



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química
Grupo de Análise Instrumental Aplicada - GAIA

**DETERMINAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS INOSINA
5' MONOFOSFATO (5'IMP) E GUANOSINA 5'
MONOFOSFATO (5'GMP) EM EXTRATO INDUSTRIAL DE
LEVEDURA UTILIZANDO A QUIMIOMETRIA E A
ESPECTROFOTOMETRIA**

REGINA ANDRÉIA FERRARI PEREIRA*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE PROFISSIONAL EM QUÍMICA, área de concentração: QUÍMICA TECNOLÓGICA.

Orientador: Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho

* Funcionária da Biorigin

São Carlos – SP

2014

Dedico esta dissertação, fruto de uma alegre experiência, aos meus pais Célia e Oswaldo pelo apoio, incentivo, ensinamentos e amor sem limites.

Aos meus irmãos Natália e André pelas constantes demonstrações de carinho e companheirismo.

Ao Elder pelo amor e companheirismo nos momentos de dúvida, dificuldade e alegria.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me dar força de vontade e saúde para conseguir superar os obstáculos e atingir meus objetivos.

Aos meus pais, Célia e Oswaldo, meus irmãos Natália e André pelo amor, por não medirem esforços e por sempre me apoiarem em todos os momentos. Sem vocês nada disso teria sido possível.

Ao Elder, pelo amor, carinho, companheirismo, ajuda nos momentos difíceis e constante preocupação com meu bem estar.

Ao Prof. Dr. Edenir Rodrigues Pereira Filho, pela excelente orientação, confiança, amizade e boa convivência. Agradeço todas as importantes sugestões para o trabalho e por contribuir para o meu crescimento profissional e pessoal.

À Rosangela, Vanderlei e Cássia do Centro de P&D Biorigin, pela oportunidade e incentivo em ingressar no Mestrado Profissional e poder desenvolver um projeto para a empresa em parceria com o Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos.

Ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro, pelas contribuições feitas para o trabalho durante os ensinamentos nas aulas de quimiometria.

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega e à Prof. Dra. Ana Rita de Araujo Nogueira pelas importantes sugestões durante as prévias apresentadas nas reuniões de grupo.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, por terem contribuído com minha formação durante o curso de Mestrado Profissional.

Aos membros da banca examinadora, pelas correções e importantes sugestões.

A todos os amigos e companheiros de trabalho do Centro de P&D Biorigin, pela amizade, solidariedade, troca de conhecimentos e sugestões para o trabalho.

Aos colaboradores do Laboratório de Controle de Qualidade da Biorigin da Unidade de Quatá por terem colaborado durante as realizações das análises deste trabalho.

A todos os companheiros de trabalho e amigos do Grupo de Análise Instrumental Aplicada (GAIA) pela convivência agradável e aprendizado.

À Amanda Augusto pela amizade e por ter colaborado muito durante minha estadia em São Carlos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos, pela oportunidade.

Às secretárias da pós-graduação Ariane, Cristina, Denise e Luciani, pelo atendimento e colaboração.

A todos que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, muito obrigada.

.A Biorigin acredita nesse tipo de parceria como uma das estratégias para acompanhar a fronteira tecnológica no mundo atual. De um lado, como setor produtivo, se beneficiando através da geração, reprodução e retroalimentação dos processos de aprendizagem convertendo-os em atividades inovadoras e do outro a Universidade, se beneficiando do conhecimento sobre o funcionamento e as necessidades das empresas para os quais ela deve estar formando recursos humanos.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP	Amostra de processo
5'AMP	Adenosina 5'monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
β	Beta
CQ	Amostra Controle de Qualidade
DAD	Diode Array Detector
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EX	Extrato de levedura
5'GMP	Guanosina 5'monofosfato
GWH	Giga Watts Hora
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
5'IMP	Inosina 5'monofosfato
LA	Levedura autolisada
LI	Levedura íntegra
MSG	Glutamato monossódico
HPLC- MS/MS	High Performance Liquid Chromatography com detecção por espectrometria de massas
NaCl	Cloreto de sódio
nm	Nanômetro
ND	Não detectado
PA	Produto A
PB	Produto B
PC	Parede celular de levedura
PC's	Componentes principais

PCA	Análise de componentes principais (Principal components analysis)
PCR	Regressão por componentes principais (Principal Components regression)
PLS	Regressão por mínimos quadrados parciais (Partial least squares)
P&D	Centro de Pesquisa e Desenvolvimento
UQT	Unidade de Quatá
RMSEC	Raiz quadrada do erro médio de calibração (Root mean square error of calibration)
RMSECV	Raiz quadrada do erro médio de validação (Root mean square error of Cross-validation)
RNA	Ácido ribonucleico
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV-Vis	Espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta e visível
VL	Variáveis latentes
X	Matriz das variáveis independentes
Y	Matriz das variáveis dependentes

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - Composição química de derivados de levedura.....	12
TABELA 3.2 - Perfil de aminoácidos em diferentes derivados de levedura.	13
TABELA 3.3 - Composição mineral em diferentes derivados de levedura.	14
TABELA 3.4 - Concentração típica de vitaminas do complexo B em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
TABELA 3.5 - Técnicas empregadas na determinação dos compostos 5'IMP e 5'GMP.	20
TABELA 5.6 - Dados e informações do modelo de regressão (calibração e validação) das Amostras de processo (AP).....	35
TABELA 5.7 - Dados e informações do modelo de regressão (calibração e validação) e cromatografia para as amostras do Produto A (PA).....	40
TABELA 5.8 - Dados e informações do modelo de regressão (calibração e validação) do Produto B (PB).	44
TABELA 5.9 - Benefícios futuros advindos da presente dissertação de mestrado profissional.	47

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 3.1 - Divisão celular da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , seus brotos e cicatrizes.	7
FIGURA 3.2 - Processos realizados na biomassa de levedura (a) para a obtenção dos produtos: levedura autolisada (b), parede celular (c) e material intracelular para a produção dos extratos (d).....	11
FIGURA 4.3 - Projeção das componentes principais (PC's).	27
FIGURA 5.4 - Espectros de absorção na faixa de 200 a 350 nm das soluções de 5'IMP (20 µg/mL), 5'GMP (20 µg /mL) e a mistura dos dois compostos em pH 4,0. .	32
FIGURA 5.5 - Coeficientes de regressão com 3 componentes principais ou variáveis latentes do modelo de regressão, utilizando o PLS das Amostras de processo.	33
FIGURA 5.6 - Resultados de validação das análises de Amostras de processo realizadas pelos Modelos de regressão <i>versus</i> Cromatografia.....	34
FIGURA 5.7 - Análise de monitoramento das Amostras de processo.....	36
FIGURA 5.8 - Análise de monitoramento das Amostras de processo (AP) colocadas por ordem crescente de concentração de 5'IMP + 5'GMP (%) provenientes da cromatografia.	37
FIGURA 5.9 - Coeficientes de regressão do modelo de regressão do Produto A, utilizando o PLS e 3 variáveis latentes.....	38
FIGURA 5.10 - Resultados de validação para o Produto A das análises realizadas pelos Modelos de regressão <i>versus</i> Cromatografia.	39
FIGURA 5.11 - Análise de monitoramento do Produto A.	41
FIGURA 5.12 - Coeficientes de regressão do modelo de regressão do Produto B, utilizando o PLS e 3 variáveis latentes.....	42
FIGURA 5.13 - Resultados de validação das análises realizadas pelos Modelos de regressão <i>versus</i> Cromatografia do Produto B.	43
FIGURA 5.14 - Análise de monitoramento do Produto B.	45
FIGURA 5.15 - Resultados obtidos através do Modelo de regressão, <i>versus</i> resultados obtidos pela Cromatografia.	46

