



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVO SUBMERSO COM *Saccharomyces cerevisiae* PARA
PRODUÇÃO DE BIOMARCADORES MICOTOXICOLÓGICOS

CRISTIANA COSTA BRETANHA

Prof^a Dr^a Jaqueline Garda-Bufferon

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
ESCOLA DE QUÍMICA E ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

CARACTERIZAÇÃO DE CULTIVO SUBMERSO COM *Saccharomyces cerevisiae* PARA
PRODUÇÃO DE BIOMARCADORES MICOTOXICOLÓGICOS

CRISTIANA COSTA BRETANHA

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do
título de mestre em Engenharia e
Ciência de Alimentos.

Prof^a Dr^a Jaqueline Garda-Bufferon

Orientadora

RIO GRANDE, RS

2014

Dedico: Aos maiores exemplos em minha vida: meus pais, Decarte e Rosilena, por se dedicarem à minha educação e acreditarem no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Decarte** e **Rosilena**, pelo carinho, amor, esforço, por torcerem e vibrarem com minhas conquistas e pelo apoio incondicional para a minha formação. Obrigada por acreditarem em mim.

As minhas irmãs **Tatiana** e **Liliana**, pela amizade, apoio, incentivo e por serem muito mais que minhas irmãs.

Aos meus sobrinhos **Larissa** e **Luiz Gustavo**, por tornarem meus dias mais alegres.

Obrigada a todos por fazerem parte da minha vida!!!

À minha orientadora **Jaqueline**, por acreditar na minha competência, responsabilidade e capacidade, pelas conversas e conselhos, pela paciência nos momentos difíceis. Obrigada pela atenção, preocupação, pela amizade e ensinamentos durante esses anos.

À Professora **Eliana**, por ter me orientado desde a iniciação científica, pela oportunidade de trabalho e confiança depositada em mim. Obrigada pelas infinitas ajudas e conselhos, além da preocupação e amizade ao longo desses anos. Obrigada por mostrar que sou capaz não para os outros, mas para mim mesma. Enfim, obrigada por tudo.

À Professora **Lucielen** pelas valiosas ideias e sugestões no decorrer do trabalho e pela atenção.

Aos **professores** membros da banca examinadora, por terem aceitado colaborar com esse trabalho e pelas sugestões.

Aos alunos de iniciação científica, **Tiago**, **Guta** e **Paulo**, obrigada pela ajuda, paciência e dedicação de cada um pelo trabalho.

À **Jesus**, técnica do Laboratório de Micotoxinas e Ciência de Alimentos, pela força e determinação, obrigada pela sua alegria diária, pelos pensamentos e orações e por confiar no seu “braço direito”. Ao **Roque**, técnico do LEB, pela amizade e apoio ao longo do trabalho.

Às amigas, um agradecimento especial: **Pri** e **Paty**, por me mostrarem que a amizade verdadeira existe, pelas inúmeras conversas e muitas risadas. Obrigada pelo apoio e por compreender meu jeito “sucinto” de ser. A **Fe**, **Larine** e **Tai** por estarem sempre dispostas a ajudar, por terem me proporcionado momentos de alegria, companheirismo e amizade.

GURIAS obrigada por tudo!!!

Aos **amigos**: Ana, Ane, Annie, Adri, Antônio, Carol, Elisa, Fran, Lidi, Lu, Mariane, Muriele, Náthali, Paola, Paula, Rosana, Raquel e a Professora Leonor, obrigada pelos momentos de descontração e agradável companhia.

Ao Laboratório de Engenharia Bioquímica (**LEB**), Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos e Metais (**LACOM**), Laboratório de Microbiologia e Biosseparações e ao Laboratório de Tecnologia de Alimentos (**LTA**) pela colaboração com o desenvolvimento desse trabalho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos** pela oportunidade de realizar e concluir o trabalho.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram com este trabalho!!!

O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.

(José de Alencar)

RESUMO

Um dos principais desafios para garantir um alimento saudável é a diminuição do risco de contaminações microbianas, principais causadores de alterações de alimentos e de ocorrência de toxi-infecções alimentares. Dentre estes destacam-se as micotoxinas, metabólitos fúngicos secundários frequentemente detectados em grãos, sendo a cevada um dos mais contaminados pela micotoxina deoxinivalenol (DON), a qual apresenta resistência à degradação, causando danos a saúde e perdas econômicas. O controle fúngico antes e após a colheita nem sempre garante que a matéria-prima esteja totalmente descontaminada, visto que os próprios fungicidas podem representar um estresse ao fungo e estimular a produção de micotoxinas. A detecção de DON em alimentos é complexa e os limites de detecção são altos, o que pode significar risco de contaminação crônica de indivíduos pelo consumo de alimentos contaminados sem que a toxina seja detectada analiticamente. Assim, outros indicativos da presença de DON são muito interessantes para garantir a inocuidade de alimentos. Nesta linha, estão os biomarcadores, que compreendem células, tecidos ou compostos produzidos biologicamente como resposta a presença de um contaminante. Esses biomarcadores podem ser um indicativo da presença de DON durante processamentos alimentícios, principalmente aqueles que envolvam micro-organismo como a espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Este trabalho teve como objetivo avaliar a produção diferenciada de marcadores micotoxicológicos, caracterizados como biomarcadores, sintetizados por *Saccharomyces cerevisiae* aplicando diferentes condições de cultivo submerso na presença de DON. O estudo foi realizado avaliando a produção de metabolomas por duas cepas diferentes da levedura, uma de alta e outra de baixa fermentação, comparando quanto ao meio de cultivo na presença de $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de DON, o modo de cultivo (aeróbio e anaeróbio) e concentração de inóculo (2; 6,6 e 10%) durante 96 h de fermentação. A presença destes biomarcadores foi realizada pelo acompanhamento da concentração proteica, pH, biomassa ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), atividade de enzimas (proteases e oxidoredutases), viabilidade celular ($\text{células}\cdot\text{mL}^{-1}$), produção de glutathiona (GSH), determinação da concentração de açúcares redutores totais e a caracterização do conteúdo protéico intracelular por eletroforese. A comparação entre os dois tipos de cepas de *S. cerevisiae* quanto a produção de marcadores micotoxicológicos indicou que a levedura de alta fermentação em condições de anaerobiose a 26°C durante 96 h teve o perfil alterado na presença de DON, visto que em 72 h de fermentação ocorreu aumento da atividade enzimática da peroxidase (71%) e também da produção de GSH (62%) quando comparadas com o controle. Em relação ao estudo da concentração de inóculo em anaerobio os melhores indicativos de alteração do perfil metabolômico foi com 6,6% de inóculo em 72 h de fermentação na presença da micotoxina. Neste mesmo período, foi possível determinar duas faixas de diferenciação quanto a expressão proteica intracelular, uma na faixa de 47 kDa e outra em 54 kDa, uma vez que apresenta o efeito ocasionado pela presença da micotoxina DON no metabolismo da *S. cerevisiae*, sendo essas proteínas de grande interesse, pois são representadas como biomarcadores para DON ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

PALAVRAS-CHAVE: levedura, marcadores biológicos, micotoxina.

ABSTRACT

CHARACTERIZATION OF SUBMERGED CULTURE FOR PRODUCTION WITH *Saccharomyces cerevisiae* biomarker MICOTOXICOLÓGICOS

One of the main challenges in ensuring a healthy food is the decreased risk of microbial contamination, causing major changes in food and occurrence of food toxi-infections. Among these there are the mycotoxins, fungal secondary metabolites commonly found in grains, barley is one of the most contaminated by the mycotoxin deoxynivalenol (DON), which is resistant to degradation, causing health damage and economic losses. Fungal control before and after harvest does not always guarantee that the raw material is completely decontaminated, as fungicides themselves may play a fungus and stress to stimulate the production of mycotoxins. The detection of DON in food is complex and the detection limits are high, which may mean risk of chronic infection of individuals infected by consumption of the toxin unless food is detected analytically. Thus, other indications of the presence of DON are very interesting to ensure food safety. In this line are the biomarkers comprising cells, tissues or biological compounds produced in response to the presence of a contaminant. These biomarkers may be indicative of the presence of DON in food processing, especially those involving micro-organism such as *Saccharomyces cerevisiae* species. This study aimed to evaluate the differentiated production micotoxicológicos markers, characterized as biomarkers, synthesized by *Saccharomyces cerevisiae* by applying different conditions of submerged cultivation in the presence of DON. The study was conducted to evaluate the production of metabolomas two different strains of yeast, one high and one low fermentation, as compared to the culture medium in the presence of $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ of DON, the method of cultivation (aerobic and anaerobic) and concentration of inoculum (2; 6.6 and 10%) at 96 h of fermentation. A presença destes biomarcadores foi realizada pelo acompanhamento da concentração proteica, pH, biomassa (g.L^{-1}), atividade de enzimas (proteases e oxidoredutases), viabilidade celular (células.mL^{-1}), produção de glutationa (GSH), determinação da concentração de açúcares redutores totais e a caracterização do conteúdo protéico intracelular por eletroforese. The comparison between the two types of strains of *S. cerevisiae* as producing micotoxicológicos markers indicated that yeast-fermented under anaerobic conditions at 26°C for 96 h was altered in the presence of DON profile, whereas in 72 h fermentation took place increased enzymatic activity of peroxidase (71%) and also the production of GSH (62%) compared with the control. Regarding the study of inoculum concentration on the top anaerobio indicative of alteration of metabolomic profile was with 6.6% inoculum at 72 h of culture in the presence of the mycotoxin. During this period it was possible to determine two bands differentiation as intracellular protein expression, one in the range of 47 kDa and 54 kDa in once showing the effect due to the presence of mycotoxin DON metabolism in *S. cerevisiae*, these being proteins of great interest because they are represented as biomarkers for DON ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

KEY WORDS: yeast, biological, mycotoxin markers.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do gel de separação para eletroforese utilizando placa de 1 mm.	25
Tabela 2 - Composição de gel de concentração para eletroforese utilizando placa de 1 mm. .	26
Tabela 3 - Valores de proteína extracelular durante 96 h em cultivo submerso com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).	30
Tabela 4 - Valores de substrato (glicose) durante 96 h em cultivo submerso com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).	30
Tabela 5 – Número de células não viáveis dos cultivos anaeróbio e aeróbio com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta e baixa fermentação.	32
Tabela 6 – Concentração celular para o cultivo submerso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação na ausência (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).	33
Tabela 7 - Produção de etanol obtido durante o cultivo submerso com a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação na ausência (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).	35
Tabela 8 – Fatores de conversão obtidos durante o cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).	35
Tabela 9 - Concentração celular (g.L^{-1}) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação.	38
Tabela 10 – Percentual de células não viáveis durante o cultivo com a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação na ausência (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).	39
Tabela 11 - Concentração de glicose (g.L^{-1}) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> de alta fermentação.	40
Tabela 12- Concentração de GSH (g.L^{-1}) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de <i>S. cerevisiae</i> de alta fermentação.	41
Tabela 13 - Produção de etanol com diferentes concentrações de inóculo no meio em 72 h de fermentação.	41
Tabela 14 - Conteúdo de proteínas intracelulares (g.L^{-1}) da levedura <i>S. cerevisiae</i> em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo.	42
Tabela 15 - Conteúdo de proteína extracelular (g.L^{-1}) da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em cultivo submerso sem agitação utilizando diferentes concentrações de inóculo.	43

Tabela 16 - Atividade de peroxidase (U/mg) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação.	43
Tabela 17 – Atividade de peroxidase (U/mg) em cultivo submerso anaeróbio utilizando adaptações do cultivo com diferentes concentrações de inóculo.....	44
Tabela 18 - Produção de GSH (g.L ⁻¹) em cultivo submerso anaeróbio utilizando adaptações do cultivo com diferentes concentrações de inóculo.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-Estrutura básica dos tricotecenos.....	7
Figura 2-Estrutura química dos tricotecenos.....	7
Figura 3 - Estrutura química do deoxinivalenol (DON).....	8
Figura 4- Microfotografia da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
Figura 5 - Curvas de crescimento celular dos cultivos com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de (a) baixa fermentação e (b) alta fermentação. Cultivo: Sem agitação (- □- controle;.....	28
Figura 6 - Valores de pH dos cultivos com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de (a) baixa fermentação e (b) alta fermentação. Cultivo: Sem agitação (- □- controle; - ■ - tratamento); com agitação (- ○- controle; - ● - Tratamento)	29
Figura 7 – Valores de glutatona, concentração celular e consumo de glicose durante 96 h de fermentação em cultivo sem agitação com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação. Concentração celular (-□- Controle; -■- Tratamento); Glicose (-○- Controle; -●- Tratamento); Glutaciona (-Δ-Controle; -▲- Tratamento).	34
Figura 8 - Conteúdo de proteínas intra e extracelular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação durante cultivo submerso anaeróbico. Proteína extracelular (-□- Controle; - ■- Tratamento); proteína intracelular (-○- Controle; -●- Tratamento).....	36
Figura 9– Perfil de atividade enzimática durante cultivo submerso anaeróbio com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> de alta fermentação. Peroxidase (-□- Controle;-■- Tratamento); protease (-○- Controle; -●- Tratamento).	37
Figura 10 - Relação entre a massa molecular e o fator de retenção do gel para o marcador molecular.	46
Figura 11 - Perfil eletroforético do experimento controle e do tratamento fortificado com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de DON. Onde (1) padrão molecular; (2) controle; (3) tratamento.....	47

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	3
2.1 Geral.....	3
2.2 Específico.....	3
3. JUSTIFICATIVA.....	4
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1 Micotoxinas.....	5
4.1.1 Deoxinivalenol (DON).....	8
4.1.1.1 Descontaminação de micotoxinas	10
4.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	12
4.2.1 Versatilidade e características celulares.....	12
4.2.2 Glutathione e outros metabólitos	14
4.2.3 Resposta a presença de micotoxinas	15
4.3 Biomarcadores	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	20
5.1 Material	20
5.1.1 Micro-organismos	20
5.1.2 Padrão de deoxinivalenol (DON).....	20
5.2 Estratégia de avaliação do cultivo submerso	20
5.2.1 Preparo do inóculo	20
5.2.2 Condições experimentais avaliadas	21
5.3 Metodologias analíticas.....	21
5.3.1 Concentração celular (biomassa)	21
5.3.2 Determinação de pH.....	22
5.3.3 Determinação de açúcares redutores.....	22
5.3.4 Determinação da viabilidade celular.....	22
5.3.5 Determinação da concentração de glutathione (GSH).....	23
5.3.6 Extração e quantificação proteica	23
5.3.7 Perfil de alcoóis.....	24
5.3.8 Caracterização das atividades enzimáticas	24
5.3.9 Caracterização proteica	25
5.3.10 Determinação de DON.....	26

5.4 Análise estatística e cálculo de fatores de conversão	27
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6.1 Avaliação dos parâmetros de cultivo.....	28
6.1.1 Influência das cepas de <i>S. cerevisiae</i> estudadas	28
6.1.2 Efeito do tipo de cultivo sobre a formação de metabólitos da <i>S.cerevisiae</i> de alta fermentação	32
6.1.3 Estudo do efeito de diferentes concentrações de inóculo no crescimento de <i>S. cerevisiae</i> de alta fermentação e na produção de metabólitos	38
6.1.4 Adaptação do inóculo	44
6.1.5 Perfil da síntese proteica.....	45
6.1.6 Determinação de DON	48
7. CONCLUSÕES	49
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

A contaminação dos alimentos por fungos pode ocorrer no campo, durante e após a colheita, transporte, processamento e armazenamento do produto, o que ocasiona um risco à segurança alimentar. Algumas espécies podem produzir as micotoxinas, uma ampla variedade de metabólitos secundários produzidos após uma fase de crescimento equilibrada seguido por condições de estresse (ATROSHI et al., 2002; HE et al., 2010; SABINO, 1996).

A aplicação correta de fungicidas, o uso de boas práticas de armazenagem e processamento adequado são alternativas bastante discutidas para minimizar os níveis destes contaminantes em matérias-primas e alimentos. No entanto, a presença de fungos toxigênicos em alimentos não significa a ocorrência de micotoxinas, mas indica risco de produção em resposta às condições ambientais. Por outro lado, a ausência destes fungos em alimentos pode não corresponder à ausência destes compostos tóxicos. A estabilidade de micotoxinas durante longos períodos em condições adversas, mesmo quando micro-organismos contaminantes já tenham perdido a viabilidade são outra possibilidade de risco. Por isso, a prevenção da contaminação e do crescimento fúngico, bem como a detoxificação dos compostos produzidos são métodos de controle utilizados para reduzir a concentração de micotoxinas a níveis seguros. Além disto, a obtenção de produtos de degradação não tóxicos provenientes de condições de descontaminação que não promovam a diminuição do valor nutritivo dos alimentos descontaminados é uma meta a ser alcançada, mesmo porque a estabilidade deste composto presente durante muitos anos quando estocado a temperatura ambiente ou mesmo aquecido a altas temperaturas (CERVERÓ et al., 2007; GARDA et al., 2005; SCHRÖDTER, 2004).

As toxinas fúngicas comumente detectadas em matérias-primas e alimentos são aflatoxinas, ocratoxina A (OTA) (MAZIERO; BERSOT, 2010), tricotecenos (KAMMOUN et al., 2010), zearalenona (ZACHARIASOVA et al., 2010), fumonisinas e certos alcalóides de maior impacto agro-econômico. Alguns fungos são capazes de produzir mais de uma micotoxina, bem como algumas delas são produzidas por mais de uma espécie fúngica (MOHAMED, 2011; XINGMIN et al., 2009). Dentre as toxinas, o deoxinivalenol (DON) é considerado uma das mais importantes, destacando-se por sua maior ocorrência em alimentos e rações, além do fato da sua toxicidade e estrutura não ser destruída totalmente por vários processos físicos, químicos e microbiológicos (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010; JEONG et al., 2010).

A micotoxina DON, pertencente a classe dos tricotecenos, tem efeito imunossupressor sobre a saúde dos animais, seres humanos e micro-organismos devido aos seus múltiplos efeitos inibitórios sobre células eucarióticas, incluindo a inibição da síntese de proteínas em diferentes níveis a partir do DNA, RNA e inibição da função mitocondrial. Em consequência, a divisão celular e a função da membrana são afetadas (ROCHA; ANSARI; DOOHAN, 2005).

Para prevenir danos é necessária a identificação das micotoxinas nos alimentos ou avaliação de indicadores bioquímicos do contato de indivíduos de diferentes espécies com o contaminante, os biomarcadores. Estes podem ser a produção diferenciada de composto, tendo como destaque a síntese proteica diferenciada ou mesmo a alteração de atividade de enzimas ou compostos relacionados ao estresse oxidativo celular (ANSARI; AJEET; MALHOTRA, 2010; LINO; SILVA; PENA, 2007).

A micotoxina desencadeia a produção de biomarcadores através de micro-organismos que podem fornecer subsídios para a avaliação de risco ou contaminação. Para isso, torna-se necessário a identificação e a quantificação destes biomarcadores, pois permite esclarecer o mecanismo envolvido na interação entre a espécie microbiana promotora da fermentação e a micotoxina, fornecendo subsídios também para a avaliação da descontaminação micotoxicológica. Portanto, a levedura do gênero *Saccharomyces*, a mais empregada na indústria alimentícia em processos que envolvam a transformação microbiana, pode ser uma importante produtora de compostos indicativos da presença de micotoxinas (DEQUIN; CASAREGOLA, 2011; GOLLI-BENNOUR; BACHA, 2011).

