
- KIHLBERG, R. The microbe as a source of food. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v.26, n.4, p. 426-465, apr., 1972.

- KINSELLA, J.K. Functional proteins from yeast nucleoprotein for food uses: methods for isolation. In: KNOOR, D. **Food biotechnology**. Neww York: Marcel Dekker, Inc. 1987. Chap. 14, p.363-391.
- KNOOR, D.; SHETTY, K.J.; HOOD, L.F. & KINSELLA, J.E. An enzymatic method for yeast autolysis. **Journal of Food Science**, Chicago, v.44, n.5, p.1362-1365, may, 1979.
- KOHN, D.F. & BARTHOLD, S.W. Biology and disease of rats. In: FOX, J.G.; COHEN, B.J. & LOEW, F.M. **Laboratory animal medicine**. Orlando: Academic Press, Inc., 1984. p.91-99. Chap.4.
- KOPPLE, J.D. Nutrition, diet and the kidney. In: SHILS, M.E. & YOUNG, V.R. **Modern nutrition in health and disease**. 7h ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p.1230-1268. Chap. 58.
- LEE, T.C. & LEWIS, M.J. Identifing nucleotidic materials released by fermenting brewer's yeast. **Journal of Food Science**, Chicago, v.33, n.1 , p.119-123, feb., 1968.
- LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**; Trad de W.R. Lodi e A.A. Simões. São Paulo: Savier Editora de Livros Médicos Ltda, 1984. 725p.
- LEVANDER, O.A. Selenium, chromium and manganese. In: SHILS, M.D. & VERNON, R.Y. **Modern nutrition in health and disease**. 7th. ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p.263-267.
- LEWIS, P.N. & LAWFORD. D. A novel method for reducing the RNA content of single cell protein isolates. **Biotechnology Letters**, Kew, v.4, n.7 , p.441-446, may, 1982.
- LILLEHOJ, E.P. & MALIK, V.S. **Protein purification**. 1st. ed. Heildelberg: A. Fiechter, 1989. p. 20-71.
- LIMA, A.O.; SOARES, J.B.; GRECO, J.B.; GALIZZAI, J. & CANÇADO, J.R. **Métodos de laboratório aplicados à clínica: técnica e interpretações**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1985. 699p.

- LINBLUM, M. Properties of intracellular ribonuclease utilized for RNA reduction in disintegrated cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.19, n.2, P.199-210, feb., 1977.
- LITCHFIELD, J.H. Single cell proteins. **Food Technology**, Chicago, v.31, n.5, p.175-179, may., 1977.
- LOWE, C.M.; KOTULA, K.T. & BRIGGS, G.M. The protein quality (PER and NPR) of several powdered soybean protein food products in the rat. **Nutrition Report International**, Los Altos, v.32, n.3, p.547-557, mar., 1985.
- LYUTSKANOV, N. ; KOLEVA, L.; STATEVA, L.; VENKOV, P. & HADJIOLOV, A. Protein extracts for nutritional purposes from fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae* : reduction of nucleic acid content and applicability of the protein extracts. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.30, n.7, p.523-528, jul., 1990.
- MARIATH, J.G.R. **Comportamento biológico de proteína isolada do resíduo de cerveja: estudo de alguns parâmetros bioquímicos e nutricionais**. São Paulo, 1981. 166p. Tese (Doutor em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.
- MASON, P. **Nutrition and dietary advice in the pharmacy**. 1st. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1994. 296p.
- McNAIRNEY, J. Modification of a novel protein product. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, Cleveland, v.34B, p.206-214, n.d., 1984.
- MEHENDALE, H.M. Hepatotoxicity. In: HALEY, T.J. & BERNDT, W.O. **Handbook of toxicology**. New York: Hemisphere Publishing Corporation, 1987. P.75-111. Chap.4.
- MITCHELL, H.H. A method of determining the biological value of protein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.58, n.3, p.873-903, jan, 1924.
- MITRUKA, M.B. & RAWNSLEY, H.M. **Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals and normal humans**. 2nd ed. New York : Masson Publishing, Inc., 1981. 314p.