RESUMO

DETERMINAÇÃO DOS NUCLEOTÍDEOS INOSINA 5' MONOFOSFATO (5'IMP) E GUANOSINA 5' MONOFOSFATO (5'GMP) EM EXTRATO INDUSTRIAL DE LEVEDURA UTILIZANDO A QUIMIOMETRIA E A ESPECTROFOTOMETRIA

Está sendo proposto neste trabalho, um método espectrofotométrico para determinar simultaneamente os compostos Inosina 5'monofosfato (5'IMP) e Guanosina 5'monofosfato (5'GMP) em extratos de levedura seco (produto final) e em amostras do processo, utilizando a técnica de espectrofotometria UV-Vis combinada com ferramentas quimiométricas. Atualmente, 5'IMP e 5'GMP podem ser determinados por métodos cromatográficos que possuem um alto custo operacional (equipamento, consumíveis e manutenção) e demandam maior tempo para a obtenção dos resultados. Assim, o desenvolvimento de métodos que possibilitem uma quantificação rápida desses compostos e com menor custo é importante do ponto de vista industrial, principalmente no que diz respeito ao controle de processos. O 5'IMP e o 5'GMP possuem absorção em comprimentos de onda muito próximos (248 e 253 nm, respectivamente), havendo uma sobreposição dos espectros de UV-VIS. Utilizou-se o programa *Pirouette* versão 4.5 para aplicar as ferramentas quimiométricas, sendo que os resultados cromatográficos foram usados para a calibração dos modelos de regressão. O procedimento experimental baseou-se na diluição das amostras e obtenção dos espectros na faixa de 200 a 350 nm. Aplicou-se análise exploratória a partir da PCA (*Principal component analysis*) e o método de calibração PLS (*Partial least squares*). Três tipos de pré-processamentos foram utilizados para o cálculo do modelo PLS: normalização dos espectros, primeira derivada e centrar os dados na média. Os modelos de regressão foram validados com amostras diferentes das utilizadas nos modelos. O método proposto constitui-se em uma estratégia simples e de baixo custo para a quantificação dos compostos 5'IMP e 5'GMP em amostras derivadas de levedura, como extrato de levedura (produto final) e amostras das fases do processo, aumentando a assertividade do processo e produtividade da empresa.

Palavras chave: Quimiometria, Espectrofotometria, Nucleotídeos, Inosina 5'monofosfato (5'IMP), Guanosina 5'monofosfato (5'GMP).

ABSTRACT

CHEMOMETRICS TOOLS TO DETERMINE THE NUCLEOTIDES INOSINE 5'-MONOPHOSPHATE (5'IMP) AND GUANOSINE 5'-MONOPHOSPHATE (5'GMP) IN INDUSTRIAL YEAST EXTRACT USING SPECTROPHOTOMETRY AND CHEMOMETRIC TECHNIQUES

It has being proposed in this paper, a spectrophotometric method to determine simultaneously the compounds Inosine 5 'monophosphate (5'IMP) and guanosine 5' monophosphate (5'GMP) in extracts of dry yeast (final product) and process samples using UV-Vis spectrophotometry technique combined with chemometric tools. Nowadays, 5'IMP and 5'GMP can be determined by chromatographic methods which have high operational costs (equipment, consumables and maintenance) and require more time due to the time spent in obtaining the results. Thus, developing methods that provide a fast quantification of compounds at a lower cost is important from the industrial point of view, mainly regarding processes control. The 5'IMP and 5'GMP have absorption wavelength very close (248 and 253nm, respectively), with UV-Vis spectrum overlap. Pirouette software version 4.5 was used to apply chemometric tools, using chromatographic results for the calibration of the regression models. The experimental procedure was based in dilution of the samples and obtaining spectra in the range of 200 to 350 nm. Exploratory analysis was applied from the PCA (Principal Component Analysis) and method of calibration PLS (Partial Least Squares). Three types of pre-processing were used to calculate the PLS models: normalization of the spectrum, first derivative and centering the datas. The calibrating models were validated with different samples from the ones used in the models. The proposed method sets up a simple and low cost strategy to identify the compounds 5'IMP and 5'GMP derivatives from yeast samples increasing the process assertivity, and company productivity.

Keywords: Chemometric, Spectrophotometric Method, Nucleotides, Inosine 5'-Monophosphate (5'IMP), Guanosine 5'-Monophosphate (5'GMP)

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	2
2 - OBJETIVO E MOTIVAÇÃO.....	5
3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.1- <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
3.2- Processos de produção dos derivados de levedura	8
3.2.1- Crescimento microbiano	8
3.2.2- Autólise.....	8
3.2.3- Centrifugação	9
3.2.4- Tratamentos.....	9
3.2.5- Evaporação e Secagem	10
3.2.6- Composição química das células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
3.2.7- Extratos de levedura	15
3.2.8- Aplicação dos extratos de levedura na indústria alimentícia.....	16
3.2.9- Umami	17
3.2.10- Nucleotídeos.....	18
3.2.11- Métodos para quantificação de 5'IMP e 5'GMP	19
3.2.12- Técnicas aplicadas ao tratamento dos dados analíticos.....	20
3.2.13- Quimiometria	21
4 - MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1- Amostras.....	23
4.1.1- Amostra controle.....	24
4.2- Soluções e Reagentes	24
4.3- Equipamentos e acessórios.....	24
4.4- Procedimento Experimental.....	25
4.4.1- Perfil espectrofotométrico do 5'IMP e 5'GMP	25
4.4.2- Pesagem e diluição das amostras	25
4.4.3- Varredura no Espectrofotômetro.....	25
4.5- Tratamento dos dados	25
4.5.1- Métodos de Análise Multivariada	26
4.5.2- Análise de Componentes Principais	26
4.5.3- Calibração multivariada	27
4.5.4- Pré-processamento dos dados	29

4.6- Monitoramento do método	30
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1- Perfil espectrofotométrico do 5'IMP e 5'GMP	32
5.2- Modelo de regressão	32
5.3- Amostras de processo (AP)	33
5.3.1- Modelo de regressão (AP)	33
5.3.2- Modelo de validação (AP).....	34
5.3.3- Monitoramento (AP).....	35
5.4- Produto A (PA).....	37
5.4.1- Modelo de regressão (PA).....	37
5.4.2- Modelo de validação (PA).....	38
5.4.3- Monitoramento (PA).....	40
5.5- Produto B (PB).....	41
5.5.1- Modelo de regressão (PB).....	41
5.5.2- Modelo de validação (PB).....	42
5.5.3- Monitoramento (PB).....	44
5.6- Avaliação da Amostra Controle.....	45
5.7- Benefícios futuros	46
6 - CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

Atualmente as leveduras estão sendo exploradas comercialmente através de seus constituintes como enzimas, nucleotídeos, proteínas, aminoácidos, betaglucana e mananas. Esses componentes quando isolados, apresentam propriedades específicas de interesse em ciência de alimentos e nutrição [1].