A aplicação e o desenvolvimento de técnicas proteômicas, cuja função consiste em separar e identificar proteínas, vêm sendo utilizada na detecção de biomarcadores. Esta ferramenta está se tornando uma abordagem promissora para identificar uma série de proteínas sintetizadas de forma alternativa da expressão gênica em presença da micotoxina, principalmente para DON, em função de sua capacidade de inibir a síntese proteica. No entanto, estudos tem potencializado o foco somente em linhagens de células humanas ou em animais, visando avaliação do efeito toxicológico, sem aplicação na triagem de contaminação micotoxicológica (COSTA et al., 2011; GIROLAMO et al., 2011).

Espera-se, portanto, estabelecer as melhores condições para avaliar a produção diferenciada de metabolomas, caracterizados como biomarcadores e sintetizados por cepas *Saccharomyces cerevisiae*, aplicando diferentes condições de cultivo submerso em presença de DON.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Avaliar a produção diferenciada de metabolomas, caracterizados como biomarcadores e sintetizados por cepas *Saccharomyces cerevisiae*, aplicando diferentes condições de cultivo submerso em presença de DON.

2.2 Específico

- Selecionar uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* mais promissora durante o cultivo submerso para responder a presença dos biomarcadores;
- Avaliar o efeito de diferentes concentração do inóculo, cepas de levedura (alta e baixa fermentação) e agitação sobre a produção de metabólitos celulares potencialmente biomarcadores em presença de DON;
- Extrair e identificar o biomarcador proteico produzido em presença da micotoxina DON durante cultivo submerso.

3. JUSTIFICATIVA

Os tricotecenos são uma família de micotoxinas produzidas principalmente por *Fusarium graminearum*, responsáveis por contaminar cereais, como milho, trigo e cevada. Na região sul do Brasil, como em outros países, a frequente detecção destes compostos tóxicos em grãos estão descritos na literatura em função das alterações nas variáveis abióticas, como condições climáticas de invernos frios e úmidos (GOLLI-BENNOUR; BACHA, 2011).

Na produção de alimentos alguns processos podem ser alterados e/ou influenciados pelo nível de contaminação, ou seja, presença de micotoxinas, que afetam a ação dos agentes fermentativos e conseqüentemente a qualidade do produto final. A alteração da atividade transformadora de micro-organismos em processos fermentativos pode ser verificada pela produção de compostos específicos, em resposta da presença de contaminantes, os biomarcadores. Sendo assim, são versáteis em termos de capacidade de resposta a uma variedade de substâncias tóxicas quimicamente diferentes e são de menor custo. Estas técnicas tornam-se mais atraentes por serem usadas em condições relativamente simples (XINGMIN et al., 2009).

Além disso, prometem fornecer medidas mais objetivas de exposição a DON, pois a seleção de biomarcadores é incipiente e ainda não permite avaliar o nível de exposição ou estimativa do risco de dano ao meio ambiente e de processos biotecnológicos que utilizam matéria-prima contaminada. Sendo assim, é de grande interesse o conhecimento dos mecanismos de produção e da ação de biomarcadores (COSTA et al., 2011; LINO; SILVA; PENA, 2007; TRITSCHER; PAGE, 2004).

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 Micotoxinas

O estresse e as condições ambientais propiciam a possível produção de micotoxinas, metabólitos secundários associados com a contaminação dos alimentos por fungos e que representa um perigo à saúde pública. Esses micro-organismos, além de diminuir a disponibilidade de nutrientes, alteram as características sensoriais e podem produzir substâncias tóxicas (KUMAR et al., 2010).

O fato de um alimento estar contaminado por fungo não implica, necessariamente, que o mesmo contenha micotoxina, já que nem todos os gêneros são toxigênicos. Por outro lado, a toxina pode estar presente no alimento mesmo na ausência do fungo, pois grande parte destas substâncias é resistente a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação. Esses processos normalmente são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos, mas não as toxinas em si (UENO, 1986; YOSHIZAWA, 2001).

Em condições adversas, alguns fungos produzem as micotoxinas, que apresentam efeitos tóxicos, além de promoverem micotoxicoses em pessoas que ingeriram o produto contaminado (ABRAMSON et al., 1998; ARMANDO et al., 2013). O consumo de alimentos contaminados por micotoxinas pode ocasionar intoxicações e problemas crônicos em homens e animais devido à ingestão destas substâncias, que afetam várias funções do organismo, tais como: alterações hepáticas, renais, circulatórias, no sistema nervoso e no trato digestivo (ZAIN, 2011).

Micotoxinas têm um alto potencial tóxico, expresso por suas propriedades físico-químicas e características estruturais. Na literatura, seu potencial toxigênico é encontrado em concentrações muito baixas ($\mu\text{g.kg}^{-1}$), em animais e em cultivo celular expresso pela capacidade de ação tóxica aguda, carcinogenicidade, teratogenicidade, neurotoxicidade, mutagenicidade e efeitos estrogênicos. Essas adversidades causam diminuição da reprodução e do crescimento levando a sérios prejuízos econômicos (SHERIF; SOLAMA; ABDEL-WAHAB, 2009; HOOFT et al., 2011; ZAIN, 2011). Alguns dos gêneros fúngicos mais conhecidos relacionados à produção de micotoxinas são *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Claviceps* e *Alternaria*. As micotoxinas mais comumente encontradas em alimentos são as aflatoxinas, ocratoxinas, tricotecenos, zearalenona e fumonisinas (KUMARA; BASUA; RAJENDRANB, 2008).

A fumonisina é produzida por espécies do fungo *Fusarium*, principalmente pelas cepas de *F. moliniiforme*, se desenvolvendo tanto em ambientes tropicais como temperados e são detectadas principalmente em milho, arroz, cevada e frutos em geral. A zearalenona (ZEA) é produzida principalmente por *F. graminearum* e *F. culmorum*, e são consideradas mico-estrogênicas por influenciar no efeito de hormônios esteroides, podendo causar a queda da fertilidade em animais (JAJIC; JURIC; ABRAMOVIC, 2008; MURPHY et al., 2006; PITT, 2000; TANAKA et al., 2007).

As aflatoxinas (AFLA) produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus* são agentes causadores de danos à saúde incluindo a debilitação do sistema imunológico, além de possuírem alegação de efeito carcinogênico (KUMARA; BASUA; RAJENDRANB, 2008).

As ocratoxinas A (OTA) são produzidas principalmente pelo fungo *Penicillium verrucosum*. Esta micotoxina pode causar nefropatia endêmica de Balkan, doença característica por causar grave dano renal, além de alegação de efeitos mutagênicos, carcinogênicos e imonodepressores (CAST, 2003).

Os tricotecenos são produzidos principalmente por *Fusarium graminearum*, responsáveis por contaminar cereais, como milho, trigo e cevada. Esses destacam-se por representar micotoxinas de alta toxicidade e resistência a degradação (GOMES, 2003). Os tricotecenos compreendem um vasto grupo de mais de 200 metabólitos fúngicos com a mesma estrutura de base, portanto são produtos de metabolismo secundário de fungos dos gêneros *Fusarium*, *Myrothecium*, *Trichothecium*, *Cephalosporium*, *Verticimporium* e *Stachybotrys* (BADIALE-FURLONG, 1992; MOHAMED, 2011; PESTKA, 2010). Por conseguinte, uma contaminação regular pode ser esperada à base de cereais, o que representa um risco potencial para a saúde humana.

Além disso, essas micotoxinas são identificadas em grãos como fitopatógeno da planta, ocorrendo no campo, acompanhado de umidade relativa entre 80 e 90%, e são quimicamente estáveis ao aquecimento e processamento de alimentos, o que gera risco quanto a segurança alimentar devido ao alto consumo destes cereais. Esses se destacam por representar micotoxinas de alta toxicidade e resistência à degradação (BULLERMAN; BIANCHINI, 2007; CETIN; BULLERMAN, 2006; HE et al., 2010).

O termo tricotecenos se caracteriza por apresentar uma ligação dupla entre os carbonos 9 e 10 e um grupamento epóxido nas posições 12 e 13 da estrutura, como mostra a Figura 1. Além disso, o efeito tóxico se deve principalmente ao anel epóxido que é bastante estável, mas pode sofrer alterações drásticas, como em meio fortemente ácido (AYALA,

2010; BOUTIGNY; RICHARD-FORGET; BARREAU, 2008; UENO, 1986). Os tricotecenos podem ser subdivididos em quatro grupos principais: A, B, C e D (Figura 2). No grupo A, maior grupo, estão os tricotecenos cuja posição 8 tem como substituintes grupos acilados ou hidroxilas, como a toxina T-2 e HT-2, neosolaniol e diacetoxiscirpenol (DAS). O grupo B é o mais comum, constituído por compostos onde na posição 8 está um grupamento cetônico, incluindo o deoxinivalenol (DON ou vomitoxina), nivalenol e fusarenona-x. Os tricotecenos do tipo C possuem dois grupamentos epóxidos, como a crotocina, o grupo tipo D é constituído pelos tricotecenos macrocíclicos entre C-4 e C-15, onde está a roridina, a verrucarina e a satratoxina (GROVE, 2007; KIMURA et al., 2007; REINO et al., 2008).

Figura 1-Estrutura básica dos tricotecenos.

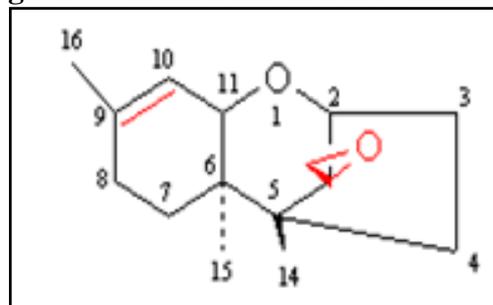
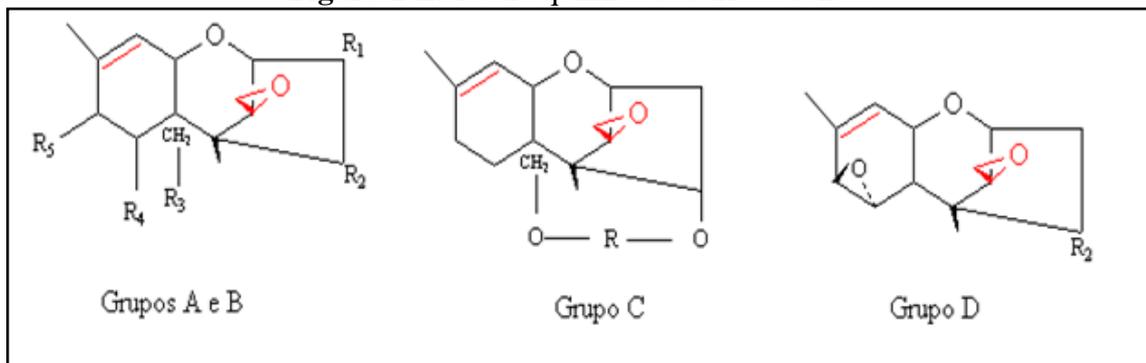


Figura 2-Estrutura química dos tricotecenos.

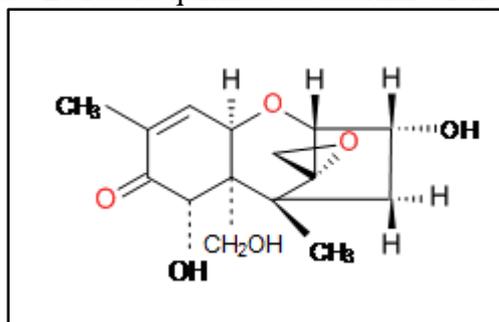


Em geral, os tricotecenos podem atuar no sistema imunológico devido a sua capacidade de inibição da síntese proteica e interação com as membranas das células, uma vez que a contaminação causa uma redução na qualidade do grão, queda do valor comercial e um risco a segurança alimentar (BOUTIGNY; RICHARD-FORGET; BARREAU, 2008).

4.1.1 Deoxinivalenol (DON)

Deoxinivalenol (DON), uma micotoxina pertencente ao grupo B dos tricotecenos, produzida pelo gênero fúngico *Fusarium*, é o maior contaminante de cereais e seus co-produtos como também de vegetais (MEKY et al., 2001). Esse tricoteceno, assim como os demais, é diretamente tóxico a partir da sua porção epóxido, possui uma estrutura de anéis sesquiterpenoide, adicionada de duas hidroxilas e um hidrogênio. Sua fórmula molecular é $C_{15}H_{20}O_6$, nomeado como 12,13-epoxi-7,15-triidroxi-tricotec-9-en-8-ona de acordo com a Figura 3 (SUDAKIN, 2003; MOHAMED, 2011; WARTH et al., 2011; YOSHIZAWA, 2001).

Figura 3 - Estrutura química do deoxinivalenol (DON).



A rota biossintética para a formação de DON começa com a ciclização do farnesil pirofosfato para tricodieno pela enzima síntase tricodieno. A via posterior envolve uma série de reações de oxigenações, isomerizações, ciclizações e esterificações (SWEENEY; DOBSON, 1999). DON é um composto muito estável em pH na faixa de 1 a 10 e a temperaturas de 170 a 350 °C (SOBROVA et al., 2010).

Essa micotoxina ocasiona a inibição da síntese de proteínas do DNA e consequentemente, morte celular, destacando seu caráter imunossupressor e carcinogênico. Os sinais clínicos de toxicidade aguda por DON incluem efeitos anorexígenos, vômito, irritação cutânea, diarreia, hemorragias, causando aborto em mamíferos e até a morte (HOOFT et al., 2011; RUMBEIHA, 2000).

Sua capacidade de dispersão no organismo humano foi testada em células epiteliais e fibroblastos do pulmão em cultura primária. A micotoxina demonstrou incorporação por ambas as células, o que comprova que o DON pode atravessar a membrana plasmática e assim interagir com uma série de alvos no interior da célula, tendo como agravante a ausência de qualquer manifestação de metabolização, tendo uma recuperação total

ao final do experimento (KÖNIGS et al., 2007). Essa facilidade de permeabilidade ao interior da célula pode causar sérios danos a viabilidade e manutenção celular, existindo indícios de que esta molécula pode causar estresse oxidativo no DNA celular (ZHANG et al., 2009).

Estudos investigam os efeitos de DON em cultivos de células proporcionando uma visão única sobre o potencial mecanismo de ação desta toxina. Assim, estudos *in vitro* da toxicidade de DON empregam células clonadas e de medula óssea, fígado, linfóide, rim, pulmão e tecidos. As células do sistema mononuclear fagocitário estão entre as mais sensíveis a DON (PESTKA et al., 2004).

Estudos realizados com espécies fúngicas para degradar DON em fermentação submersa foram descritos por Garda e colaboradores (2005) que estudaram a cinética de degradação desta micotoxina, onde foi observada a adsorção da toxina como via de degradação principal até o intervalo de 144 h (74% de redução). *Rhizopus oryzae* ocasionou a maior diminuição na concentração de DON, aproximadamente 90% em 240 h e *Aspergillus oryzae*, 74% de redução em 96 h.

Devido a sua estabilidade, o DON pode permanecer nos alimentos por um longo período de tempo, causando uma gama de efeitos adversos à saúde de várias espécies (LATTANZIO et al., 2011). Quando não removido durante o processo alimentar, DON apresenta-se como um potencial risco a saúde humana e animal, onde o emprego de técnicas para degradação é necessário, através de sua inativação, transformação e remoção (IBÁÑEZ-VEA; LIZZARRAGA; GONZÁLEZ-PEÑAS, 2011). Técnicas físicas e químicas têm sido largamente utilizadas para degradar DON, além da avaliação de plantas resistentes a *Fusarium* e o uso de fungicidas pré-colheita, sendo estas as principais estratégias para prevenção (AUDENAERT et al., 2012).

A ingestão diária tolerável de DON de 1 µg/kg/dia foi estabelecida pela União Europeia com base em efeitos imunotóxicos e tóxicos após dois anos de estudos em ratos (KOLF-CLAUW et al., 2009). Há evidência considerável de que em estudos *in vitro* com concentrações pequenas de DON ocasionou a indução seletiva da expressão do gene, mas em concentrações elevadas, a toxina provoca a morte celular, tipicamente por apoptose (PESTKA, 2010).

No Brasil, está em vigor uma nova legislação que dispõe sobre os limites máximos toleráveis para DON em alimentos, sendo neste ano (2014) valores aceitáveis de 1250 µg.kg⁻¹, para farinha de trigo, massas, produtos de panificação e cevada malteada, e no ano de 2016 esse valor reduzirá para 750 µg.kg⁻¹ (ANVISA, 2013).

4.1.1.1 Descontaminação de micotoxinas

Algumas alternativas vêm sendo utilizadas para o controle da contaminação por DON. No campo, a realização de uma gestão adequada, como a rotação de culturas, ajuda na remoção do material fúngico residual. Por vezes, os conservantes à base de ácidos alifáticos têm sido usados para prevenir a deterioração e contaminação por esta micotoxina aos produtos armazenados, especialmente produtos alimentares. Estes conservantes são predominantemente fungicidas, e uma alternativa ao seu uso seriam os óleos essenciais e antioxidantes que impedem o crescimento e acumulação de micotoxinas em grãos parcialmente secos (JOUANY, 2007; KLINGLMAYR et al., 2009).

Com isso, estratégias de degradação de DON são relatadas de forma a remover ou reduzir suas concentrações a níveis adequados. Reações de transformação descobertas até o momento incluem alcalinização, oxidação, redução, hidrólise, hidratação e conjugação (HE et al., 2010). Remoção e desintoxicação de tricotecenos por processos físicos, químicos e biológicos têm sido investigados. Processos físicos e químicos aplicados isoladamente demonstram bons resultados, mas quando usados concomitantemente apresentam maior grau de redução. Além disso, abordagens biológicas estão sendo agora estudadas com esse fim, como no caso da aplicação de micro-organismos e enzimas (AMÉZQUETA et al., 2009; VARGA et al., 2005).

O método físico é mais eficaz para a redução de micotoxinas encontradas em grãos. No entanto, esta técnica é limitada devido ao alto custo de equipamentos e necessidade de gerenciamento adicional para a eliminação dos extratos tóxicos. Entre estas técnicas pode-se destacar limpeza, triagem, separação, inativação térmica, micro-ondas, ultrassom e adsorção (PRONYK; CENKOWSKI; ABRAMSON, 2006; SCOTT et al., 1984; SHETTY; JESPERSEN, 2006; YOUNG et al., 1986). No entanto, esses métodos não podem degradar ou remover completamente as micotoxinas testadas e muitas vezes resultam em mudanças nutricionais (CONDON et al., 1954; JENSEN et al., 1977).

A ausência de remoção completa da micotoxina ao utilizar procedimentos físicos demonstra a importância de seu uso para a redução superficial da contaminação em grãos, mas não são suficientes quando se avalia o problema de consumo em outras matérias-primas ou alimentos preparados que aportam a micotoxina em níveis de desencadear sintomas crônicos (SILVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2007).