- MOGREN, H.; LINDBLOM, M. & HEDENSKOG, G. Mechanical disintegration of microorganisms in an industrial homogeneizer. **Biotechnology and Bioengineering**, New York, v.16, n.2, p.261-274, feb., 1974.
- MOTTA, V.T. **Bioquímica clínica: métodos e interpretações**. 2ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau, 1989. 355p.
- MOURA, E.C.V. Fontes protéicas não convencionais: perspectivas do seu emprego na alimentação. In: NOBREGA, F.J. **Desnutrição intrauterina e pós-natal**. 2ª ed. São Paulo: Panamed Editorial, 1986. p.43-63.
- MUNRO, N.H. & CRIM, C. The proteins and aminoacids. In: SHILS, M.E. & YOUNG, V.R. **Modern nutrition in health and disease**. 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p.1-37. Chap. 1.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Recommended dietary allowances**. 10.ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1989. 284p.
- NAYAK, N.C. Nutrition liver diseases. In: ISHAK, K.G. & SHARP, H.L. **Metabolic errors and liver diseases**. Livingstone: MacSween, 1987. Chap.4.
- NUÑEZ, M.C.; AYUDARTE, M.V.; MORALES, D.; SUAREZ, M.D. & GIL, A. Effect of dietary nucleotides on intestinal repair in rats with experimental chronic diarrhea. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, Baltimore, v.14, n.6, p.598-604, 1990.
- OBATA, T.; IWATA, H. & NAMBA, Y. Proteolytic enzyme from *Oerskovia* sp. CK lysing viable yeast cells. **Agricultural and Biological Chemistry**, Tokio, v.41, n.12, p.2313-2498, dec. , 1977.
- OHTA, S.; MAUL, S.; SINSKEY, A.J. & TANNENBAUM, S.R. Characterization of a heat-shock process for reduction of nucleic acid content of *Candida utilis*. **Applied Microbiology**, Washington, v.22, n.3, p.415-421, mar., 1971.
- OMSTEDT, P.T; DECKEN, V.D.A; HEDENSKOG, G. & MOGREN, H. Nutritive value of processed *Saccharomyces cerevisiae*, *Scenedesmus obliquus* and *Spirulina plantensis* as a measured by protein sintesis in vitro in rat skeletal muscle. **Journal of the Science and Food Agriculture**, London, v.24, n.8 ,p.1103-1213, aug., 1973.

PAG. (PROTEIN ADVISORY GROUP) PAG ad hoc working group on clinical evaluation and acceptable nucleic acid levels of SCP for human consumption. Protein-Calorie Advisory Group of the United Nations System. **Protein-Calorie Advisory Group Bulletin**, New York, v.3, p.17-23, 1975.

PAG/UNU GUIDELINE Nº 15. Nutritional and safety aspects of protein sources for animal feeding. **Food and Nutrition Bulletin**, New York, v.5, n.1, p.67-70, 1983.

PAG/UNU GUIDELINE Nº 6. Preclinical testing of novel sources of food. **Food and Nutrition Bulletin**, New York, v.5, n.1, p.60-63, 1983.

PELLET, P.L. & YOUNG, V.R. **Nutritional evaluation of proteins foods**. Report of a working group sponsored by The International Union of Nutritional Science and the United Nations University World Hunger Programs. Tokyo, The United Nations University, 1980. 153p.

PÓO, M.E. & MILLÁN, N. Efecto de la concentración dietaria de la levadura (*Saccharomyces carlsbergensis*) recuperada de la cerveza, en pollos machos Warren. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, v.40, n.1, p.95-106, mar., 1990.

RAVEL, R. **Clinical laboratory medicine: clinical application of laboratory data**. 6th ed. St Louis : Mosby - Year Book, Inc., 1995. 724p.

REED, G. & NAGODAWITHANA, T.W. **Yeast technology**. 2nd ed. New York : Van Nostrand Reinhold, 1991. 378p.

REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H. & FAHEY, G.C. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition Ad Hoc Writing Committee on the Reformulation of the AIN-76 Rodent Diet. **The Journal of Nutrition**, Bethesda, v.123, n.11, p.1939-1951, nov., 1993.

RIBEIRO, S.M.L.; CAMPOS, P. & TIRAPEGUI, J. O rato como animal de laboratório: histórico, dados biológicos e análise crítica de seu uso. **Revista de Farmácia Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v.31, n.1, p.21-28, jan/jun., 1995.