Os derivados de levedura são obtidos através de processos biotecnológicos, onde são utilizados sistemas celulares para o desenvolvimento dos processos industriais. Os derivados obtidos são: levedura inativa seca (levedura íntegra), levedura autolisada (proveniente da quebra enzimática ou ruptura mecânica), parede celular e extrato de levedura, onde os dois últimos são provenientes da centrifugação da levedura autolisada. O extrato de levedura é constituído da porção solúvel obtida através do processo de autólise da biomassa proveniente do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Esse extrato é um ingrediente bastante utilizado pela indústria alimentícia em molhos, sopas, salgadinhos, embutidos, entre outros, além de ser considerado um suplemento nutritivo devido a sua composição nutricional [1, 2, 3]. O extrato de levedura possui: proteínas, aminoácidos, vitaminas do complexo B, micro e macroelementos e RNA. Essa composição ajuda a melhorar o sabor dos alimentos. Alguns extratos possui em sua composição uma elevada concentração de RNA que, através de processos biotecnológicos, obtém-se os nucleotídeos 5'IMP e 5'GMP. Esses são responsáveis pela intensificação natural do sabor original do alimento promovido pelo sabor umami.

Atualmente, esses compostos são determinados analiticamente nas indústrias alimentícias através de técnicas cromatográficas com detecção por arranjo de diodos. A técnica de espectrofotometria UV-Vis combinada com ferramentas quimiométricas pode ser utilizada na quantificação desses compostos. As técnicas cromatográficas (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) apresentam um alto custo operacional e de manutenção. Assim, a proposição de outros métodos analíticos para a determinação de nucleotídeos em extratos de levedura é uma necessidade premente na indústria de alimentos.

Com destaque na produção de extratos de levedura, a Biorigin é uma empresa brasileira, que mobiliza conhecimentos e tecnologia para promover saúde e bem estar. Utilizando processos biotecnológicos, produz ingredientes naturais

que intensificam o sabor, auxiliam na redução de sódio, extensão da vida útil dos alimentos, enriquecimento nutricional de rações e substitutos de antibióticos para uso animal.

A Biorigin é uma unidade de negócios da Zilor, companhia com mais de 65 anos de experiência e uma das maiores produtoras brasileiras de etanol, açúcar e energia elétrica a partir da cana-de-açúcar.

Foi fundada em 2003 e em 2008 adquiriu as empresas *PTX Food Corporation* nos Estados Unidos e *Immunocorp Animal Health*, na Noruega, ampliando e fortalecendo sua presença no Brasil e no mundo.

A Biorigin conta também com um Centro de Pesquisa e Desenvolvimento próprio, com três laboratórios e equipamentos de alta tecnologia para o desenvolvimento de novos produtos. A empresa mantém parcerias com universidades e com os mais conceituados institutos de pesquisa em biotecnologia no Brasil e no exterior.

É nesse contexto de inovação que surgiu a parceria Biorigin – UFSCar para o desenvolvimento do método analítico, objeto desse trabalho. Todo o trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Físico-Química do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento (Lab. P&D) onde a autora trabalha, em parceria com o Laboratório de Controle de Qualidade Biorigin, Unidade Quatá (Lab. UQT).

Capítulo 2

OBJETIVO E MOTIVAÇÃO

2 - OBJETIVO E MOTIVAÇÃO

Este projeto de mestrado profissional teve como objetivo o desenvolvimento de um método para a determinação dos compostos 5'IMP e 5'GMP em extratos de levedura, utilizando a técnica de espectrofotometria UV-Vis combinada com ferramentas quimiométricas no tratamento de dados multivariados. Essa combinação possibilita a determinação simultânea dos dois compostos nas misturas e permite a diferenciação destes, mesmo com sobreposição espectral. A principal função desse método é a sua aplicabilidade durante o monitoramento do processo de produção de extratos de levedura, por ser um método rápido para a quantificação de 5'IMP e 5'GMP em substituição ao método cromatográfico que hoje é utilizado, que apresenta alto custo e baixa frequência de amostragem.

O foco do trabalho é torná-lo prático, aplicar em escala industrial o conhecimento gerado e adquirido na universidade.

Capítulo 3

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1- *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* faz parte do reino fungi, da família da *Saccharomycetaceae* e o gênero é *Saccharomyces*. Essas leveduras são organismos unicelulares, nos quais a própria célula cumpre as funções vegetativas e reprodutivas. As leveduras são fungos eucarióticos, que se desenvolvem em meios de cultivo especiais formando colônias do tipo leveduriformes, que são de maneira geral, pastosas ou cremosas, características de seu grupo. A *Saccharomyces cerevisiae* pertence ao grupo dos ascomicetos sendo uma levedura gemulante típica. Do ponto de vista morfológico, possuem aproximadamente 8 μm de diâmetro, sendo que este diâmetro varia de acordo com os nutrientes, condições ambientais, o estado fisiológico e a idade das células [4, 5, 6].

A divisão celular da *Saccharomyces cerevisiae* é geralmente assexuada, por brotamento multilateral ou gemulação. No processo de brotamento, uma nova célula denominada broto é formada como uma pequena protuberância da célula de origem. Este por sua vez, cresce e através da divisão do núcleo da célula-mãe, recebe um núcleo e se separa, causando uma cicatriz na parede da levedura [4, 7, 8]. Na figura 3.1, pode ser visualizada a divisão celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seus brotos e cicatrizes.

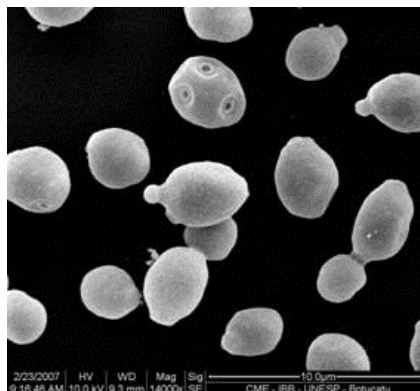


FIGURA 3.1 - Divisão celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, seus brotos e cicatrizes.

Fonte: Esta imagem foi gentilmente cedida pela Biorigin.

Uma célula de levedura viva requer energia para realizar suas funções. A fonte desta energia são os nutrientes absorvidos pelas células como a glicose, que é altamente energética, e sua quebra libera a energia armazenada nas ligações químicas. As ligações químicas desses nutrientes são degradadas (catabolismo) sendo a energia liberada em forma de energia química, ATP (Adenosina trifosfato) [4, 6, 9].

A espécie *Saccharomyces cerevisiae*, em suas diversas linhagens, é explorada para fins industriais. É utilizada no processo de fermentação do álcool, cerveja e para a produção de biomassa de levedura. As leveduras têm vantagens em processos biotecnológicos, em relação a outros microrganismos, pela sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos, alta velocidade de crescimento e por sua biomassa ser facilmente extraída [4, 5, 6].

3.2- Processos de produção dos derivados de levedura

Para a produção dos derivados de levedura destacam-se as etapas operacionais que serão discutidas nos próximos itens [10].

3.2.1- Crescimento microbiano

O crescimento microbiano da *Saccharomyces cerevisiae* para a produção de biomassa é realizado a partir do processo de cultura pura. Ocorre na presença do oxigênio, podendo assim ser chamada de respiração aeróbia. A biomassa é composta por células íntegras (LI) e pode ser seca originando produtos de levedura íntegra ou ser submetida a autólise.

3.2.2- Autólise

O processo de produção dos extratos se dá através da autólise da biomassa de levedura. Cada extrato de levedura possui uma característica, dessa forma, parâmetros diferenciados são aplicados durante o processo. Através de condições específicas de temperatura (45°C a 50°C aproximadamente) e pH (pH ótimo de acordo com o produto) os compostos intracelulares são liberados através da parede celular da levedura [11,12]. A biomassa autolisada é constituída basicamente por parede celular (fração insolúvel da célula) e compostos intracelulares (constituintes solúveis da célula), que após passar pelo processo de

autólise é denominado extrato de levedura. O processo de autólise é irreversível e ocorre a partir da ação sinérgica das enzimas endógenas (glucanases, manases e quitinases) da própria célula [13].