Transformações químicas e biológicas de tricotecenos podem superar algumas destas desvantagens, porque são capazes de mudar as atividades biológicas das micotoxinas,

alterando suas estruturas moleculares. No entanto, isso não necessariamente resulta em redução da toxicidade. A desintoxicação dos tricotecenos pode resultar em reações de transformação das micotoxinas em produtos com toxicidade reduzida (HE et al., 2010). Com o emprego de métodos químicos, o produto final apresenta qualidade alterada nas características químicas, físicas, sensoriais e/ou funcionais, não sendo recomendado para produção em larga escala (SILVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2007).

A biodegração, biorremediação ou métodos biológicos, consiste no desenvolvimento de tecnologias que utilizam micro-organismos para degradar contaminantes em compostos menos tóxicos ou não tóxicos. Em função disso, vários estudos levam à identificação de micro-organismos, bactérias, leveduras, enzimas, fungos filamentosos como agentes capazes de detoxificar micotoxinas (PATHARAJAN et al., 2011).

Enzimas oxidativas tem sido destacadas na literatura por seu mecanismo de ação da oxidação de grupamentos doadores de elétrons, podendo atuar sobre estruturas moleculares de micotoxinas e assim desempenhar papel fundamental na degradação de DON, uma vez que a perda de sua toxicidade se dá principalmente pela destruição do anel epóxido (KWON et al., 2003). Sendo assim, as enzimas oxidativas podem atuar sobre o anel epóxido presente na estrutura química da micotoxina, podendo resultar na degradação micotoxicológica, e consequentemente descontaminação do material (GARDA et al., 2005).

O conhecimento sobre a interação de leveduras com micotoxinas remonta há mais de três décadas, sendo assim, o emprego da levedura vem sendo avaliado em processos de biodegradação (ZINEDINE et al., 2007). A *Saccharomyces cerevisiae* é a levedura com maior destaque dentro do gênero, e que em condições específicas de cultivo já foram relacionadas com a redução dos níveis de micotoxinas presentes em matérias-primas e insumos. Esta redução pode estar vinculada a produção de proteínas específicas que exercem função protetora contra o estresse oxidativo causado pelo composto tóxico, por exemplo, a síntese proteica diferenciada em um tipo de proteína ou classe proteica pode vir a ser definida como um biomarcador em decorrência deste estresse oxidativo causado especificamente pela micotoxina, principalmente quando caracterizado este conteúdo protéico (FRANCESCA et al., 2010; GOLLI-BENNOUR; BACHA, 2011).

Na fermentação alcoólica realizada com *Saccharomyces cerevisiae*, além de etanol, muitas substâncias voláteis são produzidas. Estes compostos são subprodutos dos processos bioquímicos e químicos, bem como de atividade metabólica da microflora (KŁOSOWSKI; MIKULSKI, 2010). Um estudo realizado por Kłosowski e colaboradores (2010) mostrou que a contaminação por micotoxina (aflatoxina, ocratoxina A, zearalenona,

fumonisina e DON) afetou, em geral, negativamente no decréscimo de CO₂, produtividade do etanol e produção de etanol final durante a fermentação.

4.2 *Saccharomyces cerevisiae*

4.2.1 Versatilidade e características celulares

As leveduras, como os bolores, são fungos, mas diferem por se apresentarem sob forma unicelular; são células simples, crescem e se reproduzem rapidamente. Também são mais eficientes na realização de alterações químicas, por causa de sua maior relação área/volume. Algumas leveduras não formam esporos e são consideradas como “fungos imperfeitos” e outras produzem esporos sexuados, sendo aproximadamente, 350 espécies diferentes de leveduras separadas em cerca de 39 gêneros (PELCZAR; REID; CHAN, 1980; PITT; HOCKING, 1997).

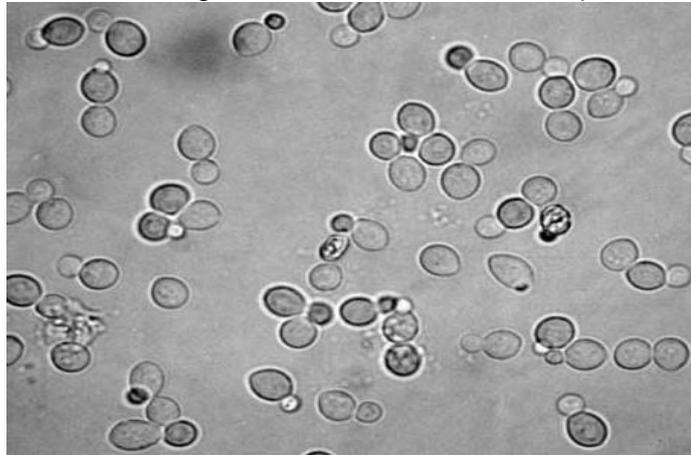
O gênero *Saccharomyces* possui oito espécies, muitas das quais desempenham um papel importante em fermentações de alimentos ou bebidas. Dentre estas está a *Saccharomyces cerevisiae*, que é conhecida por possuir diferentes mecanismos adaptativos, com o intuito de sobreviver mesmo em condições adversas como: variações de pH e temperatura, estresse oxidativo, rompimento celular e com produtos de fermentação tóxicos, principalmente o etanol (PENNINCKX, 2000).

A indústria química tem se voltado para a produção de recursos renováveis usando cada vez mais as técnicas biotecnológicas para contribuir nas transformações industriais. Estes processos possuem menor impacto ambiental pela origem biológica e por estarem voltados aos ramos da engenharia metabólica e genômica. Nos mais distintos bioprocessos, a *S. cerevisiae* é o micro-organismo mais estudado, que por sua flexibilidade metabólica, pode obter energia de forma aeróbica, anaeróbica ou mista, o que a torna aplicável em uma série de processos (SANTOS et al., 2004).

Em virtude de sua importância também na agricultura e na indústria de alimentos, a espécie *S. cerevisiae* (Figura 4), é a mais estudada, uma vez que são organismos eucarióticos, cuja forma e estrutura variam entre as diversas espécies. Além disso, suas principais estruturas consistem em: cápsula, na qual está o material extracelular limoso, viscoso e aderente formado por polissacarídeos que confere a célula proteção e adesão. A parede celular que é composta por glucanas (30-34%), manana (30%), proteína (6-8%), nas quais se enquadram algumas enzimas como invertase e hidrolases, além de quitina (1-2%) e

lipídios (8,5-13%), também apresenta como função a rigidez e proteção à célula (WISEMAN, 1986).

Figura 4- Microfotografia da levedura *Saccharomyces cerevisiae*



Outra característica importante em relação a *S. cerevisiae* são as propriedades de sua membrana celular que determinam o crescimento e forma celular. Apesar de muitos estudos estarem relacionados ao genoma desta levedura, pouco é conhecido sobre as propriedades de sua parede celular. Experimentos demonstraram que na fase estacionária, a espessura da parede é maior do que em outras fases. Esta propriedade pode ser de grande valia na estimativa de quanta força pode ser aplicada a célula sem ocorrer a ruptura, ou ainda que esta ruptura ocorra sem causar grande danos aos componentes do interior da célula, como a força de fluxo de fluido por exemplo (SMITH et al., 2000). Outro fato descrito por Smith e colaboradores (2000), é a capacidade da parede celular de leveduras na adsorção micotóxica ou ainda na liberação de metabólitos extracelulares responsáveis por propiciar a viabilidade celular.

A membrana plasmática possui lipídios, proteínas e polissacarídeos, apresenta um equilíbrio osmótico por ser semipermeável e seletiva e também enzimas de transporte. A composição da mitocôndria consiste, basicamente, em lipoproteína e em uma pequena porção de DNA e RNA, além disso, contem as enzimas respiratórias responsáveis pela conversão aeróbica de energia (DARNELL; HARVEY, 1990).

A levedura *S. cerevisiae* muito utilizada na produção de cerveja, reproduz-se assexuadamente e consegue crescer tanto em meio aeróbio como anaeróbio. A partir de carboidratos presentes no meio de crescimento celular, nomeadamente a glicose, as leveduras conseguem obter energia para a sua sobrevivência e reprodução. Este carboidrato é degradado a 2 moléculas de piruvato pela via glicolítica, onde pode ter diversos destinos dependendo do

metabolismo e das condições do meio. Em condições aeróbias, o piruvato é descarboxilado e transformado a Acetil-CoA, que entra no ciclo do ácido cítrico, sendo oxidado a H₂O e CO₂, produzindo energia necessária principalmente para a multiplicação celular. Em meio anaeróbio ou com baixos níveis de O₂, as leveduras passam a realizar fermentação alcoólica de forma a regenerar o NAD⁺, com liberação de CO₂ a partir do piruvato formado. O etanol produzido vai acumulando e acaba por ser tóxico para as próprias leveduras. Além destes compostos, este micro-organismo pode produzir ainda ésteres, fenóis e cetonas. No entanto, as leveduras também necessitam de outros nutrientes além da glicose, como o nitrogênio, aminoácidos e ácidos graxos. O oxigênio é necessário para sintetizar esteróis e ácidos graxos insaturados, de onde uma oxigenação inicial vai impedir o crescimento das leveduras (NELSON; COX, 2011).

4.2.2 Glutathiona e outros metabólitos

A glutathiona (GSH), encontrada no interior da célula, apresenta grande importância em várias funções metabólicas nas células como de proteção da oxidação por peróxidos, transporte de aminoácidos através da membrana celular e eliminação de metais pesados. Além disso, a GSH é exemplo de molécula produzida pela *S. cerevisiae* sob condições de estresse, tais como: redução de nutrientes, choque osmótico e o aumento da temperatura, dessa forma o aumento da produção pode ocorrer de duas formas, uma aumentando amplamente a concentração celular obtida ou promovendo o aumento do conteúdo intracelular (DONG et al., 2007; WEN; ZHANG; TAN, 2006).

Em condições de estresse ocorre aumento no consumo de energia nas leveduras, que induz a mudanças no metabolismo e ao acúmulo de algumas moléculas protetoras. O caminho metabólico da GSH dentro da levedura refere-se inicialmente a transformação da glicose em piruvato, que é transformada em acetil-CoA, participando assim do ciclo do ácido tricarbóxico (TCA) com liberação de energia. Para a formação da GSH, o ácido glutâmico provém do α -cetoglutarato, que é composto do ciclo do TCA. Quando é fornecido à levedura um excesso de glicose ocorre a produção de etanol através do efeito Crabtree. Havendo quantidades insuficientes de glicose no meio, o etanol pode ser assimilado e a GSH produzida (SHIMIZU et al., 1991).

Durante o crescimento em processos industriais, no início do processo ocorre o estresse osmótico das células de *S. Cerevisiae*, devido a altas concentrações de carboidratos (MARTÍ et al., 2011). Portanto, a sua disponibilidade é um fator que afeta diretamente a

expressão da célula, desta forma na síntese proteica, cujos estudos demonstram que na exaustão de glicose do meio ocorre uma maior síntese de proteínas e podendo exercer função protetora com o estresse oxidativo (FRANCESCA et al., 2010).

Durante o processo fermentativo, as células da levedura podem produzir subprodutos do metabolismo celular que reagem com o oxigênio, como, por exemplo, o peróxido de hidrogênio, danoso as componentes celulares como DNA, proteínas e lipídeos. Para combater esse dano, as enzimas peroxidases e antioxidantes desempenham papel fundamental evitando estas degradações promovidas pelo radical peróxido (KWON et al., 2003).

A levedura *S. cerevisiae* apesar de ser um micro-organismo produtor de proteínas com diferentes funções, incluindo as enzimas proteolíticas. Estas proteases muitas vezes são indesejadas por clivarem proteínas de interesse, como no caso da protease aspártica que degrada o hormônio da paratireóide humana (hPTH) sintetizado pela levedura (SONG; CHUNG, 1999).

4.2.3 Resposta a presença de micotoxinas

De acordo com Garda e colaboradores (2004) estudos com fermentação alcoólica utilizando *S. cerevisiae* demonstraram que a degradação de micotoxina pode ser uma medida de redução do estresse celular. Indicado pela avaliação dos níveis de DON e Toxina T-2 reduzidos em aproximadamente 53% durante o processo cervejeiro.

Na literatura, além da possibilidade de metabolização da micotoxina pela levedura, há relatos da ligação das micotoxinas na parede celular da levedura, podendo ocorrer em diferentes locais da sua estrutura, sendo necessários estudos mais aprofundados sobre a forma de interação que ocorre durante a adsorção. Sendo assim, estudos *in vitro* com células de leveduras tratadas termicamente estabeleceram claramente uma adsorção superior (90%) para as aflatoxinas, quando comparadas com células viáveis (35%), indicando a natureza física da ligação da parede celular com as micotoxinas (SHETTY; JESPERSEN, 2006). Os carboidratos complexos presentes na parede celular da levedura *S. cerevisiae* tem a capacidade de adsorver diferentes micotoxinas presentes nos alimentos. Esse complexo é estável em diferentes pH, tornando-o um eficiente adsorvente (STANLEY et al., 1993).

Entre as estruturas químicas que podem ser provenientes do próprio meio de cultivo, seja pela adição de alguma matéria-prima contaminada ou mesmo algum aditivo

químico, as micotoxinas e amenadiona (vitamina K3) são mencionadas como causadoras de danos a cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (BOEIRA et al., 2002; KIM et al., 2006).

A presença de micotoxinas pode influenciar na expressão proteica e na produção de algumas enzimas como as peroxidases que estão relacionadas com possíveis mecanismos de degradação. Garda-Buffon, Kupski e Badiale-Furlong (2011) e Schneider e colaboradores (2004) enfatizaram que estas enzimas apresentam um aumento elevado na sua atividade na presença da micotoxina DON, podendo ser sintetizadas como resposta ao estresse celular e assim ser caracterizadas como resposta a presença de micotoxinas, uma vez que também é mencionada como causadora de danos a cultura de *S. cerevisiae*.

4.3 Biomarcadores

A pesquisa proteômica torna possível a identificação e caracterização de marcadores biológicos proteicos, ou seja, moléculas endógenas ou exógenas específicas de um determinado estado patológico. A capacidade de identificar essas moléculas é extremamente útil no diagnóstico precoce de doenças e no acompanhamento da evolução do tratamento (CASH, 2002).

Detectar proteínas que se destacam por representarem a forma expressão da célula é interessante para serem empregados como biomarcadores e úteis em vários ramos da ciência. Diversas definições são usadas para biomarcadores, no geral é uma resposta medida em qualquer nível da organização biológico que pode estar relacionada com a presença de contaminantes (BOZO et al., 2007).

A evolução dos estudos de biomarcadores pode proporcionar que com apenas um único teste seja determinada a presença ou não de condições de estresse celulares ou até mesmo qual a substância promotora de tal manifestação (KARP, 2010). Assim, a definição de um biomarcador microbiano permite elucidar o mecanismo envolvido na interação entre a espécie microbiana, promotora da fermentação, e a micotoxina, fornecendo subsídios para a busca de formas alternativas para a descontaminação micotoxicológica (JONSSON; CASTRO, 2005).

O desenvolvimento e a aplicação de técnicas "genômicas" como a eletroforese bidimensional em gel e a espectrometria de massas vem sendo estudadas para desenvolver técnicas baseados em biomarcadores, uma abordagem promissora e que recentemente identificou a alteração do perfil proteico como forma de expressão de linhagem de células

humanas a DON através de exposição em linhas de células humanas (NOGUEIRA et al., 2011).

A eletroforese bidimensional é a principal técnica de separação de proteínas utilizada antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massas. Sua vantagem em relação a outras tecnologias é a capacidade de separar com alta resolução um grande número de proteínas de uma amostra complexa e a possibilidade de analisar a expressão gênica por meio de comparação dos padrões proteicos (QUALTIERI et al., 2007; SIZOVA et al., 2007).

A levedura, por ser um micro-organismo unicelular, está exposta a uma série de injúrias do meio. Alguns mecanismos de defesa foram desenvolvidos para proteger a célula de condições adversas como mudanças bruscas de temperaturas, mudança da atividade de água, estresse osmótico, exposição a elevadas concentrações de solutos, efeito danoso direto de alguns solventes orgânicos, metais pesados e agentes químicos tóxicos como as micotoxinas. Os mecanismos de defesa da levedura podem ser ativados por dois sistemas de resposta distintos, os intrínsecos, de característica constitucional da própria célula e aqueles que são induzíveis por uma condição de estresse, podendo ser diagnosticados como metabolomas característicos do estresse (DICKINSON; SCHWEIZER, 2004).

Nos processos de produção de alimentos pelo cultivo com *S. cerevisiae* é de grande importância o controle em nível molecular das mudanças ocorridas na célula (ITO et al., 1999). Testes têm avaliado inclusive cepas com maior sensibilidade aos tricotecenos e em especial ao DON, indicando que estas leveduras podem ser indicadores de bioensaios através de biomarcadores (ADOLMAALI et al., 2009).

Estudos envolvendo a *S. cerevisiae* mostraram que sob estresse térmico (calor) as principais proteínas do grupo HSP produzidas foram Hsp70, Hsp90, Hsp104 e Hsp26. Estes biomarcadores podem também ser associados a outras condições de estresse celular. Os danos as células da levedura mais mencionados na literatura são estresse osmótico, congelamento e o estresse oxidativo, sendo este último promovido principalmente por oxigênio singleto, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (DICKINSON; SHWEIZER, 2004).

Em nível microbiano, DON e outros tricotecenos, podem ter sua estrutura química alterada por bactérias ou fungos, pois o sistema enzimático utiliza essa estrutura como uma fonte de carbono (SUDAKIN, 2003). Da mesma forma que em organismos multicelulares, o efeito tóxico do DON pode apresentar alterações na síntese proteica, uma vez que em estudo desenvolvido por Garda e colaboradores (2010) em processo fermentativo utilizando células eucarióticas unicelulares expostas a DON, foi verificado aumento da atividade de enzima

oxidativa, a peroxidase. Em estudo descrito por Flores (2013) um aumento da proteína de massa molecular de 43 kDa foi observado.

Dessa forma, marcadores biológicos são utilizados na identificação de micotoxinas, mesmo que durante o processo de fermentação. A degradação da micotoxina foi de 98%, ressaltando que a etapa de mosturação e fermentação alcoólica são caracterizadas pela redução do nível micotoxicológico. Essa descontaminação pode ser resultado de um mecanismo de defesa da própria levedura, pela presença da micotoxina, acarretando em uma maior atividade enzimática da peroxidase nas primeiras 24 h, ou seja, aproximadamente duas vezes maior na presença de DON (SCHWINN; LAROQUE; MONTEIRO, 2011).

No entanto, é de extrema importância salientar que a enzima peroxidase tem se destacado quando relacionada a micotoxina DON, sendo descrita por diversos pesquisadores por apresentar alteração do perfil de ação, podendo esta ser utilizada como indicativo de contaminação, ou seja, um marcador molecular, em virtude de ser uma análise rápida, simples e de baixo custo quando comparada com outras técnicas, como a cromatografia a gás e líquida e acoplada a espectrômetro de massas.

Como a detecção de DON é um processo lento que requer equipamentos de alto custo e operacionalidade complexa, estes biomarcadores podem ser utilizados para avaliar a incidência e o grau de contaminação *in loco*, durante a pré e pós-colheita, permitindo verificar o risco e a contaminação por toxinas fúngicas com menores custos e identificação de sua ocorrência ainda no meio ambiente. Desta forma, estes marcadores biológicos podem representar uma valiosa ferramenta na identificação da presença de micotoxinas (GRIFFITHS et al., 2002).