- RINGLER, D.H. & DABICH, L. Hematology and clinical biochemistry. In BAKER, H.J.; LINDSAY, J.R. & WEISBROTH, S.H. **The laboratory rat**. New York: Academic Press, 1979. v.I, p.105-121.
- ROBBINS, E.A. & SEELEY, R.D. Cholesterol lowering fat effect of dietary yeast fractions. **Journal of Food Science**, Chicago, v.42, n.3, p.694-698, mar., 1977.
- ROBERTFROID, M. Dietary fiber, inulin and oligofructose: a review comparing their physiological effects. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.33, n.2, p.103-148, n.d., 1993.
- ROEHRIG, K.L. The physiological effects of dietary fiber: a review. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v.2, n.1, p.1-18, n.d. 1988.
- ROGERS, A.D. Nutrition. In: BAKER, H.J.; LINDSAY, J.R. & WEISBROTH, S.H. **The laboratory rat**. New York : Academic Press, 1979. v.I, p.124-152.
- ROLZ, C. Características químicas y bioquímicas de la biomasa microbiana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, Caracas, 40(2): 147-193, jun, 1990.
- ROSALES, F.H. Yeast as protein source for human nutrition : a review. **Acta Microbiologica Hungarica**, s.l., v.31, n. 3, p. 159 - 172 , Budapest, 1984.
- ROSHOVA, Z.G.R.; DJUKIANDJIEV, S.V. & PAVLOVA, K.I. Fractionation and characterization of yeast proteins. **Die Nahrung**, Berlin, v.33., n.4, p.319-323, apr., 1989.
- ROTHENBUEHLER, E. ; AMADO, R. & SOLMS, J. Isolation and identification of amino acid derivatives from yeast. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.30, n.2, p.439-442, mar/abr, 1982.
- RUMSEY, G.L.; HUGHES, S.G., SMITH, R.R.; KINSELLA, J.E. & SHETTY, K.J. Digestibility and energy values of intact, disrupted and extract from brewer's dried yeast fed to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal feed Science and Technology**, Amsterdam, 33: 185-193, 1991.

- RUSSELL, I.; JONES, R.M. & STEWART, G.G. Yeast : the primary industrial microorganism. In: STEWART, G.G.; RUSSELL, I.; KLEIN, R.D. & HIEBSCH, R.R. **Biological research on industrial yeast**. Boca Raton: CRC Press, Inc., 1987. v.I, p.2-20.
- SAMMÁN, N. & FARIÁS, R.N. A 28.h method for estimating protein nutritional quality. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, n.1, p.52-56, jan., 1993.
- SAMMÁN, N.; MOLINA, O.E.; GÁLVEZ, N.I.P.; CALLIERI, D.A.S. & FARIÁS, R.N. Application of a 28-h method for monitoring nutritional protein quality changes during single-cell protein processing. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, n.1, p.57-60, jan., 1993.
- SARWAR, G.; PEACE, R.W. & BOTTING, H.G. Protein quality of food yeast metabolism of their purines by rats. **Nutrition Report International**, Los Altos, v.34 , n.5 , p.709-720, nov. , 1986.
- SCHACHTEL, A.P. Effects of preparative processes on the composition and functional properties of protein preparations from *Candida utilis*. **Journal of Food Science**, Chicago, v.46, n.2, p.377-382, apr., 1981.
- SCHWENKE, K.D.; SEMIONOV, A.; RAAB, B.; SERGEJEV, V.A. & BESRUKOV, A. Comparative studies on protein isolates from different yeast prepared by isoelectric precipitation and ultrafiltration. **Die Nahrung**, Berlin, v.24, n.9, p.883-891, sept. 1980.
- SCOPES, R.K. **Protein purification: principles and practice**. 4th ed. New York : Springer - Verlag, 1986. 282p. Springer Advanced Texts in Chemistry Series.
- SCRIMSHAW, N.S. **Review of PAG guidelines in single-cell protein: applications**. Algier, oct., 1983. 18p.
- SCRIMSHAW, N.S. Single-cell protein for human consumption: an overview. In: TANNENBAUM, S.R. & WANG, D.I.C. **Single-cell protein II**. Massachussets : MIT Press, 1975. v.II, p.24-45.
- SEELEY, R.D. fractionation and utilization of bakers yeast. **MBAA Technical Quaterly**, St. Louis, v.14, n.1, p.35-39, jan./feb./march., 1977.