A definição dos parâmetros para o rompimento celular é de grande importância na obtenção do extrato de levedura. Os extratos obtidos por processos de autólise apesar de mais demorado que o processo mecânico de ruptura celular, confere características de perfil sensorial superiores aos produtos provenientes da ruptura mecânica [10].

De acordo com o produto que será produzido, a levedura autolisada pode ser diretamente seca, classificando-se como levedura autolisada (LA), ou ser submetida ao processo de centrifugação para dar sequência a outros produtos.

3.2.3- Centrifugação

A biomassa autolisada encaminhada para a centrifugação tem sua parede celular separada do material intracelular da levedura.

A parede celular pode ser diretamente seca, classificando-se como parede celular de levedura (PC) ou submetida a outros processos dependendo do produto que será produzido.

O material intracelular segue para diferentes tratamentos para posterior produção dos extratos (EX).

3.2.4- Tratamentos

Para a obtenção do produto extrato de levedura, o material intracelular é submetido a diferentes tratamentos, ou seja, processos com parâmetros específicos de acordo com cada produto (pH, temperatura, entre outros). O resultado são os diversos tipos de extratos de levedura que podem ser produzidos.

O material oriundo da parede celular também pode ser submetido a diferentes processos para obtenção de diversos produtos, ricos em polímeros de β -glucanas (ligações β -1,3 e β -1,6), mananas, proteínas, lipídios, quitina e minerais [2].

3.2.5- Evaporação e Secagem

Após os tratamentos específicos, o material da parede celular é seco em *spray dryer*. O extrato de levedura é concentrado e posteriormente seco em *spray dryer*, onde o produto é pulverizado em um ambiente de ar quente e seco, que promove a evaporação da água resultando em um pó fino com umidade entre 5 a 7%. A coloração do extrato de levedura é amarelo claro, com rendimento de 50 a 60% [14].

A Figura 3.2 ilustra os processos realizados na biomassa de levedura para a obtenção de diferentes produtos onde, (a) célula íntegra de levedura proveniente do crescimento microbiano, (b) levedura autolisada, obtida através da quebra enzimática, (c) parede celular de levedura (parte insolúvel) (d) material intracelular para produção do extrato de levedura (parte solúvel).

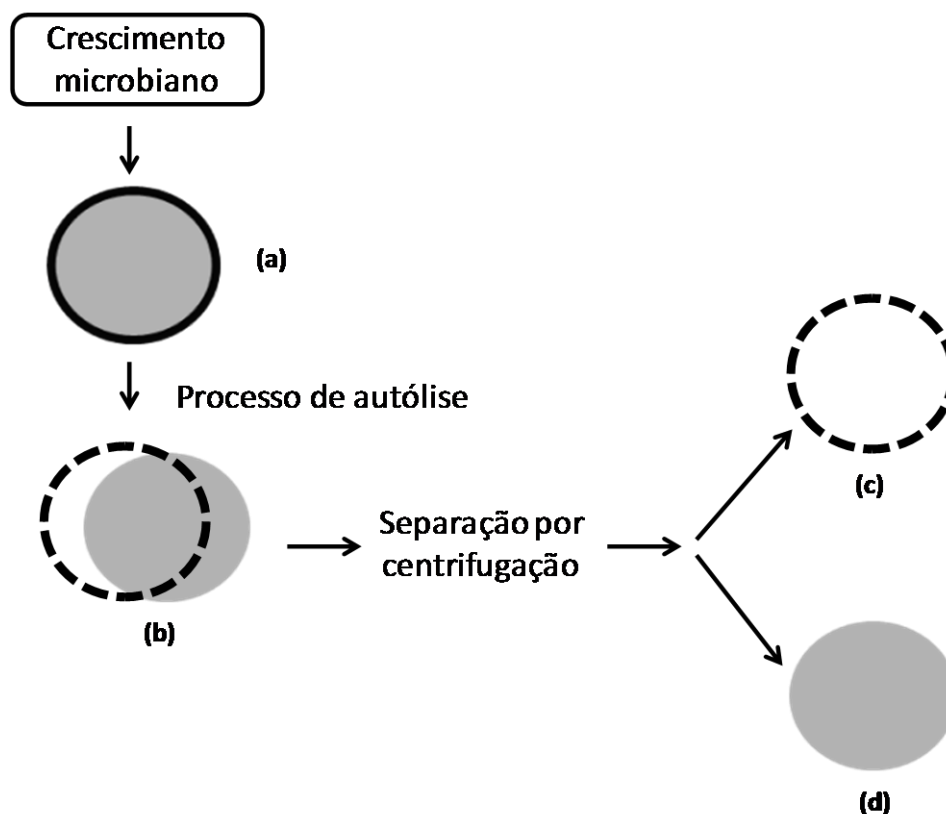


FIGURA 3.2 - Processos realizados na biomassa de levedura (a) para a obtenção dos produtos: levedura autolisada (b), parede celular (c) e material intracelular para a produção dos extratos (d).

3.2.6- Composição química das células de *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae possui teores de RNA entre 6 a 8% com base no peso seco, proteínas de 40 a 48%, podendo chegar a 60% no extrato de levedura, aminoácidos, lipídeos, minerais, fibras, carboidratos, glucanas, mananas, e vitaminas do complexo B [5, 12, 14].

Devido a essa composição, estas leveduras têm diversas finalidades nutricionais. Quando incorporadas aos alimentos, os produtos derivados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* são considerados ingredientes de elevado valor nutricional. Além de serem usados para alimentação humana (como ingredientes), são usados em nutrição animal (rações e suplementos). Alguns derivados são também considerados antioxidantes, promotores de crescimento (nutrição animal), aglutinadores de patógenos e sequestrantes de micotoxinas [1, 2, 15].

A composição química em diferentes derivados de *Saccharomyces cerevisiae* como Células íntegras (LI), Levedura autolisada (LA), Extrato de levedura (EX), Parede celular (PC) podem ser observadas nas tabelas que serão discutidas nessa sessão. A Tabela 3.1 mostra o perfil da composição dos derivados de levedura.

TABELA 3.1 - Composição química de derivados de levedura.

Componente (%)*	LI	LA	EX	PC
Proteína (N x 5,8)	48,74	46,45	61,54	32,70
RNA	5,70	7,80	6,90	1,83
Lipídios	3,33	3,30	1,89	4,54
Cinzas	8,55	8,83	12,50	4,43
Fibra total	24,40	25,03	2,70	55,04
Fibra solúvel	22,52	24,76	2,70	31,59
Fibra insolúvel	1,88	0,27	0,00	23,45

Fonte: [11]

*Resultados em base seca.

O perfil de aminoácidos dos derivados de levedura é mostrado na Tabela 3.2. A elevada concentração de ácido glutâmico é importante no extrato de levedura, pois em sinergismo com os nucleotídeos 5'IMP e 5'GMP promovem uma maior percepção do sabor umami [11].

TABELA 3.2 - Perfil de aminoácidos em diferentes derivados de levedura.