A produção de biomarcadores para DON por *S. cerevisiae* durante cultivo submerso determinou alterações tanto na cinética de cultivo como na caracterização da síntese proteica por eletroforese, o que possibilitou determinar duas faixas de diferenciação quanto à expressão proteica intracelular em 47 h de cultivo, onde na faixa de massa molecular de 43 kDa foi 2 vezes maior do que o conteúdo proteico detectado quando relacionado ao grupo controle e que na faixa de 22 kDa ocorreu uma expressão 30% maior em relação ao grupo controle (FLORES, 2013).

A maioria das doenças humanas apresenta padrões reveladores, ou seja, biomarcadores moleculares que podem estar relacionados às milhares de proteínas presentes em fluidos celulares. Portanto, estudos enfatizam a comparações entre células saudáveis e células afetadas por condições desfavoráveis (KARP, 2010). Sendo assim, a evolução dos estudos de biomarcadores poderia proporcionar que, com apenas um único teste seja

determinada a presença ou não de condições de estresse celular e até mesmo qual a substância promotora de tal manifestação, mas isto não somente em humanos e animais, mas sim em processos biotecnológicos detacados pela aplicação industrial alimentícia e química.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Material

5.1.1 Micro-organismos

O micro-organismo utilizado para o processo fermentativo em cultivo submerso foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, produzida pela empresa Lesaffre Group, importada da Bélgica e destinada ao processo cervejeiro. Dois tipos de leveduras provenientes de culturas puras e desidratadas de cepas selecionadas foram adquiridos, Safale us-05 e Saflager W-34/70. A Safale us-05 é uma levedura de alta fermentação e a Saflager W-34/70 é considerada levedura de baixa fermentação, ambas com dosagem indicada de 0,4 g.L⁻¹.

5.1.2 Padrão de deoxinivalenol (DON)

O padrão de DON foi adquirido da Sigma Chemical Company (E.U.A.). Para o preparo da solução estoque de DON, a toxina foi dissolvida em benzeno: acetonitrila (95:5) para resultar em uma concentração de 100 µg.mL⁻¹. A solução de trabalho constituiu na diluição da solução estoque para a concentração de 50 µg.mL⁻¹. A determinação da concentração da solução foi realizada pela relação p/v e pelo procedimento descrito por Bennett e Shotwell (1990) e Krska (2007), utilizando a absorvidade molar do padrão de 6805 em acetonitrila a 219 nm.

5.2 Estratégia de avaliação do cultivo submerso

5.2.1 Preparo do inóculo

As leveduras testadas foram assepticamente transferidas para fermentadores tipo erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL do meio de cultura e incubadas em agitador rotatório a 200 rpm durante 10 min. O meio de cultura utilizado foi o YPD (Yeast Peptona Dextrose) contendo 1% de extrato de levedura, 2% de glicose e 2% de peptona, preparado em água destilada e esterilizado previamente em autoclave a 121 °C por 15 min.

5.2.2 Condições experimentais avaliadas

Para a avaliação do efeito da micotoxina no cultivo submerso de *Saccharomyces cerevisiae* foi realizada adicionando 150 µg de DON ao biorreator. O solvente da solução foi evaporado sob corrente de nitrogênio através de sistema com filtro de membrana de 0,23 µm na temperatura de 20 °C previamente a adição do meio estéril, resultando em uma concentração final de 1 µg.mL⁻¹. Após a adição do meio YPD, o sistema foi agitado em banho ultrassônico durante 3 min.

Para caracterizar a síntese diferenciada de metabolomas sintetizados pelas duas cepas de *S. cerevisiae* as condições do cultivo estudadas foram, variando o tipo de cultivo, sob agitação orbital a 200 rpm e sem agitação em câmara termostatizada realizados a 26 °C, as concentrações de inóculo (2; 6,6 e 10%), e a adaptação do inóculo durante 24 h para caracterizar a síntese diferenciada de metabolomas na presença da micotoxina e ausência da micotoxina para as duas cepas de *S.cerevisiae*.

O cultivo submerso foi realizado em triplicata em biorreatores tipo erlenmeyer com volume útil de 250 mL contendo 150 mL de meio YPD estéril com pH inicial de 6,2. As condições operacionais do processo foram temperatura de 26 °C, agitação de 200 rpm e tempo de cultivo de 96 h, com amostras retiradas a cada 24 h. Em todos os experimentos, o inóculo foi adicionado diretamente ao biorreator contendo o meio de cultivo (controle) e no meio de cultivo contendo a micotoxina DON (tratamento).

5.3 Metodologias analíticas

Em todos os experimentos, foram investigada a presença de biomarcadores por meio da avaliação do perfil intra e extracelular protéico; variação de produção de pH, biomassa (g.L⁻¹) atividade enzimática de protease e peroxidase, viabilidade celular (células.mL⁻¹), produção de glutathiona (GSH) e açúcares redutores totais.

5.3.1 Concentração celular (biomassa)

Para estimar a concentração celular (mg.mL⁻¹) foi empregada uma curva padrão, contendo a levedura cultivada nas mesmas condições de preparo do inóculo. Após 24 h de incubação parte do meio foi centrifugado (4000 rpm por 15 min) e o sobrenadante descartado.

A massa celular foi lavada com água destilada, seca em estufa (60 °C) até massa constante. No restante do meio fermentado foram realizadas diferentes diluições com água destilada e em cada uma destas, determinada a absorvância. Com base no resultado de massa celular seca relacionado ao volume utilizado, foi determinada a concentração celular para cada diluição. A partir destes dados foi plotado o gráfico da concentração celular e absorvância resultando na estimativa do coeficiente angular e linear da equação para estimativa da concentração celular (mg.mL^{-1}) ao longo dos experimentos.

A biomassa foi determinada pela leitura de absorvância do cultivo medida a 600 nm (espectrofotômetro Varian), diluindo a amostra quando necessário. O sobrenadante foi recolhido após a centrifugação da amostra e utilizado como branco para eliminar algum interferente do meio de cultivo.

A partir da curva de crescimento celular foram avaliados a concentração máxima de biomassa (X_{max} , g.L^{-1}), a velocidade específica de crescimento (μ) e também a produtividade máxima ($\text{g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) estimada pela equação $P = (X_{\text{max}})/t$, onde X_{max} é a biomassa máxima no respectivo tempo t (h).

5.3.2 Determinação de pH

O pH da alíquota coletada foi determinado potenciométricamente em pHmetro (Lutron), calibrado com solução tampão pH 4 e 7, de acordo com a AOAC (2000).

5.3.3 Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi determinada pelo método descrito por Miller (1959), empregando a reação colorimétrica com 3,5-dinitrosalisílico para açúcares redutores, com leitura de absorvância a 546 nm empregando curva padrão de glicose.

5.3.4 Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada através da técnica de exclusão por azul de Trypan. Uma solução azul de Trypan 0,1% na proporção 1:1 foi adicionada ao meio de cultivo, seguida da medida da concentração de células estimada por enumeração em câmara de Neubauer (FRESHNEY, 1987).

5.3.5 Determinação da concentração de glutathiona (GSH)

A concentração de glutathiona foi determinada de acordo com o método de Owens e Belcher (1965). O meio fermentado foi centrifugado e o sobrenadante separado das células. Uma solução de etanol 40% (v/v) foi adicionada às células para extração por 2 h a 30 °C. Em 0,5 mL de amostra foram adicionados 1,5 mL de tampão fosfato de potássio (0,5 M; pH 8,0) e 0,03 mL de DTNB (5,5`-dithiobis-2-nitrobenzoic acid). Após 3 min de reação foi feita a leitura em espectrofotômetro a 412 nm. Para o branco da reação foi utilizada a solução de etanol 40% (v/v). A concentração de GSH foi calculada por meio de uma curva padrão, sendo utilizada L-glutathiona reduzida. Os resultados obtidos foram expressos em mg.L⁻¹.

A solução de GSH foi preparada dissolvendo 0,01 g em HCl 0,01 M (resfriado) até o volume de 100 mL e mantida congelada. Para o preparo da solução de DTNB, 0,396 g deste reagente e 0,15 g de NaHCO₃ foram dissolvidos em tampão fosfato de sódio (0,1 M, pH 7,0). O volume foi ajustado para 100 mL e a solução mantida congelada até o momento do uso.

5.3.6 Extração e quantificação proteica

As proteínas intracelulares foram extraídas da massa de células de *Saccharomyces cerevisiae* segundo metodologia descrita por Flores (2013) onde as células de levedura foram obtidas após centrifugação do meio de cultivo a 905,4 x g a 4 °C por 10 min. A extração das proteicas intracelulares foi realizada com agitação mecânica (vórtex), utilizando abrasão por pérolas de vidro (2 g), juntamente com a solução salina 0,9% (2 mL) para a ruptura celular. Após, o extrato foi centrifugado a 905,4 x g a 4 °C por 10 min. O sobrenadante foi utilizado a caracterização do perfil proteico para os experimentos controle e tratamento.

A determinação de proteínas solúveis seguiu o procedimento para amostras líquidas utilizando fenol de Folin em meio alcalino durante 30 min de acordo com o método adaptado de Lowry (1951). As absorvâncias foram medidas a 660 nm (espectrofotômetro Varian). A avaliação da concentração das proteínas foi determinada diretamente nos meios fermentados quantificando proteína solúvel total.

5.3.7 Perfil de alcoóis

A quantificação de alcoóis foi realizada em cromatógrafo a gás (Varian 3400) equipado com injetor *split/splitless* e detector de ionização de chama, coluna DB-5 (J&W Scientific - EUA) de 30 m, com 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme 75% - fenil metilpolisiloxano. O equipamento foi monitorado pelo software Star Chromatography Workstation (versão 4.1, Varian).

As condições utilizadas foram: temperatura do injetor 250 °C, abertura da válvula a 0,75 min, fluxo de limpeza do injetor de 75 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, detector 300 °C, atenuação de 8×10^{11} . A programação para a coluna cromatográfica foi de 40 °C durante 1 min aumentando 10 °C $\cdot\text{min}^{-1}$ até 140 °C, permanecendo 5 min, completando 13,55 min de corrida cromatográfica. O etanol foi quantificado por curva padrão (1 a 6%), de acordo com Garda (2002).

5.3.8 Caracterização das atividades enzimáticas

5.3.8.1 Peroxidase (PO)

A atividade da PO foi determinada empregando 1 mL de meio fermentado, com 1,5 mL de tampão fosfato 5 mM pH 6,0 e 2 mL de água destilada sobre 0,5 mL do substrato guaiacol, na concentração de 1%, e 1 mL de peróxido de hidrogênio a 0,08%. A mistura foi incubada durante 30 min a temperatura de 30 °C e a absorvância dos compostos oxidados determinadas a 470 nm (espectrofotômetro Varian) (GARDA-BUFFON; KUPSKI; FURLONG, 2011).

Uma unidade de atividade específica da enzima PO foi definida como a massa de proteína capaz de causar um aumento da unidade de absorvância em 0,001 por minuto por mg de proteína (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010).

5.3.8.2 Proteases

Para a atividade da enzima, primeiramente o extrato enzimático (1 mL) foi adicionado e realizada a hidrólise enzimática com 2,5 mL do substrato albumina 0,5% (p/v) em banho-maria a 47 °C por 20 min. A reação foi interrompida com adição de 5 mL de ácido acético (TCA) 10% (p/v). No tempo zero, o TCA foi adicionado antes do substrato. Ao

término da reação, os aminoácidos liberados foram determinados com 3 mL do sobrenadante em 6 mL de NaOH 1M e 1 mL do reagente Folin-Ciocalteu 2M (diluição 1:2 com água destilada) sendo a absorvância do complexo medida após 10 min em espectrofotômetro a 660 nm. A atividade enzimática específica do extrato foi definida como a quantidade de tirosina liberada por minuto por miligrama de proteína, calculado por meio de uma curva padrão de tirosina (DORS, 2013).

5.3.9 Caracterização proteica

A metodologia utilizada para a detecção e quantificação dos biomarcadores emprega a avaliação da determinação de enzimas e de proteínas intracelulares por eletroforese, seguido por caracterização dos biomarcadores foi realizado após extração e purificação.

Primeiramente, as proteínas das alíquotas de amostras foram concentradas por precipitação utilizando acetona na proporção (1:3) mantidas a -18 °C por 24 h. Em seguida ocorreu a centrifugação e a adição de 30 µL de tampão de desnaturação ao precipitado e uma gota de glicerol. As proteínas foram desnaturadas por aquecimento a 100 °C por 7 min.

A eletroforese SDS-PAGE representa a caracterização proteica intracelular produzida, pois propicia a separação proteica utilizando inicialmente gel de separação e concentração na proporção indicada nas Tabelas 1 e 2, em placas de 1 mm de espessura montada conforme determinação do fabricante.

Tabela 1 - Composição do gel de separação para eletroforese utilizando placa de 1 mm.

Componentes	Volume (mL)
Acrilamida	1,875
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	1,25
Água Mili-Q	1,8
Sonificar por 15 min	
SDS 10%	0,150
Persulfato de Amônio 10%	0,050
Temed	0,006

Tabela 2 - Composição de gel de concentração para eletroforese utilizando placa de 1 mm.

Componentes	Volume (mL)
Acrilamida	0,625
Tris-HCl 1,5 M pH 6,8	1,25
Água Mili-Q	2,75
Sonificar por 15 min	
SDS 10%	0,050
Persulfato de Amônio 10%	0,020
Temed	0,010

A aplicação das amostras no gel de eletroforese foi a partir de 10 μ L de amostra juntamente com o marcador molecular injetados nas bandas da corrida. As condições de corrida foram otimizadas a partir das condições iniciais de 300 V, 30 mA e potência menor que 94 W totalizando um tempo de corrida de 150 min. A fonte utilizada foi da marca GSR modelo 300STD com alimentação por estabilizador de corrente da marca SMS, que foi acoplada em cuba vertical para placa de marca DIGEL.

Para identificação da faixa de massa molecular foi utilizado marcador molecular da marca AMRESCO 20-100 kDa, aplicados 10 μ L em cada placa de eletroforese, apresentando 10 bandas de resolução (20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 kDa). A revelação do gel ocorreu por uma solução corante mantida sob agitação por 15 min. O gel foi removido e submerso em solução descorante sob agitação até equilíbrio de concentração do corante entre o gel e solução, renovando a solução descorante até que o gel apresentasse revelação adequada para visualização das manchas do marcador de massa molecular. Por fim, os dados foram obtidos por fotografia em transiluminador acoplado a sistema de fotodocumentação para o tratamento das imagens.

5.3.10 Determinação de DON

A extração de DON no meio de cultivo (50 mL) foi realizada a partir de três partições líquido-líquido com hexano (1:3) para retirada de interferentes e após com clorofórmio para extração da micotoxina. A fase orgânica contendo DON foi seca a 60 °C sob N₂ (GARDA et al., 2005). A quantificação residual da micotoxina no meio de cultivo foi

realizada dissolvendo o resíduo em acetonitrila para a quantificação por CLAE-UV e confirmado por LC-ESI-MS/MS.

5.4 Análise estatística e cálculo de fatores de conversão

Os resultados das determinações foram submetidos a análise de variância (ANOVA) a um nível de significância de 5% ($p < 0,05$). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey.

Os fatores de conversão $Y_{P/S}$ (substrato em produto), $Y_{X/S}$ (substrato em biomassa) e $Y_{P/X}$ (biomassa em produto) foram estimados empregando as Equações 1, 2 e 3 respectivamente.

$$Y_{P/S} = \frac{P - P_0}{S_0 - S} \quad (1)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (2)$$

$$Y_{P/X} = \frac{P - P_0}{X_0 - X} \quad (3)$$

Onde: P = produto; S = substrato, no caso, glicose; X = biomassa.

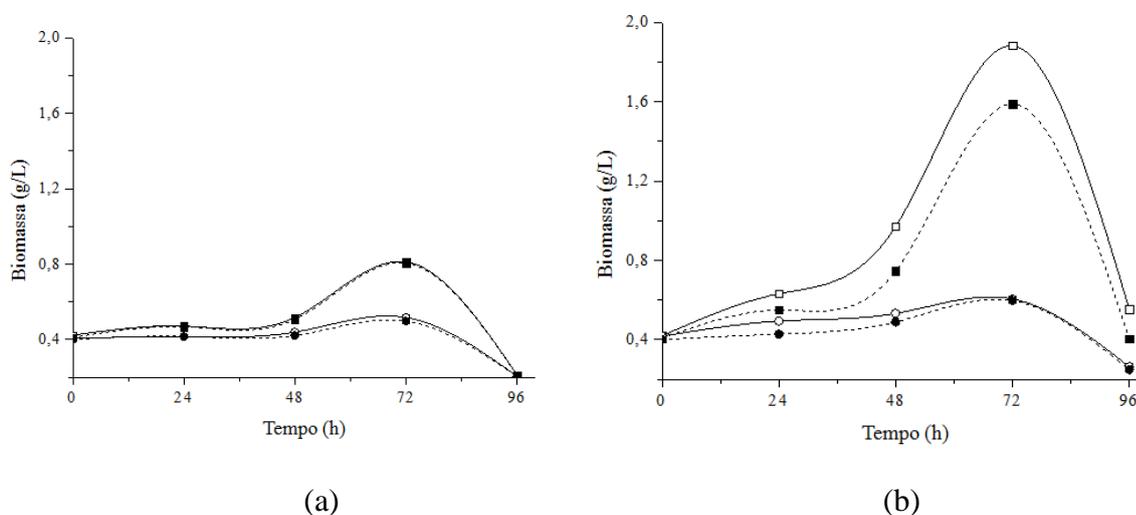
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Avaliação dos parâmetros de cultivo

6.1.1 Influência das cepas de *S. cerevisiae* estudadas

As curvas de crescimento das leveduras *S. cerevisiae* de alta e baixa fermentação em cultivo em agitação orbital e sem agitação em câmara termostatzada, mantidos por 96 h de fermentação, na ausência (controle) e presença de DON (tratamento) podem ser visualizadas na Figura 5.

Figura 5 - Curvas de crescimento celular dos cultivos com *Saccharomyces cerevisiae* de (a) baixa fermentação e (b) alta fermentação. Cultivo: Sem agitação (- □- controle; - ■ - tratamento); com agitação (- ○- controle; - ● - Tratamento).