- SGARBIERI, V.C. **Alimentação e nutrição: fator de saúde e desenvolvimento**. 1ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP; São Paulo: Almed, 1987. 387p.
- SHEFFNER, A.L. In vitro protein evaluation. In: ALBANESE, A.A. **Newer methods of nutritional biochemistry**. New York : Academic Press Inc., 1967. v.3, p. 125-195.
- SHETTY, K.J.; KINSELLA, J.E. Isolation of yeast protein with reduced nucleic acid level using reversible acylating reagents: some properties of the isolated protein. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.30, n.6, p.1166-1971, 1982.
- SILVA, D.J. **Análises de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Imprensa Universitária U.F.V, 1981. 166p.
- SNYDER, H.E. Microbial source of protein. **Advances in Food Research**, New York, v.18, p.85-138, 1970.
- SOBOTKA, T.J. Revisions to the FDA's redbook guidelines for toxicity testing: neurotoxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.32, n.2, p.165-171, n.d, 1992.
- SPACKMAN, D.H.; SETTEIN, W.H. & MOORE, S. **Automatic recording apparatus for use in the chromatography of aminoacids**. Beckman Instruments, Palo Alto, 1977.
- SPACKMAN, D.H.; SETTEIN, W.H. & MOORE, S. Automatic recording apparatus for use in chromatography of aminoacids. **Analytical Chemistry**, Washington, v.30, n.7, p.1190-1197, aug., 1958.
- STATEVA, L.I.; VENKOV, P.V.; HADJIOLAV, A.A.; KOLEVA, L.A. & LYUDSKAHOV, N.L. Polyploid fragile strains of *Saccharomyces cerevisiae* - novel source of proteins for nutritional purposes. **Yeast**, New York, v.4, n.3, p.219-225, sept, 1988.
- TAGLE, M.A. **Nutrição**; Trad. I.S. Martins. São Paulo: Livraria Editora Artes Médicas Ltda, 1981.234p.

- TANNENBAUM, S.R. Single cell protein. In: WHITAKER, J.R. & TANNENBAUM, S.R. **Food proteins**. Westport : Avi Publishing Company Inc. 1977.315p
- TREVELYAN, W.E. Chemical methods for reductions of the purine content of bakers yeast, a form of single-cell protein. **Journal of the Science and Food Agriculture**, London, v.27, n.3, p.25-30 , mar., 1976.
- TU, C.; FARNUM,C. & CLELAND, J. Extraction of protein from mechanically disrupted freeze-dried brewer's yeast. **Journal of Milk and Food Technology**, Madison, v.38, n.4, p.219-222, apr., 1975.
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J.E. Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. Batch culture studies. **Journal of Food Science**, Chicago, v.40, n.2, p.336-341, mar./apr., 1975.
- VIJAYALAKSHMI, K. & MOTLAG, D.B. Effect of perchlorate on mitochondrial function. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysic**, New Delhi, v.25, n.1, p.48-51, jan., 1990.
- VIJAYALAKSHMI, K. & MOTLAG, D.B. Biochemical changes in mitochondria during chronic perchlorate toxicity. **Journal of Environmental Biology**, Muzaffargar, v.13, n.2 , p.149-158, feb, 1992.
- WASLIEN, C.I.; CALLOWAY, D.H.; MARGEN, S. & COSTA, F. Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources.**Journal of Food Science**, Chicago, v.35, n.3, p. 294-298, apr., 1970.
- WIDDOWSON, E.S. Nutrition and cell and organ growth. In; SHILS, M.E & YOUNG, V.R. **Modern nutrition in health and disease**. 7th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1989. p.617-627. Chap. 33.
- WRIGHT, A.P.H.; BRUNS, M. & HARTLEY, B.S. Extraction and rapid inactivation of proteins from *Saccharomyces cerevisiae* by trichoroacetic acid precipitation. **Yeast**, New York , v.5 , n.1, p.51-53, jan./feb. , 1989.
- YOUSRI, R.M. Single cell protein: its potencial use for animal and human nutrition. **World Review of Animal Production**, Rome, v.18, n.2, p.49-67, apr./ jun., 1982.

ZONTA, E.P. & MACHADO, A.A. **SANEST**. Programa estatístico desenvolvido pelo CIAGRE . Centro de informática na Agricultura da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. Departamento de Matemática e estatística. ESALQ-USP, Piracicaba, 1988.