Aminoácidos (mg/100mg Proteína)	LI	LA	EX	PC
Ácido aspártico	11,98	11,11	11,81	10,14
Treonina	6,16	5,84	5,19	7,81
Serina	6,13	6,44	5,57	9,08
Ácido glutâmico	13,15	12,53	13,40	13,88
Prolina	4,45	4,72	4,62	5,39
Glicina	4,93	4,99	5,14	4,06
Alanina	7,07	7,59	8,97	7,19
Cistina	0,84	0,90	1,30	1,45
Valina	6,20	5,87	6,76	5,61
Metionina	2,50	1,21	1,26	1,56
Isoleucina	5,64	4,87	5,69	5,27
Leucina	8,84	7,80	8,07	7,65
Tirosina	4,68	3,57	2,17	2,21
Fenilalanina	5,30	4,96	4,74	4,72
Lisina	7,13	9,54	8,58	8,31
Histidina	2,06	3,15	3,01	2,24
Arginina	4,11	2,40	1,01	1,78
Triptofano	1,45	1,55	1,31	-

Fonte: [11].

A Tabela 3.3 fornece a composição dos macro e microelementos nos derivados de levedura.

TABELA 3.3 - Composição mineral em diferentes derivados de levedura.

Elementos (mg/100g)	AT	EX	PC	Recomendação*
Sódio	605,0 ± 10,0	1475,5 ± 35,5	136,0 ± 2,0	2000
Cálcio	412,6 ± 12,0	99,0 ± 3,6	883,0 ± 15,0	1200
Magnésio	161,8 ± 2,5	264,0 ± 9,3	31,4 ± 0,3	350
Fósforo	1178,5 ± 19,5	1927 ± 33,0	308,0 ± 5,0	1200
Potássio	1365,5 ± 31,5	1877,5 ± 56,5	173,0 ± 3,0	2500
Ferro	10,0 ± 0,1	4,5 ± 0,3	56,0 ± 6,0	10-15
Manganês	3,7 ± 0,07	5,0 ± 0,1	5,6 ± 0,5	2-5
Zinco	4,0 ± 0,3	6,4 ± 0,4	6,8 ± 0,5	10-15
Cobre	0,6 ± 0,03	0,6 ± 0,06	2,8 ± 0,1	2-3
Cobalto	0,3 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,24 ± 0,03	----
Cromo	0,3 ± 0,04	0,6 ± 0,03	1,8 ± 0,1	0,2

Fonte: [11].

* Requerimento diário, conforme NAS (*National Academic of Science*) [16], para adultos.

Saccharomyces cerevisiae são fontes de vitaminas do complexo B. As sínteses das vitaminas dependem das espécies e condições aplicadas no processo de respiração (crescimento microbiano) [17]. As concentrações são mostradas na Tabela 3.4.

TABELA 3.4 - Concentração típica de vitaminas do complexo B em *Saccharomyces cerevisiae*.

Vitaminas (mg/100g)	Faixas de concentração determinadas
B1	2,9 – 9,0
B2	Não detectado (ND)
B6	ND
PP	19,0 – 58,50
Ácido pantotênico	11,8 – 19,8
Ácido fólico	1,9 – 3,5
Biotina	0,05 – 0,18
B12	ND

Fonte: [17]

3.2.7- Extratos de levedura

Segundo Révillion et al. [15], alguns derivados de leveduras constituem-se em uma matéria-prima de baixo custo quando provenientes de subprodutos das indústrias de bebidas fermentadas e sucoalcooleiras.

Para se obter uma biomassa com características nutricionais mais específicas, é necessário um controle microbiológico rígido e total domínio da cadeia produtiva. Assim, torna-se atraente a produção da levedura *Saccharomyces cerevisiae* por cultura pura, possibilitando o desenvolvimento de novos produtos, entre eles, o extrato de levedura [15].

O extrato de levedura pode ser comercializado nas formas líquidas, em pasta ou mais comumente em pó. O produto líquido tem 50 a 65% de matéria seca, a pasta 80%, o produto em pó em torno de 96%. O extrato possui características e aplicações diferentes, de acordo com o tipo de processo e tratamento aplicado.

Os extratos de levedura contêm em sua composição: fibras, aminoácidos, proteínas, minerais, vitaminas do complexo B e nucleotídeos [10, 12].

As leveduras são comercializadas para diversas aplicações podendo ou não ser acrescidos de sal (cloreto de sódio), teores de aminoácidos e nucleotídeos 5'IMP e 5'GMP variados, de acordo com a sua aplicação. [10].

Devido a sua composição, os extratos de levedura podem ser aplicados em alimentos para intensificar as características sensoriais dos alimentos nos quais são adicionados, conferindo corpo e *mouthfeel*. Alguns extratos de levedura ricos em 5'IMP e 5'GMP promovem o sabor umami [1, 2, 15], o qual, intensifica o doce e o salgado e arredonda o sabor do amargo e o ácido [11, 18]. O sinergismo entre o 5'IMP e 5'GMP em conjunto com o ácido glutâmico já presente na levedura é mais potencializador que as moléculas sozinhas ou em conjunto.

Sensorialmente, o limiar de detecção (*threshold*) do 5'IMP e do 5'GMP são de 0,025 e 0,0125g/100mL. Em misturas de 50:50 de 5'IMP e 5'GMP a detecção ocorre com 0,0063% (0,0063g/100 mL), o que mostra o efeito sinérgico entre eles [19].

3.2.8- Aplicação dos extratos de levedura na indústria alimentícia

No preparo das formulações nas indústrias alimentícias, extratos de levedura são ingredientes adicionados aos alimentos com o objetivo de aumentar a proteína alimentar, as concentrações de vitaminas do complexo B, melhorar e intensificar o sabor e aroma dos alimentos, além da possibilidade da utilização de extratos de sabores direcionados.

Cada extrato de levedura possui sabor e características diferenciadas, dessa forma, cada um tem uma aplicação específica, contribuindo sensorialmente para os produtos finais. Através da reação de *Maillard*, proporcionada a alguns extratos, é possível obter notas de sabores direcionados como os de carne, carne tostada, frango, com a vantagem de proporcionarem sabores cárneos sem a presença de proteína animal. Os extratos de levedura são aplicados na fabricação de embutidos como salsichas, presunto, mortadela, molhos, sopas desidratadas, *snacks*, batata chips, patês. Em produtos cárneos, podem ser adicionados antes do congelamento para a prevenção de oxidação de lipídios e perda da solubilidade das proteínas cárneas, durante seu armazenamento [1, 2, 20, 21].

Com as formulações obtêm-se uma sensível alteração nas propriedades sensoriais, que é perceptível no sabor que fica mais encorpado e intenso, devido à presença de todos os compostos que constituem os extratos de levedura, além do sabor umami proporcionado pelos nucleotídeos 5'IMP e 5'GMP encontrados em sua composição.

Estudos publicados em 1999 e 2000 comprovam a eficiência do extrato de levedura visando à redução do emprego de sal em vários produtos no qual é adicionado [15]. Devido ao poder palatilizante do sal, as indústrias abusam do seu teor na formulação dos alimentos e levam o consumidor a ingerir sódio em excesso. Entretanto, formulações preparadas com extrato de levedura mostram que é possível melhorar o perfil de sabor de um produto, reduzindo significativamente o teor de sal sem gerar impactos significativos na percepção do sabor salgado quando comparados com amostras padrões [2, 22].

A quantidade de extrato de levedura necessário na aplicação de produtos é de 0,1% a 5,0% no produto final. Dessa forma, é possível reduzir a quantidade de sal no alimento em até 70% substituindo-o por uma pequena porcentagem de extrato, sem alteração no perfil sensorial [2,10].

O gosto umami dos nucleotídeos é uma valiosa ferramenta para melhorar o consumo alimentar de pessoas com especialidades nutricionais como os diabéticos e idosos [22]. Com o aumento da idade média da população, o estímulo para a utilização dos produtos que melhoram o sabor dos produtos aumenta. Com o passar dos anos, é inevitável que o idoso perca a capacidade de perceber cheiros e sabores, reduzindo o consumo de alimentos e conseqüentemente diminuindo a ingestão de nutrientes necessários [23]. Diante desse contexto, é possível esperar uma crescente demanda por esses produtos [15].