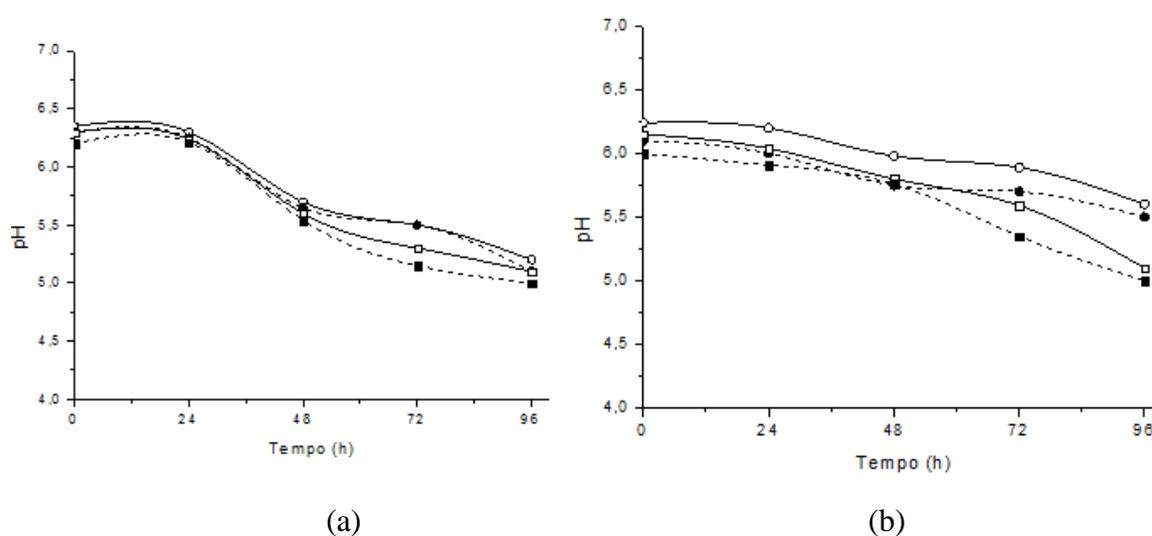


O crescimento atinge a fase estacionária e declíneo a partir de 72 h de cultivo, sendo obtidos os valores máximos de biomassa nesse tempo, em ambos os ensaios, utilizando levedura de baixa e alta fermentação quando cultivado principalmente em cultivos sem agitação. Portanto a levedura de baixa fermentação apresenta valores de $0,812 \text{ g.L}^{-1}$, enquanto que para a levedura de alta fermentação corresponde a $1,882 \text{ g.L}^{-1}$, 2,3 vezes maior. Em cultivo com agitação, a fase estacionária inicia em 24 h para a levedura de alta fermentação, mas com um declíneo também observado em 72 h. A produtividade celular máxima foi

observada ao utilizar a levedura de alta fermentação cultivada em câmara termostatazada em 72 h de fermentação, com valor de $26 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$. Quando avaliado o efeito da micotoxina DON na concentração celular de *S. cerevisiae*, observa-se diferença entre o experimento controle e tratamento somente quando a levedura foi cultivada no modo anaeróbico e com levedura de alta fermentação (Figura 5 b). Este efeito pode ser observado em 24 até 72 h, sendo em média a concentração celular 15 % menor quando na presença da micotoxina.

Ao longo do cultivo, o aumento da biomassa coincide com a diminuição do pH como mostra a Figura 6, comportamento que pode estar associado à produção de ácidos orgânicos como ácido cítrico, acético e pirúvico como subprodutos da fermentação alcoólica (LEVINSON et al., 2007; PAPANIKOLAOU et al., 2008).

Figura 6 - Valores de pH dos cultivos com *Saccharomyces cerevisiae* de (a) baixa fermentação e (b) alta fermentação. Cultivo: Sem agitação (- □- controle; - ■ - tratamento); com agitação (- ○- controle; - ● - Tratamento)



Comparando os comportamentos em relação a variação de pH (Figuras 5 e 6) ao longo de 96 h de fermentação, ocorre uma tendência ao decréscimo acompanhado pela multiplicação celular. Em contrapartida, entre 72 e 96 h a concentração de biomassa reduz coincidentemente a pequena variação de pH o que pode ser atribuído ao consumo total do substrato. Quando comparado os valores de pH dos cultivos controle em relação ao tratamento percebe-se uma maior redução do pH, ocasionado pela presença da micotoxina DON no meio e também ao longo do cultivo. Esta característica é esperada em decorrência da fermentação alcoólica, uma vez que pode indicar uma alteração na velocidade das reações de glicólise, ou pela formação de sistemas tampão que interferem com a redução do pH.

Para melhor definir o tipo de levedura para as etapas posteriores do estudo avaliou-se as concentrações de proteína extracelular (Tabela 3) e do substrato (Tabela 4) ao longo do cultivo.

Tabela 3 - Valores de proteína extracelular durante 96 h em cultivo submerso com *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).

Tempo (h)	Fermentação							
	Alta				Baixa			
	Sem agitação		Com agitação		Sem agitação		Com agitação	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	29,14 ^{A,a}	29,12 ^{A,a}	29,20 ^{A,a}	29,17 ^{A,a}	24,79 ^{A,b}	24,80 ^{A,b}	24,83 ^{A,b}	24,80 ^{A,b}
24	23,98 ^{B,b}	23,69 ^{B,b}	18,59 ^{B,c}	18,01 ^{B,c}	24,65 ^{B,a}	24,60 ^{B,a}	24,41 ^{B,a}	24,39 ^{B,a}
48	22,60 ^{C,b}	22,19 ^{C,b}	18,44 ^{B,d}	17,98 ^{B,d}	24,56 ^{B,a}	24,48 ^{B,a}	20,89 ^{C,c}	20,70 ^{C,c}
72	21,51 ^{D,c}	20,43 ^{D,d}	17,57 ^{C,f}	15,49 ^{C,f}	24,24 ^{B,a}	23,91 ^{C,b}	17,95 ^{D,e}	17,92 ^{D,e}
96	19,77 ^{E,b}	19,40 ^{E,b}	17,49 ^{C,d}	15,07 ^{C,c}	23,45 ^{C,a}	23,21 ^{D,a}	17,45 ^{E,d}	17,40 ^{E,d}

Letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para caracterizar tratamento ao longo do tempo e letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar os tratamento e tipo de cultivo onde não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Valores de substrato (glicose) durante 96 h em cultivo submerso com *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).

Tempo (h)	Fermentação							
	Alta				Baixa			
	Sem agitação		Com agitação		Sem agitação		Com agitação	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	28,52 ^{A,a}	28,27 ^{A,a}	28,54 ^{A,a}	28,45 ^{A,a}	21,61 ^{A,c}	21,57 ^{A,c}	22,17 ^{A,b}	22,01 ^{A,b}
24	2,77 ^{B,d}	1,87 ^{B,d}	4,34 ^{B,b}	4,17 ^{B,b}	3,71 ^{B,c}	3,69 ^{B,c}	6,22 ^{B,a}	6,07 ^{B,a}
48	2,19 ^{C,e}	1,79 ^{C,f}	3,84 ^{C,b}	2,85 ^{C,d}	3,18 ^{C,c}	3,08 ^{C,c}	5,67 ^{C,a}	5,32 ^{C,a}
72	1,39 ^{D,e}	1,37 ^{D,e}	2,40 ^{D,c}	2,38 ^{D,c}	2,96 ^{D,b}	2,32 ^{D,d}	5,32 ^{D,a}	5,21 ^{D,a}
96	1,31 ^{D,f}	1,30 ^{D,f}	2,35 ^{D,c}	2,19 ^{E,d}	1,51 ^{E,e}	1,49 ^{E,e}	2,61 ^{E,a}	2,46 ^{E,b}

Letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para caracterizar tratamento ao longo do tempo e letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar os tratamento e tipo de cultivo onde não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Foi relacionada a biomassa das leveduras em estudo com a concentração de proteína extracelular e o consumo de substrato ao longo de 72 h, sendo verificada diferença significativa entre as médias das três respostas nas condições dos ensaios com as leveduras de

alta e baixa fermentação. O efeito da redução do teor proteico para os cultivos na presença da micotoxina DON, foi observado principalmente para a levedura de alta fermentação, que pode ser atribuído a presença de DON na inibição da síntese proteica. Em cultivo sem agitação este efeito também foi observado quando utilizado levedura de baixa fermentação, ele pode ter propiciado a diferenciação de metabolismo com maior multiplicação celular e produção de metabolitos, com consequente aumento de estresse oxidativo. Portanto, a levedura de alta fermentação apresentou perfil diferenciado na presença da micotoxina, independente do modo de cultivo.

Alguns autores propõem que os danos em nível bioquímico decorrem da inibição da síntese protéica, de DNA e RNA impedindo a união de subunidades ribossomal 60S, onde atuam um sobre o outro com enzimas peptidiltransferase. Esta interação conduz a diferentes variações da inibição da formação da ligação peptídica. O grupo epóxido C_{12,13} de DON é responsável pela inibição da síntese protéica. Certas substituições do anel na posição C₃ e C₄ originam outros efeitos adicionais. DON ainda é dado como inibidor do início da síntese protéica, como também nas etapas de alongação e terminação da cadeia (SUDAKIN, 2003).

Na célula eucariótica, a síntese de polipeptídios começa com um resíduo de metionina, doado por um transportador especial metionil-tRNA, local onde ocorre a inibição pelo DON ou falha de poliribossomos, que inibe a formação da ligação peptídica com a metionina iniciadora da cadeia proteica ou dos três aminoácidos finais da cadeia (KIESSLING, 1986). Os efeitos de DON em nível celular em sistema *in vivo* e *in vitro*, reforçaram a idéia de que, *in vitro*, o DON influencia fortemente a expressão gênica, mas não foram comprovadas as alterações nos processos que envolvem a iniciação da translação de mRNA. *In vivo* também não foi comprovado evento molecular.

Estudos também demonstraram que a exaustão de glicose do meio acarreta uma maior síntese de proteína, que pode exercer função protetora contra o estresse oxidativo, sendo a glicose uma das demandas primárias de consumo da levedura estudada (FRANCESCA et al., 2010). Sendo assim, no cultivo sem agitação utilizando levedura de alta fermentação, ocorre maior consumo foi registrado quando na presença da micotoxina, no entanto com menor produção proteica.

A presença da micotoxina pode gerar uma inibição da síntese proteica, podendo ocasionar alterações no metabolismo energético e consequentemente na multiplicação celular, pela inibição da manifestação do DNA. Isto tem como consequência, uma menor concentração celular e maior redução de pH decorrente da maior concentração de ácido

pirúvico e outros ácidos próprios da fermentação, o que resulta em menor concentração de substrato no final do processo.

Outro fator a ser observado em relação à biomassa da levedura é a quantidade de células não viáveis presentes no meio de cultivo como pode ser verificado na Tabela 5.

Tabela 5 – Número de células não viáveis dos cultivos anaeróbio e aeróbio com *Saccharomyces cerevisiae* de alta e baixa fermentação.

Tempo (h)	Número de células não viáveis (%)							
	Alta Fermentação				Baixa Fermentação			
	Controle		Tratamento		Controle		Tratamento	
	Com agitação	Sem agitação	Com agitação	Sem agitação	Com agitação	Sem agitação	Com agitação	Sem agitação
0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	1,2	0	2,2	0	1,4	0	2	0,6
48	1,5	0	2,3	2,3	1,5	0,8	3	0,8
72	1,8	1,2	2,5	2,5	2,6	0,1	6,2	0,9
96	2	1,4	6,5	3,2	7,3	8,5	8	1

Avaliando o número de células não viáveis ao longo do cultivo, os experimentos com a presença da micotoxina resultaram em maior porcentual entre 24 e 72 h de fermentação. A levedura de alta fermentação apresentou maior susceptibilidade ao tratamento isto para o cultivo anaeróbio em 48 h e aeróbio em 96 h com um aumento de 2,3 e 4,5% no número de células não viáveis, respectivamente. Após 72 h de cultivo, o efeito observado pode ser decorrente da fase de declínio quando relacionado ao crescimento celular.

A levedura *S. cerevisiae* de alta fermentação foi a que melhor respondeu as condições estudadas durante 72 h de fermentação, resultando em perfil diferenciado na presença da micotoxina DON.

6.1.2 Efeito do tipo de cultivo sobre a formação de metabólitos da *S.cerevisiae* de alta fermentação

Após definir qual espécie que apresenta as melhores condições para demonstrar a presença de DON, é de grande importância ajustar as condições para aplicar como organismo indicador em bioensaios, sendo assim foi confirmado a sensibilidade da levedura *S. cerevisiae* de alta fermentação, onde na Tabela 6 apresenta o acompanhamento do cultivo em agitação

orbital e câmara termostatzada com a fortificação do meio com a toxina Deoxinivalenol (DON) ($1\mu\text{g.mL}^{-1}$) por 96 h de fermentação.

Tabela 6 – Concentração celular para o cultivo submerso de *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação na ausência (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).

Tempo (h)	Concentração celular (g.L^{-1})			
	Cultivo sem agitação		Cultivo com agitação	
	Controle	Tratamento	Controle	Tratamento
0	0,447 ^{D,a}	0,445 ^{D,a}	0,401 ^{E,c}	0,431 ^{C,b}
24	0,649 ^{C,a}	0,431 ^{C,b}	0,428 ^{D,c}	0,434 ^{C,b}
48	1,584 ^{B,a}	0,868 ^{B,b}	0,493 ^{B,c}	0,489 ^{B,c}
72	1,695 ^{A,a}	1,188 ^{A,b}	0,621 ^{A,c}	0,515 ^{A,d}
96	0,305 ^{E,b}	0,261 ^{E,c}	0,440 ^{C,a}	0,264 ^{D,c}

Letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar resultados ao longo do tempo e letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar o tipo de cultivo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Em 72 h de fermentação foi observada máxima concentração de biomassa nos cultivos, sendo o cultivo sem agitação com um crescimento celular máximo de $1,695 \text{ g.L}^{-1}$ para o controle e $1,188 \text{ g.L}^{-1}$ para o tratamento e nos cultivos em agitação orbital $0,621 \text{ g.L}^{-1}$ e $0,515 \text{ g.L}^{-1}$, respectivamente. A produtividade celular nas condições citadas anteriormente foi de $23,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ no experimento controle e de $16,5 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ na presença da micotoxina.

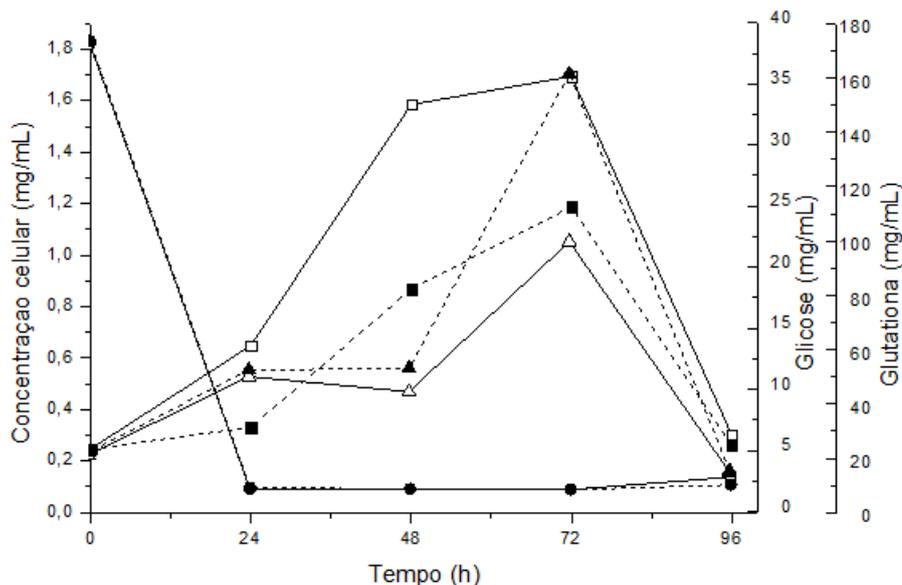
Portanto, o crescimento da levedura foi alterado na presença da micotoxina, especialmente em cultivo sem agitação. A redução do crescimento celular da levedura de alta fermentação na presença da micotoxina em cultivo anaeróbio em 72 h de cultivo foi de 30% quando comparado ao grupo controle (Tabela 6).

Um estudo semelhante envolvendo a levedura *S. cerevisiae* em meio contaminado com a micotoxina ($5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentou uma redução de 50% quando comparado ao grupo controle, avaliando a capacidade deste micro-organismo poder ser considerado um indicativo da presença de DON (ADOLMAALI et al., 2009).

A fase de desaceleração, devido ao esgotamento do substrato foi observada após 72 h de cultivo para os tratamentos com uma redução da velocidade de crescimento celular (μ) de $0,037 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ para o estudo controle e de $0,026 \text{ (h}^{-1}\text{)}$ em presença da micotoxina.

A avaliação da concentração celular de *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação sob cultivo sem agitação relacionada a concentração de GSH e de glicose está apresentada na Figura 7.

Figura 7 – Valores de glutathiona, concentração celular e consumo de glicose durante 96 h de fermentação em cultivo sem agitação com *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação. Concentração celular (-□- Controle; -■- Tratamento); Glicose (-○- Controle; -●- Tratamento); Glutathiona (-△-Controle; -▲- Tratamento).



Na Figura 7 pode-se verificar que a glicose foi consumida pela levedura nas primeiras 24 h de fermentação. O pH do estudo variou ao longo da fermentação, de 6,6 a 4,1, podendo estar relacionada a lise de células sem viabilidade. Em relação ao comportamento da levedura na presença de DON, a concentração celular foi menor, mas ambos, controle e tratamento apresentaram maior concentração em 72 h de fermentação, conforme observado nos testes anteriores.

A concentração de GSH variou de 22 a 162 mg.mL⁻¹ para a levedura no experimento com tratamento e de 21 a 100 mg.mL⁻¹ para o controle, com o máximo valor obtido em 72 h de fermentação (p=0,0001). Isso pode ter ocorrido devido ao estresse causado pela presença da micotoxina que pode causar um aumento no consumo de energia nas leveduras, que induz a mudanças no metabolismo e ao acúmulo de algumas moléculas protetoras, como a glutathiona (DONG et al., 2007).

A Tabela 7 apresenta os dados de produção de etanol ao longo do estudo e na presença da micotoxina, sendo assim, estudos relatam que a produção de GSH é dependente do tempo de produção de etanol, ou seja, não ocorre aumento nas concentrações de GSH após

acabar o etanol do meio. Além disso, a concentração de etanol no meio em estudo apresenta grande efeito na concentração de GSH, sendo que em altas concentrações inibem o crescimento celular e conseqüentemente baixos níveis de etanol (SAKATO; TANAKA, 1992; WEN; ZHANG; TAN, 2006).

Tabela 7 - Produção de etanol obtido durante o cultivo submerso com a *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação na ausência (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).

Tempo (h)	Produção de etanol (%)	
	Controle	Tratamento
0	0	0
24	1,63	2,15
48	1,69	2,75
72	2,15	3,13
96	1,5	1,68

Para melhor avaliar os parâmetros em estudo, a Tabela 8 apresenta os fatores de conversão de substrato em biomassa ($Y_{X/S}$), substrato em produto ($Y_{P/S}$) e biomassa em produto ($Y_{P/X}$), obtidos durante o cultivo, podendo ser calculados através das equações 1 a 3.

Tabela 8 – Fatores de conversão obtidos durante o cultivo de *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).