3.2.9- Umami

Em 1908 o cientista Kikunae Ikeda professor da Universidade de Tóquio verificou que o caldo feito com alga marinha de kombu possuía um sabor diferente dos já conhecidos. Investigando a substância na qual lhe proporcionava esse sabor, ele identificou que o glutamato monossódico (MSG) era responsável pela palatabilidade do caldo. O prof. Ikeda denominou esse sabor de umami. Logo, outros pesquisadores descobriram que além do glutamato outros compostos também possuíam o sabor umami. Em 1913 Shintaro Kodama, isolou o monofosfato de inosina (IMP) contido na espécie de peixe denominada de Atum Bonito. Em 1957 Akira Kuninaka isolou o monofosfato de guanosina (GMP) a partir do caldo de cogumelos shiitake. Em seguida, foi descoberto que os compostos IMP e GMP são encontrados em maior quantidade em extratos de levedura nas formas 5'IMP e

5'GMP. Em 1960 houve a descoberta do efeito sinérgico causado entre a mistura de 5'IMP, 5'GMP e MSG [24].

Umami é considerado o quinto sabor do paladar humano. É associado a sensação de paladar melhorado. Ele intensifica o paladar aumentando a suavidade e a continuidade do sabor dos alimentos. Embora seja uma substância que não possui sabor próprio, tem a capacidade de melhorar e potencializar o sabor dos alimentos no qual é incorporado [25].

Recentes estudos revelaram o Mapa Cerebral dos sabores ao identificar os neurônios ativados durante a estimulação gustativa de camundongos. O córtex gustativo é a região cerebral responsável por processar os gostos. No experimento realizado em camundongos, foi utilizado cálcio como marcador de ativação dos neurônios. O cálcio foi injetado no cérebro dos animais. Cada sabor (salgado, doce, amargo e umami) ativou uma região específica no córtex gustativo, exceto o sabor azedo. A atividade neural aumenta de acordo com a concentração da substância na região do córtex gustativo. A substância foi monitorada por um microscópio fluorescente com raios infravermelhos gerando uma imagem detalhada dos neurônios. Pesquisadores acreditam que o ponto responsável pelo sabor azedo deve ficar em outra região do cérebro [23].

3.2.10- Nucleotídeos

Os nucleotídeos são os constituintes dos ácidos nucleicos: ácido desoxirribonucleico (DNA) e o ácido ribonucleico (RNA). São responsáveis pelo armazenamento e transferência de informações genéticas do organismo [14]. A sequência nucleotídica do DNA da célula especifica a sequência nucleotídica de cada RNA [26].

A constituição dos nucleotídeos é caracterizada por cadeias polinucleotídicas, unidas por ligações fosfodiéster. Cada nucleotídeo consiste em uma base nitrogenada, uma pentose e um ou mais grupos fosfato [14, 26].

As bases nitrogenadas que compõem a cadeia de RNA são: adenina, guanina, citosina e uracila. Através de hidrólises enzimáticas do RNA da levedura se obtém os nucleotídeos 5'UMP (uracila 5'monofosfato), 5'GMP (guanosina 5'monofosfato), 5'AMP (adenosina 5'monofosfato), 3'GMP (guanosina 3'monofosfato), 2'GMP (guanosina

2' monofosfato) e 3'AMP (adenosina 3' monofosfato) [2, 12, 14]. O 5'AMP é o precursor do inosinato, através da sua conversão a 5'IMP por meio da ação da enzima *deaminase adenílica* obtida de *Aspergillus oryzae* [20].

Assim, os ácidos nucleicos são fonte dos 5' nucleotídeos encontrados na levedura, onde, o 5'GMP e o 5'IMP possuem capacidade de intensificar o gosto e o aroma dos alimentos [2, 12, 14].

As bases nucleotídicas absorvem radiação UV, e os nucleotídeos são caracterizados pela absorção em comprimentos de onda próximos a 260 nm [26].

3.2.11- Métodos para quantificação de 5'IMP e 5'GMP

A literatura apresenta diversos métodos analíticos para determinação dos compostos 5'IMP e 5'GMP em alimentos. Normalmente são utilizadas técnicas cromatográficas. Suas vantagens são a boa precisão, repetibilidade e confiabilidade. Entretanto, apresentam algumas desvantagens como, tempo de análise, alto custo operacional, baixo rendimento da coluna, e custos com coluna cromatográfica. No entanto, como é possível observar na Tabela 3.5, técnicas espectrofotométricas também podem ser aplicadas na quantificação desses compostos.

TABELA 3.5 - Técnicas empregadas na determinação dos compostos 5'IMP e 5'GMP.

Técnicas utilizadas para determinação	Referências
HPLC - (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) com detecção por arranjo de diodos.	[19]
HPLC - MS/MS - (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>) com detecção por espectrometria de massas.	[27 - 30]
Técnicas espectrofotométricas	[3, 31, 32]

3.2.12- Técnicas aplicadas ao tratamento dos dados analíticos

Atualmente com a utilização de instrumentos modernos, é possível obter medidas de inúmeras variáveis registradas em um único espectro de uma amostra. O tratamento para essa quantidade de dados requer mais sofisticação, tal como a necessidade de ferramentas matemáticas e estatísticas que possam extrair as informações relevantes de um grande conjunto de dados de natureza multivariada [33].

Análise de dados por métodos multivariados são mais adequados, pois independente da existência ou ausência de diferenças espectrais e alta correlação entre os dados, se pode estudar ao mesmo tempo várias espécies presentes. É possível identificar problemas na linha de base ou interferentes nas amostras utilizadas no modelo de calibração [34].

Concentrações de analitos de interesse em uma amostra em experimentos envolvendo análise espectrofotométrica normalmente são determinadas pela Lei de Beer. A partir de soluções padrões, curvas analíticas são construídas, onde existe uma relação linear entre concentrações do analito e sinal de resposta do equipamento. Assim, é possível prever a concentração de novas amostras a partir de seu sinal analítico. Em misturas binárias simples obtêm-se bons

resultados com esse método, mas quando se analisa amostras reais, complexas, podem ocorrer problemas de interferência da matriz e interferências espectrais. Dessa forma, tratamentos de dados mais refinados como análise quimiométrica são propostos [33].

3.2.13- Quimiometria

A quimiometria envolve a aplicação de ferramentas computacionais, métodos matemáticos e estatísticos, que permitem explorar e melhorar a interpretação dos dados multivariados. Além disso, é viável uma classificação dos dados obtidos por meio de análises químicas a fim de fornecer o máximo de informação dos mesmos. É possível avaliar também a similaridade entre as amostras correspondentes, possibilitando o estudo de várias espécies presentes ao mesmo tempo, independente da existência de diferenças espectrais. Outra possibilidade é a proposição de modelos de regressão que permitem efetuar previsões da concentração de um determinado analito em um conjunto de dados químicos [33, 34, 35].

Capítulo 4

MATERIAL E MÉTODOS

4 - MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Amostras

As amostras de extrato de levedura utilizadas neste projeto de mestrado profissional foram coletadas na fábrica da Biorigin localizada na cidade de Quatá – SP. Foram utilizados dois tipos de amostras: extratos de levedura em pó (produto final) e amostras da base da qual se originam os extratos de levedura ainda durante o processo, com aproximadamente 50% de matéria seca. As amostras em pó foram armazenadas em embalagens laminadas, hermeticamente lacradas, localizadas na contraprova do laboratório de Controle de Qualidade da Biorigin em Quatá-SP. As amostras líquidas foram armazenadas sob refrigeração, e de lá eram coletadas para serem analisadas.

Os três produtos utilizados neste projeto foram escolhidos de acordo com sua importância, volume de produção (priorizando aqueles que possuem maior demanda) e por possuírem concentrações diferentes de nucleotídeos.

Na Biorigin há vários tipos de extratos de levedura ricos em nucleotídeos, cada um deles possui uma faixa de concentração de 5'IMP e 5'GMP. O conhecimento da concentração desses compostos no produto é de extrema importância para se avaliar as possíveis aplicações, (clientes, produtos e processos). Dessa forma, é necessário garantir que o cliente esteja comprando um produto dentro das especificações desejadas e apropriadas. A concentração é reportada no certificado de análise do produto através do Controle de Qualidade.

Nas próximas páginas essas amostras serão discutidas e mostradas suas principais características:

1 - Amostra de processo (AP): É um produto líquido, com aproximadamente 50% de matéria seca. Possui de 9 a 20% de nucleotídeos (dependendo do extrato que será produzido). É utilizado como base para a fabricação de vários extratos. Para este trabalho foram utilizadas 104 amostras para a construção do modelo de regressão (conjunto de calibração) e 14 amostras para o conjunto de validação.

2 - Produto A (PA): Essa amostra é um extrato de levedura seco, com aproximadamente 96% de matéria seca e que continha de 8 a 10% de nucleotídeos. Para este trabalho foram utilizadas 121 amostras para a construção do modelo de regressão (conjunto de calibração) e 30 amostras para o conjunto de validação.

3 - Produto B (PB): Essa amostra caracteriza-se como sendo um extrato de levedura seco, com aproximadamente 96% de matéria seca, possuindo de 1,5 a 3% de nucleotídeos. Foram utilizadas 95 amostras para a construção do modelo de regressão (conjunto de calibração) e 24 amostras para o conjunto de validação.

4.1.1- Amostra controle

Para avaliarmos a variabilidade do método proposto, uma amostra chamada de amostra controle de qualidade (CQ) (escolhido um determinado lote do Produto A) foi analisada várias vezes utilizando os Modelos de regressão. Os resultados obtidos pelo Lab. P&D durante a aquisição do modelo, e os resultados obtidos pelo Lab. UQT durante o monitoramento foram comparados com os resultados do método de referência (cromatografia), no qual foi avaliado fazendo-se uma média dos resultados obtidos.

4.2- Soluções e Reagentes

As amostras de extrato de levedura foram diluídas a uma concentração de 0,4 mg/mL utilizando água ultra pura para todos. Os reagentes utilizados continham impurezas de grau analítico e empregados padrões de inosina 5'monofosfato (*Sigma Aldrich*, 99,6%) e guanosina 5'monofosfato (*Sigma Aldrich*, 99%).

4.3- Equipamentos e acessórios

Utilizou-se balança analítica calibrada com 4 casas decimais para a pesagem das amostras. Para a diluição das amostras foram utilizados balões volumétricos calibrados com capacidade de 100 mL.

As medidas de varredura foram realizadas utilizando-se o Espectrofotômetro da marca HACH, modelo DR5000.

4.4- Procedimento Experimental

4.4.1- Perfil espectrofotométrico do 5'IMP e 5'GMP

Seguindo o procedimento descrito por Durán-Meráz *et al.* [3], realizaram-se testes de varredura medidos entre 200 e 350 nm em soluções padrão de 5'IMP e 5'GMP. Soluções individuais de 5'IMP e 5'GMP 20 µg/mL e uma solução da mistura de ambas na mesma proporção foram preparadas em tampão acetato pH 4,0. A concentração e pH utilizados foram escolhidos de acordo com o procedimento utilizado por Durán-Meráz *et al.* [3], a fim de conhecer os espectros dos compostos e identificar as regiões espectrais de interesse.

4.4.2- Pesagem e diluição das amostras

Para as amostras secas (PA e PB), pesou-se 40,0 mg +/- 0,5 mg diretamente em um balão volumétrico de 100 mL.

Para a amostra com massa seca em torno de 50% (AP), pesou-se aproximadamente 80,0 mg em um balão volumétrico de 100 mL.

O volume do balão volumétrico foi completado com água ultra pura e homogeneizado.

4.4.3- Varredura no Espectrofotômetro

No espectrofotômetro, foi realizada uma varredura na faixa de 200 a 350 nm com intervalo de leitura de 0,2 nm, de acordo com os parâmetros citados no artigo de DURÁN-MERÁZ, I., *et al* [3], Utilizou-se cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. No ajuste de 100% de transmitância e 0 de absorbância, utilizou-se água ultra pura.

4.5- Tratamento dos dados

Para os trabalhos desenvolvidos nesta dissertação de mestrado profissional, utilizou-se o *software Pirouette v.4.5 da InfoMetrix* (Estados Unidos da América).

4.5.1-Métodos de Análise Multivariada

Os métodos de análise multivariada podem ser divididos em: análise exploratória de dados e construção de modelos de regressão [33]. Foi realizada uma análise exploratória dos dados a partir da Análise de Componentes Principais, PCA (*Principal Component Analysis*) para extrair informações; visualizar a estrutura dos dados; encontrar similaridades entre as amostras; detectar amostras anômalas (*outliers*); e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados em um novo sistema de eixos denominados PC.

4.5.2-Análise de Componentes Principais

A Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis – PCA*) é utilizada para representar as n -dimensões do conjunto de dados originais em um novo sistema de eixos, ou seja, em um número menor de dimensões. A PCA permite extrair informações importantes e detecta tendência nos dados baseados nas medidas das amostras, identificando similaridades entre as amostras a partir de grupos formados e detecta amostras anômalas (*outliers*). A fim de preservar a maior quantidade de informação possível, esse novo sistema de eixos é denominado de componentes principais (PC, *Principal component*). A redução é obtida estabelecendo-se novas variáveis ortogonais (não correlacionadas) entre si que descrevam a variação ou espalhamento entre os pontos usando o menor número possível de eixos. A variação ou distância entre as amostras mostra a similaridade ou diferença entre elas [33, 35].

Cada componente principal é constituída pela combinação linear das variáveis originais. A PC1 é calculada de tal forma que represente a direção de maior variação do conjunto de dados, a PC2 é ortogonal a primeira, e descreve a maior porcentagem de variação não explicada pela PC1. A escolha do número de componentes principais deve levar em consideração a porcentagem de variância explicada em todas as PC's. Em geral deve-se escolher o menor número de PC's que descrevem a maior variância dos dados. A PCA permite a interpretação de dados multivariados e complexos por meio de gráficos bi ou tridimensionais conforme a Figura 4.3 [33 - 35].

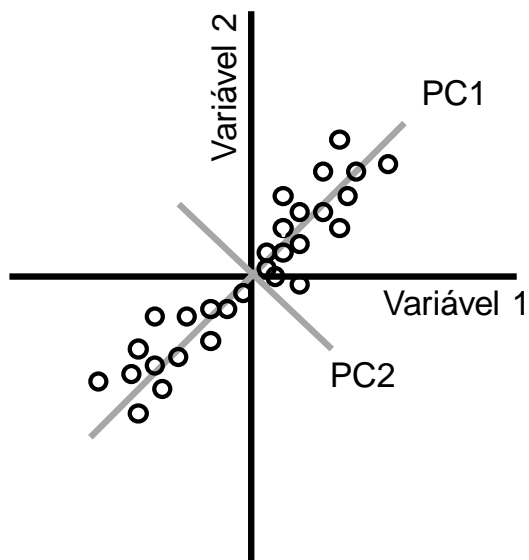


FIGURA 4.3 - Projeção das componentes principais (PC's).