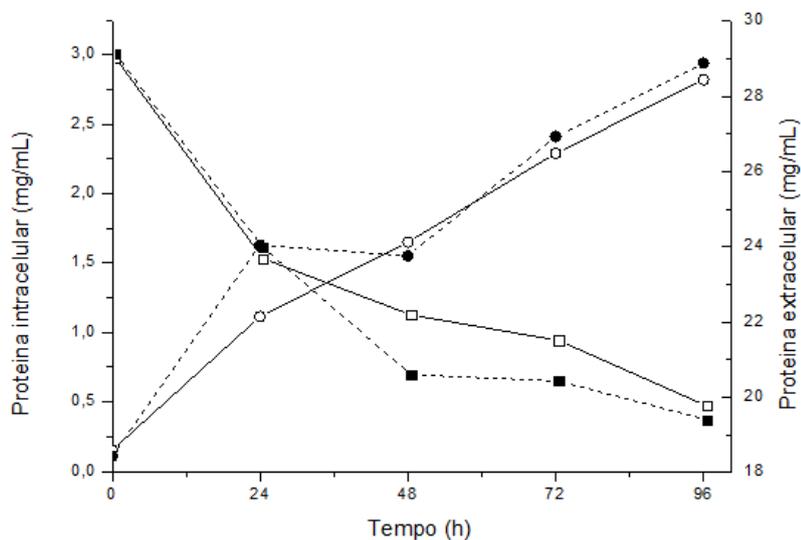
Experimento	$Y_{P/S}$ (mg etanol/g glicose)	$Y_{X/S}$ (mg cél/g glicose)	$Y_{P/X}$ (mg GSH/mg cél)
Controle	0,6	1,42	127,2
Tratamento	0,9	0,55	334

A maior concentração de GSH foi verificada durante o cultivo no ensaio com a presença da micotoxina, isso se deve ao fato de que a glutathiona é uma importante molécula de defesa do organismo (ROLLINI; MANZONI, 2006). Portanto, na avaliação do efeito da micotoxina, a maior conversão observada foi de célula em produto (334 mg GSH/ mg cél), além de glicose em etanol em menor proporção. Quando a glicose é convertida em celular, o experimento controle apresenta a maior conversão, isso pode ser explicado, pela ausência de rotas do metabolismo secundário com fim de redução do estresse oxidativo celular, confirmada pela menor concentração celular quando comparado ao tratamento.

Pode-se avaliar também que quando ocorre uma maior produção de (GSH) ocorre maior produção de etanol, portanto, esses resultados estão de acordo com Sakato e Tanaka (1992), pois relataram que a produção de GSH é dependente do tempo de produção de etanol, pois não foi observado aumento nas concentrações de GSH após redução de etanol do meio.

Na Figura 8 está apresentado o acompanhamento do conteúdo de proteína intra e extracelular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* no cultivo submerso.

Figura 8 - Conteúdo de proteínas intra e extracelular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação durante cultivo submerso anaeróbico. Proteína extracelular (-□- Controle; -■- Tratamento); proteína intracelular (-○- Controle; -●- Tratamento).

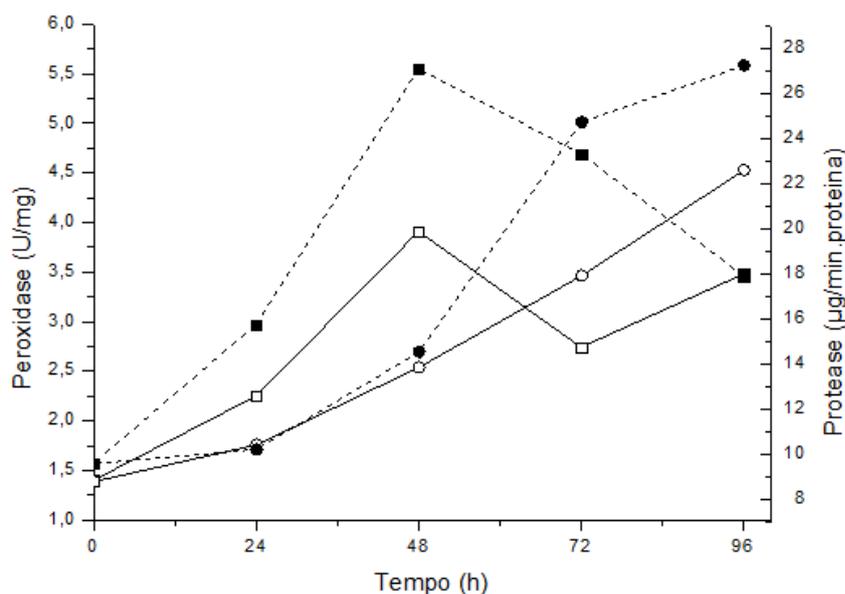


A concentração de proteínas extracelulares apresentou alteração no conteúdo total a partir de 48 h de cultivo, quando comparado com o experimento na presença da micotoxina, sendo observado uma diminuição da quantidade de proteína solúvel com diferença significativa ($p=0,002$), sendo o resultado da ação inibitória da síntese proteica (ZAIN, 2011). Esta pode ser uma resposta da célula da levedura em função da toxicidade do meio de cultivo ou mesmo na utilização da estrutura da micotoxina como fonte de nutriente (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010; DÖLLS et al., 2009).

O efeito da presença da micotoxina quanto ao conteúdo de proteína foi maior quando avaliado o teor de proteína intracelular nos tempos de cultivo entre 24 e 72 h. Estes resultados evidenciam a influência da micotoxina DON na fermentação alcoólica, possivelmente pela toxicidade da micotoxina relacionada com a inibição da síntese protéica e tentativa de detoxificação do meio, possivelmente pela síntese de enzimas relacionadas a estes mecanismos (SZUKUDELSKA; SZUKUDELSKI; NOGAWSKI, 2002).

Outro parâmetro a ser analisado durante o cultivo é o acompanhamento das atividades enzimáticas de peroxidase e protease avaliados nas mesmas condições experimentais e apresentado na Figura 9.

Figura 9– Perfil de atividade enzimática durante cultivo submerso anaeróbico com *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação. Peroxidase (-□- Controle; -■- Tratamento); protease (-○- Controle; -●- Tratamento).



O experimento na presença da micotoxina apresentou perfil diferenciado para a enzima peroxidase, obtendo maiores atividades específicas ($5,55 \text{ U.mg}^{-1}$ e $4,69 \text{ U.mg}^{-1}$) em 48 e 72 h de cultivo, onde apresenta maior atividade, 71%, quando relacionado ao controle no tempo de 72 h (Figura 9). Isso se deve a correlação direta entre a presença de DON, sua toxicidade, e o potencial das células da levedura de produzirem enzimas específicas com ação benéfica na manutenção da atividade metabólica do micro-organismo.

Esta alteração metabólica pode ser um indicativo de que a célula em 48 h de cultivo venha a desenvolver mecanismos de biodegradação de compostos oxidativos a levedura, podendo estar associados à degradação de DON, sendo esta uma via metabólica induzida pela presença da micotoxina durante o cultivo (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010), podendo ser constatado posteriormente através de análise protéica qualitativa por eletroforese (MEYER; SILVA, 1999).

Além disso, esta enzima oxidativa pode atuar na de-epoxidação do DON, uma vez que este grupo epóxido apresenta alta toxicidade, sendo foco de inibição da síntese proteica.

Outra atividade enzimática foi avaliada durante o cultivo submerso e pode-se perceber que a atividade específica da protease foi alterada na presença da micotoxina, ou seja, apresentaram diferença significativa ($p=0,001$) em 72 h, isso se deve á capacidade da lise protéica possivelmente decorrentes da fase de crescimento quando comparado ao controle.

6.1.3 Estudo do efeito de diferentes concentrações de inóculo no crescimento de *S. cerevisiae* de alta fermentação e na produção de metabólitos

Foram estudados diferentes concentrações de inóculo adicionadas ao meio de cultivo a citar 2; 6,6 e 10% pois em processos para produção de alimentos fermentados pela levedura *S. cerevisiae*, a adição do inóculo é dependente do produto final requerido, da empresa e da produção da cepa utilizada. Os resultados das concentrações celulares em função do inóculo estão na Tabela 9 que apresenta os valores relacionados ao tempo de cultivo.

Tabela 9 - Concentração celular (g.L^{-1}) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	0,091 ^{e,C}	0,404 ^{c,D}	1,296 ^{b,C}	1,634 ^{a,B}	0,292 ^{d,C}
	6,6	0,149 ^{e,B}	0,615 ^{c,C}	1,793 ^{b,B}	1,885 ^{a,A}	0,358 ^{d,A}
	10	0,181 ^{e,A}	0,791 ^{c,A}	2,043 ^{a,A}	1,898 ^{b,A}	0,338 ^{d,B}
Tratamento	2	0,095 ^{d,C}	0,338 ^{c,E}	0,762 ^{b,D}	1,588 ^{a,C}	0,331 ^{c,B}
	6,6	0,146 ^{d,B}	0,605 ^{b,C}	0,645 ^{b,E}	1,112 ^{a,D}	0,206 ^{c,D}
	10	0,185 ^{d,A}	0,639 ^{c,B}	0,777 ^{b,D}	1,052 ^{a,E}	0,156 ^{e,E}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar resultados ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar os tratamentos e a concentração de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

A maior concentração celular foi obtida nos experimentos controle onde com o adição de 10 % de inóculo, a levedura em estudo apresenta valor de $2,043 \text{ g.L}^{-1}$ em 48 h de fermentação, enquanto que para os demais acréscimo (2 e 6,6%) corresponde a $1,634 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,885 \text{ g.L}^{-1}$, ambas em 72 h respectivamente. Pode-se analisar que quanto maior a concentração de inóculo, maior concentração celular. A produtividade celular máxima foi observada no experimento controle quando utilizado o acréscimo de 10% de inóculo no meio em 48 h de cultivo ($42 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$). Em 72 h a produtividade máxima de $22,6 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ e

26 mg.L⁻¹.h⁻¹ foi obtida para o experimento controle com 2 e 6,6% de acréscimo de inóculo, respectivamente.

Ao comparar a produtividade máxima do tratamento fortificado com 1 µg.mL⁻¹ de DON em relação ao controle, o maior efeito é verificado com adição de 6,6% de inóculo com valor de 15 mg.L⁻¹.h⁻¹ ou redução de 42% em relação ao controle.

A Tabela 10 apresenta o percentual de células não viáveis em 72 h de fermentação em diferentes concentrações de inóculo.

Tabela 10 – Percentual de células não viáveis durante o cultivo com a *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação na ausência (controle) e na presença da micotoxina (tratamento).

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	0	0	0,3	0,5	1,1
	6,6	0	0	0,4	0,6	1,2
	10	0	0	1,3	0,7	1,5
Tratamento	2	0	0	3,1	3	3,2
	6,6	0	0	2,9	3,3	3,5
	10	0	2,5	3,5	6,8	7

O número de células não viáveis aumenta e em 96 h atinge os maiores níveis, isso se atribui a fase de lise celular. Em comparação ao cultivo tratamento com a micotoxina, percebe-se que as células sofrem maior declínio em 10% de acréscimo de inóculo após 72 h de cultivo.

Durante esse estudo, o pH do meio variou de 6,0 a 5,1 para os cultivos controle e 6,0 a 4,6 para o cultivo com tratamento com DON, logo é de grande importância avaliar o consumo de substrato (Tabela 11).

Tabela 11 - Concentração de glicose (g.L^{-1}) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de *S. cerevisiae* de alta fermentação.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	25,98 ^{a,A}	21,79 ^{b,A}	3,49 ^{c,B}	2,57 ^{d,A}	2,21 ^{e,A}
	6,6	25,49 ^{a,C}	19,19 ^{b,B}	2,00 ^{c,E}	1,83 ^{d,C}	1,87 ^{d,C}
	10	25,68 ^{a,B}	17,86 ^{b,C}	1,90 ^{d,E}	2,02 ^{c,B}	1,93 ^{d,B}
Tratamento	2	25,97 ^{a,A}	21,41 ^{b,A}	5,70 ^{c,A}	1,79 ^{d,C}	1,65 ^{e,D}
	6,6	25,44 ^{a,C}	16,75 ^{b,C}	2,82 ^{c,C}	1,87 ^{d,C}	1,71 ^{e,D}
	10	25,60 ^{a,B}	18,73 ^{b,B}	2,18 ^{c,D}	2,04 ^{d,B}	1,86 ^{e,C}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar resultados ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar o tratamento e a adição de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

A concentração inicial de glicose se manteve em média em $25,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ e foi consumido em torno de 88% até 48 h de fermentação, devido as condições do cultivo anaeróbio. Isso ocorre devido a fase de desaceleração onde ocorre o esgotamento de 1 ou mais compostos do meio de cultura, necessários ao crescimento e também ao acúmulo de metabólitos inibidores.

Em relação ao efeito da micotoxina, não foi observado diferença entre o experimento controle e com tratamento na mesma concentração de inóculo, exceto para a concentração de inóculo de 6,6% em 72 h de cultivo. Quando comparado as diferentes concentrações de inóculo sob tratamento, a de 6,6% em 24 h apresentou a maior redução de substrato.

Outro metabólito de grande importância é concentração de glutathiona (GSH), pois estudos citam que a síntese de GSH é essencial para o crescimento celular em condições de estresse, uma vez que, a levedura ao ser submetida a tais condições, ocasionou o aumento da produção de GSH (NIE et al., 2005). Portanto, na Tabela 12 apresenta a concentração de glutathiona (GSH) determinada para os ensaios com concentrações diferentes de inóculo.

Tabela 12- Concentração de GSH (g.L^{-1}) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de *S. cerevisiae* de alta fermentação.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	16,31 ^{e,C}	22,30 ^{d,F}	23,77 ^{c,D}	24,22 ^{b,E}	24,80 ^{a,E}
	6,6	17,32 ^{e,A}	48,31 ^{d,C}	49,14 ^{c,B}	74,76 ^{b,B}	77,71 ^{a,B}
	10	15,86 ^{d,D}	37,00 ^{e,D}	40,58 ^{a,C}	39,62 ^{b,D}	40,30 ^{a,C}
Tratamento	2	15,64 ^{d,D}	25,37 ^{a,E}	22,54 ^{c,E}	23,00 ^{b,F}	23,10 ^{b,F}
	6,6	17,44 ^{e,A}	60,19 ^{d,A}	61,73 ^{c,A}	111,50 ^{a,A}	90,51 ^{b,A}
	10	16,79 ^{d,B}	49,33 ^{a,B}	49,39 ^{a,B}	40,70 ^{b,C}	32,31 ^{c,D}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar resultados ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar o tratamento e a adição de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Nas primeiras 24 h de fermentação começa a ocorrer um estresse da própria levedura tanto com relação ao controle como também em relação ao tratamento, mas um elevado estresse oxidativo ocorre com um aumento na concentração de GSH, somente em 72 h de fermentação quando com acréscimo de 6,6% de inóculo, que relacionado ao controle apresenta um aumento da produção de GSH de 33% em relação ao controle.

Portanto, foi avaliado a produção de etanol nesse período para avaliar a influência da concentração de inóculo no meio (Tabela 13).

Tabela 13 - Produção de etanol com diferentes concentrações de inóculo no meio em 72 h de fermentação.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Produção de etanol (%)
Controle	2	1,0
	6,6	2,9
	10	2,4
Tratamento	2	2,6
	6,6	3,0
	10	2,9

Para melhor avaliar a produção de GSH em diferentes concentrações de inóculo, a Tabela 13 demonstra que, com a síntese de etanol ocorre maior estresse oxidativo para a célula logo a produção é maior, isso pode ser observado em 72 h de fermentação com 6,6% de

inóculo, no experimento controle e no tratamento. A produção aumentou, com a contaminação do meio, pois desvia rotas metabólicas e pode ocasionar aumento da síntese de etanol.

Segundo Wen (2006) a produção de GSH aumenta a medida que ocorre o consumo de glicose e a produção de etanol, na fase de crescimento exponencial quando o crescimento celular ocorre de forma mais lenta e o etanol é utilizado como fonte de carbono para o crescimento celular e para a síntese de GSH, já na fase estacionária ocorre o consumo de glicose e etanol.

Na Tabela14 está apresentado o acompanhamento do conteúdo de proteína intracelular da levedura *S. cerevisiae* em cultivo submerso anaeróbico utilizando diferentes concentrações de inóculo.

Tabela 14 - Conteúdo de proteínas intracelulares (g.L^{-1}) da levedura *S. cerevisiae* em cultivo submerso anaeróbico utilizando diferentes concentrações de inóculo.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	0,245 ^{e,A}	0,476 ^{d,C}	0,594 ^{b,B}	0,555 ^{c,C}	0,627 ^{a,C}
	6,6	0,253 ^{e,A}	0,533 ^{b,A}	0,491 ^{c,D}	0,487 ^{d,D}	0,646 ^{a,B}
	10	0,247 ^{e,A}	0,526 ^{c,B}	0,542 ^{b,C}	0,488 ^{d,D}	0,643 ^{a,B}
Tratamento	2	0,243 ^{e,A}	0,442 ^{d,D}	0,457 ^{c,E}	0,596 ^{a,A}	0,553 ^{b,E}
	6,6	0,251 ^{d,A}	0,436 ^{c,E}	0,604 ^{a,A}	0,585 ^{b,B}	0,602 ^{a,D}
	10	0,245 ^{e,A}	0,528 ^{c,B}	0,542 ^{b,C}	0,486 ^{d,D}	0,816 ^{a,A}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar resultados ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar o tratamento e a adição de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

O efeito da presença da micotoxina foi maior quando avaliado o teor de proteína intracelular nos tempo de cultivo entre 48 e 72 h. Portanto, no cultivo da espécie *Sacharomyces cerevisiae* deve ser avaliado o efeito tóxico, uma vez que ocorre alterações nas características morfológicas e metabólicas da célula e as cepas apresentam sensibilidade a esta toxina. Portanto, essa levedura torna-se um micro-organismo com potencial produção de biomarcador (ADOLMAALI et al., 2009). Na Tabela 15, está o acompanhamento do conteúdo de proteína extracelular do meio utilizando diferentes concentrações de inóculo.

Tabela 15 - Conteúdo de proteína extracelular (g.L^{-1}) da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em cultivo submerso sem agitação utilizando diferentes concentrações de inóculo.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	37,96 ^{a,C}	36,69 ^{b,B}	30,77 ^{c,B}	27,87 ^{d,A}	25,51 ^{e,A}
	6,6	38,63 ^{a,B}	37,20 ^{b,A}	29,70 ^{c,D}	27,18 ^{d,C}	24,01 ^{e,D}
	10	40,46 ^{a,A}	37,29 ^{b,A}	30,97 ^{c,A}	27,70 ^{d,B}	25,04 ^{e,B}
Tratamento	2	37,89 ^{a,C}	36,55 ^{b,B}	30,19 ^{c,C}	27,22 ^{d,C}	25,10 ^{e,B}
	6,6	38,56 ^{a,B}	37,18 ^{b,A}	29,36 ^{c,E}	27,06 ^{d,D}	23,87 ^{e,E}
	10	40,38 ^{a,A}	37,21 ^{b,A}	30,09 ^{c,C}	27,18 ^{d,C}	24,33 ^{e,C}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para comparar resultado ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar o tratamento e a adição de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Ocorreu alteração no conteúdo de proteína total em 48 h de cultivo, quando comparado com o experimento com DON, cujas diferenças foram significativas nas diferentes concentrações de inóculo. Houve uma diminuição da quantidade de proteína solúvel, podendo ser uma resposta da célula da *S. cerevisiae* a toxicidade do meio.

A influência das diferentes concentrações de inóculo e a atividade da peroxidase está na Tabela 16.

Tabela 16 - Atividade de peroxidase (U/mg) em cultivo submerso anaeróbio utilizando diferentes concentrações de inóculo de *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	2,33 ^{d,A}	2,45 ^{c,F}	2,52 ^{b,F}	3,45 ^{a,E}	3,46 ^{a,D}
	6,6	2,32 ^{c,A}	3,42 ^{a,B}	3,08 ^{d,C}	3,36 ^{b,D}	3,38 ^{b,E}
	10	2,37 ^{d,A}	3,07 ^{c,C}	3,35 ^{b,B}	3,50 ^{a,C}	3,52 ^{a,C}
Tratamento	2	2,31 ^{d,A}	2,71 ^{c,E}	2,82 ^{b,E}	2,84 ^{b,F}	2,90 ^{a,F}
	6,6	2,32 ^{e,A}	2,82 ^{d,D}	2,92 ^{c,D}	5,55 ^{a,A}	5,04 ^{b,A}
	10	2,36 ^{e,A}	3,52 ^{d,A}	3,69 ^{c,A}	3,72 ^{b,B}	3,80 ^{a,B}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para caracterizar experimento ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar o tratamento e a adição de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

A atividade da enzima peroxidase apresenta perfil alterado nos ensaios com DON a partir de 72 h de fermentação, com maior atividade relacionada ao inóculo adicionado ao

cultivo em 6,6%, sendo que essa enzima pode estar relacionada a biodegradação da micotoxina DON.

Estudo utilizando a levedura *S. cerevisiae* em contato com o meio contaminado com a micotoxina ao longo de 84 h, determinou que nas primeiras 22 h de cultivo a atividade da enzima peroxidase permaneceu inalterada e após apresentou perfil diferenciado, ou seja, maior atividade entre 22 e 84 h. Esta alteração metabólica pode ser um indicativo de que a célula após 22 h de cultivo venha a desenvolver mecanismos de biodegradação de compostos oxidativos a levedura, podendo estar associados à degradação de DON, sendo esta uma via metabólica forçada pela presença da micotoxina durante o cultivo (GARDA-BUFFON; BADIALE-FURLONG, 2010).

6.1.4 Adaptação do inóculo

Um experimento foi realizado para avaliar a adaptação do inóculo durante 24 h de cultivo em concentrações diferentes (2; 6,6 e 10%), utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação em cultivo anaeróbico a 26 °C. Portanto ao avaliar as características do cultivo, como a atividade da enzima peroxidase e a determinação de glutathione, parâmetros que descrevem o estresse ocorrido durante o crescimento da célula, foi determinado que não ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tratamento e o controle como na presença da micotoxina. Na Tabela 17 e 18 está a atividade de peroxidase e a produção de glutathione.

Tabela 17 – Atividade de peroxidase (U/mg) em cultivo submerso anaeróbico utilizando adaptações do cultivo com diferentes concentrações de inóculo.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	1,87 ^{b,A}	1,17 ^{c,C}	2,16 ^{a,C}	2,00 ^{a,B}	0,94 ^{d,D}
	6,6	1,81 ^{c,A}	1,50 ^{d,A}	2,70 ^{a,B}	2,01 ^{b,B}	1,06 ^{e,C}
	10	1,79 ^{c,A}	1,50 ^{d,A}	2,04 ^{b,D}	2,18 ^{a,A}	0,94 ^{e,D}
Tratamento	2	1,90 ^{c,A}	1,09 ^{e,D}	2,68 ^{a,B}	2,22 ^{b,A}	1,18 ^{d,A}
	6,6	1,89 ^{c,A}	1,40 ^{d,B}	2,89 ^{a,A}	2,02 ^{b,B}	1,10 ^{e,B}
	10	1,93 ^{b,A}	1,40 ^{c,B}	2,20 ^{a,C}	2,20 ^{a,A}	1,09 ^{d,B}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para caracterizar experimento ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar o tratamento e a adição de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

Tabela 18 - Produção de GSH (g.L^{-1}) em cultivo submerso anaeróbico utilizando adaptações do cultivo com diferentes concentrações de inóculo.

Experimento	Concentração de inóculo (%)	Tempo de fermentação (h)				
		0	24	48	72	96
Controle	2	34,8 ^{a,C}	31,2 ^{c,A}	31,7 ^{c,B}	32,1 ^{b,A}	31,4 ^{c,B}
	6,6	38,0 ^{a,A}	30,6 ^{c,B}	32,6 ^{b,B}	32,0 ^{b,A}	31,8 ^{b,B}
	10	37,7 ^{a,B}	30,9 ^{d,B}	31,5 ^{c,B}	32,6 ^{b,A}	31,7 ^{c,B}
Tratamento	2	34,7 ^{a,C}	31,4 ^{b,A}	31,6 ^{c,B}	32,4 ^{b,A}	32,4 ^{b,A}
	6,6	38,7 ^{a,A}	31,0 ^{d,B}	32,5 ^{b,A}	32,0 ^{c,A}	30,4 ^{e,C}
	10	37,5 ^{a,B}	31,0 ^{d,B}	31,8 ^{c,B}	32,2 ^{b,A}	31,6 ^{c,B}

Letras iguais e minúsculas na mesma linha para caracterizar experimento ao longo do tempo e letras iguais e maiúsculas na mesma coluna para comparar o tratamento e a adição de inóculo, pois indicam que não há diferença significativa ($p < 0,05$).

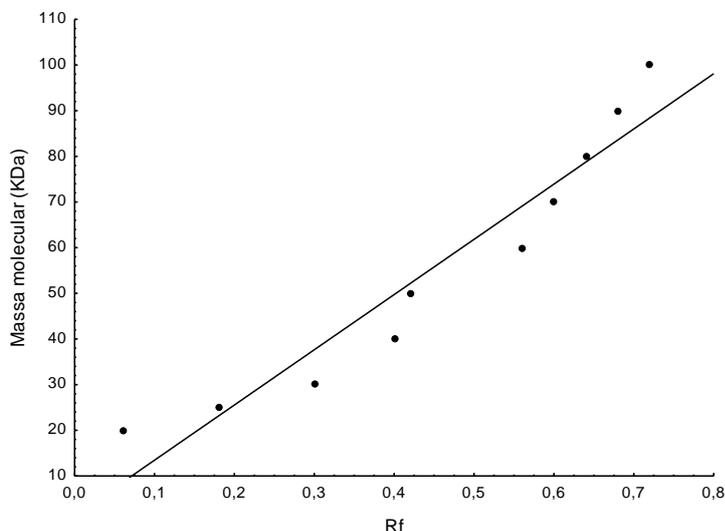
6.1.5 Perfil da síntese proteica

A cinética do crescimento celular demonstrou o efeito da presença de DON no conteúdo proteico intracelular, portanto, o perfil das proteínas, sintetizadas pela levedura durante a fermentação podem, contribuir na elucidação do efeito tóxico de DON no micro-organismo.

Considerando esta uma manifestação de estresse celular, para melhor avaliação da massa molecular foi gerada uma curva de taxa de migração do gel em função do padrão correlacionada a amostra, onde foi utilizada a análise de eletroforese SDS-PAGE, com coloração do gel por Comassie Brilliant Blue, para possível determinação da massa molecular das amostras coletadas a cada 24 h durante o cultivo submerso de 96 h.

As massas moleculares das amostras foram identificadas por estimativa dos fatores de retenção dados pelas distâncias percorridas pelas bandas separadas e a migração total das proteínas pelo gel (R_f), com estes valores foram construídas curvas analíticas, conforme mostrado na Figura 10.

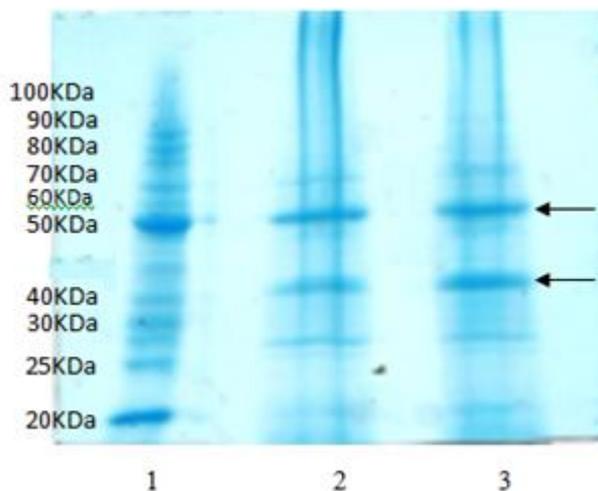
Figura 10 - Relação entre a massa molecular e o fator de retenção do gel para o marcador molecular.



A relação entre a massa molecular e a retenção no gel (Rf), permite a identificação da massa molecular do perfil diferenciado do conteúdo proteico intracelular. A curva deste resultou na equação $Y = 120,9288x + 1,3565$ com $R^2 = 0,92$.

Após verificar que as melhores condições de cultivo foram o uso da levedura *S. cerevisiae* de alta fermentação cultivada em câmara termostatizada a 26 °C, acrescido de 6,6 % de inóculo, foi avaliada a revelação do gel com experimento controle e tratamento no decorrer de 96 h de cultivo. A avaliação do conteúdo proteico fermentado no tempo inicial e final do experimento (0 h e 96 h) não apresentou resolução suficiente para a detecção de proteínas devido à etapa de adaptação ao meio de cultivo e multiplicação celular como também pela baixa concentração celular no tempo inicial e no final do cultivo. Nos tempos de 24 h e 48 h de cultivo, não ocorreu alteração no perfil proteico entre o experimento controle e tratamento, que pode ser verificado em 72 h de cultivo (Figura 11).

Figura 11 - Perfil eletroforético do experimento controle e do tratamento fortificado com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de DON. Onde (1) padrão molecular; (2) controle; (3) tratamento.



A maior expressão proteica foi verificada no tratamento fortificado com $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de DON em relação ao controle. A faixa de maior intensidade do padrão marcador molecular foi observada entre 20 e 50 kDa.

A levedura *S. cerevisiae* de alta fermentação na presença da micotoxina DON, mostrou variação no perfil protéico após 72 h de cultivo quando comparado ao experimento controle, o que evidencia a formação de biomarcadores proteicos, ou seja, uma resposta celular na presença da micotoxina DON.

Essa resposta referente a síntese protéica do cultivo é também acompanhada por uma maior alteração na atividade da enzima peroxidase e pelo conteúdo de GSH, um aspecto importante para indicar a defesa celular.

A massa molecular das proteínas do cultivo com DON mostrou duas diferenças significativas, uma na faixa molecular de 47 kDa e outra em 54 kDa, e podem ter papel de biomarcador para a toxina.

A produção de proteínas de choque térmico, com cerca de 70 kDa, que são uma resposta celular ao estresse de adversidade do meio celular eucarioto, como a presença de micotoxinas mostrou que DON mesmo em baixa concentração pode afetar a função imunológica humana e, por consequência, promover a produção destas proteínas, os biomarcadores (GOLLI-BENNOUR; BACHA, 2011; COSTA et al., 2011).

O estudo eletroforético das proteínas mostrou alterações promovidas pela presença da micotoxina deoxinivalenol que evidenciando a sensibilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação e a sua toxicidade em cultivos com agitação

orbital a 200 rpm a 26 °C durante 85 h , podendo diferenciar duas faixas de massa molecular, 22 e 43 kDa (FLORES, 2013).

6.1.6 Determinação de DON

Em todos os estudos após o final de cada fermentação foi realizada a determinação de DON, avaliando o meio de cultivo contaminado e o meio controle para possível comparação, e assim quantificado por CLAE-UV e uma confirmação por LC-ESI-MS/MS. Os resultados não foram satisfatórios, pois não foi possível avaliar a degradação da micotoxina DON, devido ao fato de estar presente no meio alguns interferentes co-eluído com a micotoxina, mesmo quando utilizado detector de maior sensibilidade e especificidade.

Sendo assim, foi realizada uma curva matriz na amostra para que assim fosse possível a determinação do pico cromatográfico, porém o mesmo não foi possível, logo necessita-se de um estudo com foco na degradação da micotoxina DON na presença do meio de cultivo YPD utilizando a levedura *S. cerevisiae* e a eliminação do interferente do meio.

7. CONCLUSÕES

A condição de cultivo que melhor se adaptou ao estudo da produção de biomarcadores para a micotoxina deoxinivalenol foi empregando a levedura *Saccharomyces cerevisiae* de alta fermentação cultivada em câmara termostatizada a 26 °C no período de 72 h.

Este estudo possibilitou avaliar alterações na cinética de crescimento celular no cultivo e no perfil protéico em presença de DON, indicado pelo aumento da atividade enzimática da peroxidase (PO) e pela produção de glutathiona (GSH), que podem ser consideradas as principais manifestações metabolômicas determinadas.

Os principais biomarcadores produzidos foram a alta concentração de glutathiona e de proteína intracelular caracterizada por uma massa molecular de 47 e 54 kDa.

Portanto, alterações promovidas pela presença da micotoxina deoxinivalenol evidenciaram a sensibilidade da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quanto à toxicidade, sendo este um micro-organismo um produtor de biomarcador para a micotoxina DON.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMSON, D.; GAN, Z.; CLEAR, R.; GILBERT, J; MARQUARDT, R. Relationships among deoxynivalenol, ergosterol and *Fusarium* exoantigens in Canadian hard and soft wheat. **International Journal of Food Microbiology**, v. 45, p. 217–224, 1998.
- ADOLMAALI, S.; MITTERBAUER, R.; SPADIUT, O.; PERUCI, M.; WEINDORFER, H.; LUCYSHYN, D.; ELLERSDORFER, G.; LEMMENS, M.; MOLL, W. D.; ADAM, G. AMÉZQUETA, S.; GONZALEZ-PENAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, v. 20, p. 326-333, 2009.
- AMÉZQUETA, S.; GONZALEZ-PENAS, E.; MURILLO-ARBIZU, M.; CERAIN, A. L. Ochratoxin A decontamination: A review. **Food Control**, 326-333, 2009.
- ANSARI, A. A., AJEET, K. P. R.; MÁLHOTRA, S. B. D. Nanostructured zinc oxide platform for mycotoxin detection. **Bioelectrochemistry**, v. 77, p. 75–81, 2010.
- ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 30 de julho de 2013.
- AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis of International**. 17th, 2000.1 CD-ROM.
- ARMANDO, M. R.; DOGI, C. A.; POLONI, V.; ROSA, C. A. R.; DALCERO, A. M.; CAVAGLIERI, L. R. In vitro study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 182–188, 2013.
- ATROSHI, F.; RIZZO, A.; WESTERMARCK, T.; ALI-VEHMAS, T. Antioxidant nutrients and mycotoxins. **Toxicology**, v. 180, p. 151-167, 2002.
- AUDENAERT, K.; MONBALIU, S.; DESCHUYFFELEER, N.; MAENE, P.; VEKEMAN, F.; HAESAERT, G.; SAEGER, S.; EECKHOUT, M. Neutralized electrolyzed water efficiently reduces *Fusarium spp.* in vitro and on wheat kernels but can trigger deoxynivalenol (DON) biosynthesis. **Food Control**, v. 23, p. 515-521, 2012.
- AYALA, A. T. **Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen *Tbtri5* de *Trichoderma brevicompactum***. Universidad de Salamanca, Departamento de microbiología y genética, Salamanca, 2010.
- BADIALE-FURLONG, E. **Tricotecenos em trigo: Um estudo de metodologia, incidência, contaminação simultânea por outras micotoxinas e de alguns fatores que influenciam na produção no campo**. 120f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos), Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 1992.
- BENNETT, G. A.; SHOTWELL, O. L. Criteria for determining purity of *Fusarium* mycotoxins. **Journal of Association of Official Analytical Chemistry**, v. 73, p. 270-275, 1990.
- BOEIRA, L. S.; BRYCE, H. J.; STEWART, G. G. FLANNIGAN, B. Influence of cultural conditions on sensitivity of brewing yeasts growth to *Fusarium* mycotoxins zearalenone,

deoxynivalenol and *fumonisin* B1. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 69–81, 2002.

BOUTIGNY, A. L.; RICHARD-FORGET, F.; BARREAU, C. Natural mechanisms for cereal resistance to the accumulation of *Fusarium* trichothecenes. **European Journal Plant Pathology**, v. 121, p. 411-423, 2008.

BOZO, L.; FERNÁNDEZ, M.; LÓPEZ, M.; REYES, R.; SUÁREZ, P. Biomarcadores de contaminación química en comunidades microbianas. **Interciencia**, v. 32, n 1, 2007.

BULLERMAN, L. B.; BIANCHINI, A. Stability of mycotoxins during food processing. **International Journal of Food Microbiology**, 119, p. 140–146, 2007.

CASH, P. Proteomics: the protein revolution. **Biologist**. v. 2, p. 49, 2002.

CAST - Council for Agricultural Science and Technology, **Mycotoxins: Risks in Plant, Animal, and Human Systems**. Iowa - USA, p. 200, 2003.

CERVERÓ, M. C.; CASTILLO, M.A; MONTES, R.; HERNÁNDEZ, E. Determination of trichothecenes, zearalenone and zearalenols in commercially available corn- based foods in Spain. **Rev Iberoam Micol.**, v. 24, p. 52-55, 2007.

CETIN, Y.; BULLERMAN, L. B. Confirmation of reduced toxicity of deoxynivalenol in extrusion-processed corn grits by the MTT bioassay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 54, p.1949–1955, 2006.

CONDON, M. Z.; JENSEN, E. A.; WATTS, A. B.; POPE, C. W. Nutritional variation in cottonseed: effect of autoclaving in presence and absence of gossypol on solvent extracted cottonseed meal. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 2, p. 822-826, 1954.

COSTA, A. N.; KEEN, J. N.; WILD, C. P.; FINDLAY, J. B. C.; An analysis of the phosphoproteome of immune cell lines exposed to the immunomodulatory mycotoxin deoxynivalenol. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1814, p. 850–857, 2011.

DARNELL, J. E.; HARVEY, L. D. Molecular cell biology. **Baltimore**, 2Ed. Scientific American Books, New York, 1990.

DEQUIN, S.; CASAREGOLA, S. The genomes of fermentative *Saccharomyces*. **C. R. Biologies**. p. 678-693, 2011.

DICKINSON, R.; SCHWEIZER, M. **The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae**. USA e Canadá: CRC, 476p, 2004.

DÖLLS, S.; SHURICKX, J. A.; VALENTA, H.; DÄNICKE, S.; FINK-GREMMELS, J. Interactions of deoxynivalenol and lipopolysaccharides on cytotoxicity protein synthesis and metabolism of DON in porcine hepatocytes and Kupffer cell enriched hepatocyte cultures. **Toxicology Letters**, p. 121–129, 2009.

DONG, Y.; YANG, Q.; JIA, S.; QIAO, C. Effects of high pressure on the accumulation of trehalose and glutathione in the *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, n. 2, p. 226-230, 2007.

DORS, G. C.; CALDAS, S. S.; HACKBART, H. C. dos S.; PRIMEL, E. G.; FAGUNDES, C. A. A.; BADIALE-FURLONG, E. Fungicides and the Effects of Mycotoxins on Milling Fractions of Irrigated Rice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, 2013.

FLORES, J. J. C. **Avaliação da produção de biomarcadores para deoxinivalenol por *Saccharomyces cerevisiae***. Rio Grande: FURG, 2012. Dissertação. (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2013.

FRANCESCA, G. T.; BORRO, M. SIMMACO, M.; MODESTI, A. Effect of different glucose concentrations on proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 1516-1525, 2010.

FRESHNEY, R. **Culture of animal cells: A manual of basic technique** Alan R. Liss, Inc., New York. 1987.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; BADIALE-FURLONG, E. Determinação de tricotecenos em cerveja e avaliação de incidência no produto comercializado no Rio Grande do Sul. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, p. 657-663, 2004.

GARDA, J.; MACEDO, R. M.; FARIAS, R.; BERND, L.; DORS, G. C.; BADIALE-FURLONG, E. Alcoholic fermentative effects on malt spiked with trichothecenes. **Food Control**, v. 16, p. 423-428, 2005.

GARDA-BUFFON, J.; BADIALE-FURLONG, E. Kinetics of Deoxynivalenol Degradation by *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae* in Submerged Fermentation. **J.Braz. Chem. Soc.**, v. 21, n. 4, p. 710-714, 2010.

GARDA-BUFFON, J.; KUPSKI, L., FURLONG, E. B. Deoxynivalenol (DON) degradation and peroxidase enzyme activity in a submerged fermentation. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31 (1), p.198-203, 2011.

GIROLAMO, F. D.; BOSCHETTI, E.; CHUNG, M. C.M.; GUADAGNI, F., RIGHETTI, P. G. "Proteomineering" or not? The debate on biomarker discovery in sera continues. **Journal of proteomics**, v. 74, p. 589-594, 2011.

GOLLI-BENNOUR, E. E.; BACHA, H., Hsp70 expression as biomarkers of oxidative stress: Mycotoxins' exploration. **Toxicology**, v. 287, p.1-7, 2011.

GOMES, T. A. **Micotoxinas do *Fusarium sp*: Uma questão sanitária**. Universidade de Brasília, Qualidade em Alimentos, 2003.

GRIFFITHS, H. R.; MOLLER, L.; BARTOSZ, G.; BAST, A.; BERTONI-FREDDARI, C.; COLLINS, A.; COOKE, M.; COOLEN, S.; HAENEN, G.; HOBERG, A. M.; LOFT, S.; LUNEC, J.; OLINSKI, R.; PARRY, J.; POMPELLA, A.; POULSEN, H.; VERHAGEN, H. Biomarkers. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 23, p. 101-208, 2002.

GROVE, J. F. The trichothecenes and their biosynthesis. **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe**, p. 63-130, 2007.

HE, J.; ZHOU, T.; YOUNG, J. C.; GREG J. BOLAND, G. J.; SCOTT, P. M. Chemical and biological transformations for detoxification of trichothecene mycotoxins in human and animal food chains: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 67-76, 2010.

HOOFT, J. M.; ELMOR, H. I.; ENCARNAÇÃO, P.; BUREAU, D. P. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is extremely sensitive to the feed-borne *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol (DON). **Aquaculture**, p. 224-232, 2011.

IBÁÑEZ-VEA, M.; LIZARRAGA, E.; GONZÁLEZ-PEÑAS, E. Simultaneous determination of type-A and type-B trichothecenes in barley samples by GCeMS. **Food Control**, 1428-1434, 2011.

ITO, T.; TASHIRO, K.; MUTA, S.; OZAWA, R.; YAMAMOTO, T. K.; KUHARA, S.; SAKAKI, Y. Toward a protein-protein interaction map of the budding yeast: A comprehensive system to examine two-hybrid interactions in all possible combinations between the yeast proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** –PNAS, v. 97, p. 1143–1147, 1999.

JAJIC, I.; JURIC, V.; ABRAMOVIC, B. First survey of deoxynivalenol occurrence in crops in Serbia. **Food Control**, p. 545-550, 2008.

JENSEN, A. H.; BREKKE, O. L.; FRANK, G. R.; PEPLINSKI, A. J. Acceptance and utilization by swine of aflatoxin-contaminated corn treated with aqueous or gaseous ammonia. **Journal of Animal Science**, v.45, p.8-12, 1977.

JEONG, J. S.; LEE, J.H.; SIMIZU, Y.; TAZAKI, H.; ITABASHI, H.; KIMURA, N. Effects of the *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol on in vitro rumen fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, v.162, p.144-148, 2010.

JONSSON, C. M.; CASTRO, V. L. Bioindicadores e biomarcadores de agroquímicos no contexto da relação saúde-ambiente. **Embrapa**, Jaguariúna, 2005.

JOUANY, J. P. Methods for preventing, decontaminating and minimizing the toxicity of mycotoxins in feeds. **Animal Feed Science and Technology**, p. 342-362, 2007.

KAMMOUN, L. G.; GARGOURI, S.; BARREAU, C.; RICHARD-FORGET, F.; HAJLAOUI, M. R. Trichothecene chemotypes of *Fusarium culmorum* infecting wheat in Tunisia. **International Journal of Food Microbiology**, v. 140 p. 84–89, 2010.

KARP, G. **Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments**. USA: Wiley, 837p, 2010.

KIM, I.; YUN, H.; IWAHASHI, H.; JIN, I. Genome-wide expression analyses of adaptive response against medadione-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. **Process Biochemistry**, p. 2305–2313, 2006.

KIMURA, M.; TOKAI, T.; TAKAHASHI-ANDO, N.; OHSATO, S.; FUJIMURA, M. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes and evolution. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 71, n. 9, p. 2105-2123, 2007.

KLINGLMAYR, C.; NOBAUER, K.; RAZZAZI-FAZELI, E.; CICHNA-MARKL, M. Determination of deoxynivalenol in organic and conventional food and feed by sol-gel immunoaffinity chromatography and HPLC-UV detection. **Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical & Life Sciences**, p. 187-193, 2009.

KŁOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D. The effect of raw material contamination with mycotoxins on the composition of alcoholic fermentation volatile by-products in raw spirits. **Bioresource Technology**, p. 9723-9727, 2010.

KOLF-CLAUW, M.; CASTELLOTE, J. BENJAMIN, J.; BOURGES-ABELLA, N.; RAYMOND-LETRON, I.; PINTON, P.; OSWALD, I. P. Development of a pig jejunal explant culture for studying the gastrointestinal toxicity of the mycotoxin deoxynivalenol: Histopathological analysis. **Toxicology in Vitro**. p. 1580–1584, 2009.

KÖNIGS, M.; LENCZYK, M.; SCHWERDT, G.; HOLZIENGER, H.; GEKLE, M.; HUMPF, H. U. Cytotoxicity, metabolism and cellular uptake of the mycotoxin deoxynivalenol in human proximal tubule cells and lung fibroblasts in primary culture. **Toxicology**, p. 48–59, 2007.

KRSKA, R.; SCHUBERT-ULLRICH, P.; JOSEPHS, R. D.; EMTEBORG, H.; BUTTINGER, G.; PETTERSON, H.; EGMOND, H. P. V.; SCHOTHORST, R. C.; MACDONALD, S.; CHAN, D. Determination of molar absorptivity coefficients of major type-B trichothecenes and certification of calibrators for deoxynivalenol and nivalenol. **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v. 388, p. 1215-1226, 2007.

KUMAR, A.; RAVINDRA, S.; PRIYANKA, S.; NAWAL, K. D. Chemical composition, antifungal and anti-aflatoxinogenic activities of *Ocimum sanctum* L. essential oil: its safety assessment as a plant-based antimicrobial. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 539-543, 2010.

KUMARA, V.; BASUA, M. S.; RAJENDRAN, T. P. Mycotoxin research and mycoflora in some commercially important agricultural commodities. **Crop Protection**, v. 27, p. 891–905, 2008.

KWON, M.; CHONG, S.; HAN, S.; KIM, K. Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1623, p. 1–5, 2003.

LATTANZIO, V. M. T.; SOLFRIZZO, M.; GIROLAMO, A.; CHULZE, S. N.; TORRES, A. M.; VISCONTI, A. LC-MS/MS characterization of the urinary excretion profile of the mycotoxin deoxynivalenol in human and rat. **Journal of Chromatography**, v. 879, p. 707-715, 2011.

LEVINSON, W. E.; KURTZMAN, C. P.; KUO, T. MIN. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 292-295, 2007.

LINO, C. M.; SILVA, L. J. G.; PENA, A. Metodologias analíticas para a determinação de biomarcadores de fumonisinas em amostras biológicas. **Química**, v. 106, 2007.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Biological Chemistry**, p. 193 - 265, 1951.

MARTÍ, E. J.; ZUZUARREGUI, A.; GOMAR-ALBA, M.; GUTIÉRREZ, D.; GIL, C.; OLMO, M. Molecular response of *Saccharomyces cerevisiae* wine and laboratory strains to high sugar stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 211–220, 2011.

- MAZIERO, T. M.; BERSOT, L. S. Micotoxinas em alimentos produzidos no Brasil. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.12, n.1, p.89-99, 2010.
- MEKY, F. A.; HARDIE, L. J.; EVANS, S.W.; WILD, C. P. Deoxynivalenol-induced immunomodulation of human lymphocyte proliferation and cytokine production. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p. 827-836, 2001.
- MEYER, T. N.; SILVA, A. L. Resposta celular ao estresse. **Rev Ass Med Brasil**, v. 45, p. 181-188, 1999.
- MILLER, G. L. Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v.31, n.3, p.426-428, 1959.
- MOHAMED, E. Z. Impact of mycotoxins on humans and animals Mohamed E. Zain, **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 15, p. 129–144, 2011.
- MURPHY, P. A.; HENDRICH, S.; LANDGREN, C.; BRYANT, C. M. Food Mycotoxins: An Update. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 5, 2006.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- NIE, W.; WEI, G.; DU, G.; LI, Y.; CHEN, J. Enhanced intracellular glutathione synthesis and excretion capability of *Candida utilis* by using a low pH-stress strategy. **Letters in Applied Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 378-384, 2005.
- NOGUEIRA, C. A.; KEEN, J. N.; WILD, C. P.; FINDLAY, J. B. C. An analysis of the phosphoproteome of immune cell lines exposed to the immunomodulatory mycotoxin deoxynivalenol. **Biochimica et Biophysica Acta**, p.850-857, 2011.
- OWENS, C. W. I.; BELCHER, R. V. A colorimetric micro-method for the determination of glutathione. **Biochemical Journal**, v. 94, n. 3, p. 705-711, 1965.
- PAPANIKOLAOU, S.; FAKAS, S.; FICK, M.; CHEVALOT, I.; GALIOTOUPANAYOTOU, M.; KOMAITIS, M.; MARC, I.; AGGELIS, G. Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: Production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 60-71, 2008.
- PATHARAJAN, S.; REDDY, K. R. N.; KARTHIKEYAN, V.; SPADARO, D.; LORE, A.; GULLINO, M. L.; GARIBALDI, A. Potential of yeast antagonists on invitro biodegradation of ochratoxin A. **Food Control**, v. 22, p. 290-296, 2011.
- PELCZAR, M., REID, R., CHAN, E. C. S. **Microbiologia**. Editora McGraw-Hill do Brasil, v. 1, p. 345-363, 1980.
- PENNINCKX, M. J. A short review on the role of glutathione in the response of yeasts to nutritional, environmental, and oxidative stress. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 9/10, p. 737-742, 2000.
- PESTKA, J. J. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. **Arch Toxicol**, v. 84, p. 663–679, 2010.

PESTKA, J.J. Mechanisms of deoxynivalenol-induced gene expression and apoptosis. **Food Addit Contam** (in press), 2008.

PESTKA, J.J.; ZHOU, HR; MOON, Y; CHUNG, YJ. Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. **Toxicol Lett.** 153:61–73, 2004.

PITT, J. I. **Toxigenic fungi and mycotoxins.** British Medical Bulletin, v.56, n.1, p. 184-192, 2000.

PITT, J.; HOCKING, A. D. **Fungi and Food Spoilage.** Blackie Academic e Professional. Great Britain, 1997.

PRONYK, C.; CENKOWSKI, S.; ABRAMSON, D. Superheated steam reduction of deoxynivalenol in naturally contaminated wheat kernels. **Food Control**, v. 17, p. 789-796, 2006.

QUALTIERI, A.; PERA, M. L.; URSO, E.; BONO, F.; VALENTINO, P.; SCORNAIENCHI, M. C.; QUATTRONE, A. Two-dimensional electrophoresis of peripheral nerve proteins: optimized sample preparation. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 159, p. 125-133, 2007.

REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNÁNDEZ-GALÁN; R. Y COLLADO, I. G. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochem Reviews**, v.7, p.89-123, 2008.

ROCHA, O.; ANSARI, K.; DOOHAN, F. M. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. **Food Additives and Contaminants**, v. 22, p. 369-378, 2005.

ROLLINI, M.; MANZONI, M. Influence of different fermentation parameters on glutathione volumetric productivity by *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 7, p.1501-1505, 2006.

RUMBEIHA, W. K. Clinical implications of mycotoxicosis in companion animals. **Technical Symposium on Mycotoxin**, Alltech, Inc, Nicholasville, Anais KY, 2000.

SABINO, M. **Micotoxinas em alimentos.** In: Fundamentos de Toxicologia. São Paulo: Atheneu, 1996.

SAKATO, K.; TANAKA, H. Advanced control of glutathione fermentation process. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, n. 8, p. 904-912, 1992.

SANTOS, M. M.; RAGHEVENDRAN, V.; KÖTTER, P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. **Metabolic Engineering**, p. 352–363, 2004.

SCHNEIDER, E.; CURTUI, V.; SEIDLER, C.; DIETRCHI, R.; USLEBER, E. U.; MARTLBAUER, E. Rapid methods for deoxinivalenol and other trichothecenes. **Toxicology Letters**, p. 113-121, 2004.

SCHRÖDTER, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, v. 153, p. 47-49, 2004.

SCHWINN, A.; LAROQUE, D. A.; MONTEIRO, R. L. **Estudo da degradação do deoxinivalenol durante processo cervejeiro**. Rio Grande: FURG, 2011. Graduação (Engenharia e Ciência de Alimentos), Universidade Federal do Rio Grande, 2011.

SCOTT, P.M.; KANHERE, S.R.; DEXTER, J.E.; BRENNAN, P.W.; TRENHOLM, H.L. Distribution of the trichothecene mycotoxin deoxynivalenol (vomitoxin) during the milling of naturally contaminated hard red spring wheat and its fate in baked products. **Food Additives and Contaminants**, v. 1, p. 313-323, 1984.

SHERIF, O. S.; SALAMA, E.E.; ABDEL-WAHHAB, M.A. Mycotoxins and child health: The need for health risk assessment. **International Journal Hygiene Environmental Health**, p. 347–368, 2009.

SHETTY, P. H.; JESPERSEN, L. *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. **Trends in Food Science & Technology**, v.17, p.48-55, 2006.

SHIMIZU, H.; ARAKI, K.; SHIOYA, S.; SUGA, K. Optimal production of glutathione by controlling the specific growth rate of yeast in fed-batch culture. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 38, n. 2, p. 196-205, 1991.

SILVEIRA, C.M.; BADIÁLE-FURLONG, E. Caracterização de compostos nitrogenados presentes em farelos fermentados em estado sólido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 4, 2007.

SIZOVA, D.; CHARBAUT, E.; DELALANDE, F.; POIRIER, F.; HIGH, A. A.; PARKER, F.; DORSSELAER, A. V.; DUCHESNE, M.; DIU-HERCEND, A. Proteomics analysis of brain tissue from an Alzheimer's disease mouse model by two-dimensional difference gel electrophoresis. **Neurobiology of Aging**, v. 28, p. 357-370, 2007.

SMITH, A. E.; ZHANG, Z.; THOMAS, C. R.; MOXHARM, K. E.; MIDDELBERG, A. P. J. The mechanical properties of *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America – PNAS**, v. 97, p.9871-9874, 2000.

SOBROVA, P.; ADAM, V.; VASATKOVA, N.; BEKLOVA, M.; ZEMAN, L.; KIZEK, R. Deoxynivalenol and its toxicity. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 3, p. 94–99, 2010.

SONG, G. Y.; CHUNG, B. H. Overproduction of human parathyroid hormone by fed-batch culture of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant lacking yeast aspartic protease 3. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 503–508, 1999.

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

SUDAKIN, D. L. Trichothecenes in environment: relevance to human health. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 97-107, 2003.

SWEENEY, M. J.; DOBSON, A. D. W. Molecular biology of mycotoxin biosynthesis. **FEMS Microbiology Letters**, v. 175, p. 149-163, 1999.

- SZUKUDELSKA, K.; SZKUDELSKI, T.; NOGOWSKI, L. Short-time deoxynivalenol treatment induces metabolic disturbances in the rat. **Toxicology Letters**, p. 25-31, 2002.
- TANAKA, K.; SAGO, Y.; ZHENG, Y.; NAKAGAWA, H.; KUSHIRO, K. Mycotoxins in Rica. **International Journal of Food Microbiology**, p. 59-66, 2007.
- TRITSCHER, A. M.; PAGE, S. W. The risk assessment paradigm and its application for trichothecenes. **Toxicology Letters**, v. 153, p.155-163, 2004.
- UENO, Y. Toxicology of microbial toxins. **Pure and Applied Chemistry**, v.58, p.339-350, 1986.
- VARGA, J.; PÉTERI, Z.; TÁBORI, K.; TÉREN, J.; VÁGVOLGYI, C. Degradation of ochratoxin A and other mycotoxins by *Rhizopus* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 321-328, 2005.
- WARTH, B.; SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; SCHUHMACHER, R.; FRUHMANN, P.; HAMETNER, C.; ADAM, G.; FROHLICH, J.; KRŠKA, R. Direct quantification of deoxynivalenol glucuronid in human urine as biomarker of exposure to the Fusarium mycotoxin deoxynivalenol. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, p. 195-200, 2011.
- WEN, S.; ZHANG, T.; TAN, T. Maximizing production of glutathione by amino acid modulation and high-cell-density fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 12, p. 2424-2428, 2006.
- WISEMAN, A. **Princípios de Biotecnologia**. Editorial Acribia, S. A., Zaragoza, p 252, 1986.
- XINGMIN L.; MILLSON, S.; COKER, R.; EVANS, I. A sensitive bioassay for the mycotoxin aflatoxin B1, which also responds to the mycotoxins aflatoxin G1 and T-2 toxin, using engineered baker's yeast. **Journal of Microbiological Methods**. v. 77, p. 285-291, 2009.
- YOSHISAWA, T. **Mycotoxin Analysis for Federative Republic of Brazil**. Japão: Training Course, p. 283, 2001.
- YOUNG, J.C.; SUBRYAN, L.M.; POTTS, D.; MCLAREN, M.E. Reduction in levels of deoxynivalenol in contaminated wheat by chemical and physical treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 461-465, 1986.
- ZACHARIASOVA, M.; LACINA, O.; MALACHOVA, A.; KOSTELANSKA, M.; POUSTKA, J.; GODULA, M.; HAJŠLOVA, J. Novel approaches in analysis of Fusarium mycotoxins in cereals employing ultra performance liquid chromatography coupled with high resolution mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, p. 51–61, 2010.
- ZAIN, M. E. Impact of mycotoxins on humans and animals. **Journal of Saudi Chemical Society**, p. 129–144, 2011.
- ZHANG, X.; JIANG, L.; GENG, C.; CAO, J.; ZHONG, L. The role of oxidative stress in deoxynivalenol-induced DNA damage in HepG2 cells. **Toxicol**, p. 513–518, 2009.

ZINEDINE, A.; SORIANO, J. M.; MOLTÓ, J. C. MAÑES, J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, p. 1–18, 2007.