Matematicamente a PCA corresponde a decomposição da matriz de dados \mathbf{X} em duas matrizes menores, escores e pesos (*loadings*). A matriz \mathbf{X} contém as variáveis independentes (amostras nas linhas e variáveis nas colunas) que no caso dessa dissertação de mestrado são espectros na região do UV-Vis. Os escores representam as relações de similaridades entre as amostras, ou seja, os agrupamentos, além da possibilidade de se verificar a existência de amostras diferentes do conjunto. Os pesos ou *loadings* permitem entender quais variáveis são mais importantes e que mais contribuem para a separação das amostras. Através dos escores e pesos é possível verificar quais variáveis são responsáveis pelas diferenças entre as amostras [33, 34, 35].

4.5.3-Calibração multivariada

A etapa de construção de um modelo de regressão inicia-se com a escolha cuidadosa de um conjunto representativo de amostras. Juntamente com essas amostras são obtidos também valores de referência das propriedades ou das concentrações dos analitos que estão sendo modelados. Essa matriz é chamada de \mathbf{Y} (variáveis dependentes). É importante frisar mais uma vez que as amostras que contemplam esse conjunto de dados precisam ser representativas, ou seja, devem conter informações sobre todas as particularidades do processo que está sendo estudado.

Em uma calibração multivariada os espectros são organizados em uma matriz \mathbf{X} ($n \times m$), contendo as variáveis independentes, onde cada linha representa uma amostra e as colunas contêm as respostas das medidas de absorvância (no caso de dados espectrais). A matriz \mathbf{Y} formada pelas variáveis dependentes, onde cada linha representa uma amostra e as colunas contêm o analito de interesse já obtido por um método consolidado (referência) [33].

A calibração multivariada consiste em estabelecer um modelo, onde se utilizam múltiplas respostas relacionadas com a propriedade medida das amostras como a concentração, por exemplo. Esse tipo de calibração permite a determinação simultânea de um ou mais analitos de interesse mesmo na presença de interferentes [33, 35, 36, 37].

A calibração é dividida em modelagem e validação. A modelagem estabelece uma relação matemática entre a matriz \mathbf{X} (sinal medido) e a matriz \mathbf{Y} (propriedade a ser quantificada). A validação consiste em testar a capacidade preditiva do modelo de regressão com amostras não utilizadas na construção dos modelos refletindo o comportamento do analito. Uma vez que o modelo é validado, ele está apto a ser utilizado para previsão em outras amostras. É importante que tanto o conjunto de calibração quanto a validação sejam atualizados com novas amostras [33, 36].

Em seguida, os modelos de regressão foram construídos utilizando o PLS (*Partial Least Squares*). Além do PLS foram efetuados cálculos utilizando o PCR (*Principal Component Regression*). Entretanto, devido à grande similaridade nos resultados, serão mostrados apenas aqueles referentes ao PLS.

O método da Regressão por mínimos quadrados (PLS) permite a utilização de todo o espectro para a análise e requer no conjunto de calibração apenas a concentração do analito de interesse como informação. O PLS é considerado mais eficiente para lidar com ruídos experimentais, além de todas as variáveis importantes serem incluídas nos modelos. A calibração é eficiente mesmo na presença de interferentes e mesmo sem conhecer a sua concentração e natureza. O método PLS tem sido amplamente utilizado em diversos campos da química [33].

O PLS utiliza a informação das concentrações (matriz \mathbf{Y}) na obtenção dos coeficientes de regressão para a construção dos modelos. No PLS as

componentes principais (fator que descreve a maior variância) são chamadas de variáveis latentes e também é correlacionado com a concentração [33].

O PLS é um método mais robusto, seus parâmetros do modelo criado inicialmente não se alteram com a inclusão de novas amostras no conjunto de calibração, isso torna possível trabalhar com sistemas industriais cujas características nem sempre são mantidas rigorosamente da mesma maneira durante todo o processo, tendo em vista a necessidade de se atualizar o conjunto de calibração e validação inserindo novas amostras ao longo do tempo [33, 36].

4.5.4- Pré-processamento dos dados

A etapa de pré-processamento dos dados é crucial para o êxito da análise multivariada. As técnicas de pré-processamento são aplicadas para tornar a matriz mais adequada para a análise, pois os dados podem apresentar diversos problemas, tais como alteração da linha de base e desalinhamento (no caso de dados cromatográficos). As técnicas de pré-processamento permitem eliminar informações irrelevantes, variações de equipamentos e materiais, permitindo a extração de informações importantes para a interpretação dos dados [35].

Existem vários tipos de pré-processamento e a escolha depende do tipo de dado que está sendo analisado. Os métodos utilizados neste trabalho seguiram a seguinte ordem:

- Normalização dos espectros pela norma individual. Reduzindo a influência de variações indesejadas do conjunto de dados, como variações na concentração da amostra e caminho óptico. A normalização é realizada pela divisão de cada variável pela norma individual de cada espectro. A norma é calculada pela raiz quadrada dos quadrados dos sinais de absorbância (no caso de sinais espectrais) [35].

- 1ª Derivada para realçar as informações mais importantes e manter as menos importantes na origem do sistema, auxiliando na correção do deslocamento e inclinação de linha de base. A janela espectral utilizada possuía 19 comprimentos de onda [35];

- Centrar os dados na média para permitir que diferenças nas intensidades relativas das variáveis sejam mais perceptíveis. A centralização dos dados na média é utilizada para dados espectrais. O procedimento consiste em

calcular a média das intensidades para cada comprimento de onda e em seguida subtrai-se cada intensidade da média calculada, assim, após esse processamento, cada variável centrada na média terá valor médio igual a zero, tornando as diferenças nas intensidades das variáveis mais perceptíveis não permitindo que a presença de ruídos afete negativamente a análise [33, 35].

Após o pré-processamento o modelo foi calibrado, validado e foi realizada a previsão dos resultados.

4.6- Monitoramento do método

Na Biorigin, quando há uma proposta de mudança de metodologia de análise são necessários diversos estudos antes de colocá-la em regime de rotina. Ao final desses estudos julga-se necessário um monitoramento para comparar se o método proposto fornece erros compatíveis com o método cromatográfico usual (informações não mencionadas por se tratar de um método confidencial). Após essa etapa de monitoramento do método, é realizada uma análise crítica, para decidir se o mesmo é colocado em regime de rotina ou se ainda precisa de mais ajustes.

Dessa forma, após a criação dos modelos, os colaboradores do Lab. UQT foram treinados para a realização das análises. Inicialmente foi realizado um monitoramento durante os meses de agosto e setembro de 2014. Nesse monitoramento para cada amostra foram realizadas análises por cromatografia e pelos modelos de regressão para efetuar uma comparação dos resultados avaliando-se os erros absolutos.

Capítulo 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1- Perfil espectrofotométrico do 5'IMP e 5'GMP

Na Figura 5.4 são apresentados os espectros de absorção das soluções. O 5'IMP e 5'GMP tem absorbância em aproximadamente 250 nm, onde o 5'GMP possui uma oscilação em 275 nm aproximadamente como podemos visualizar na figura. Os espectros mostram grande sobreposição espectral, o que impossibilita a resolução das misturas binárias pela espectrofotometria convencional.

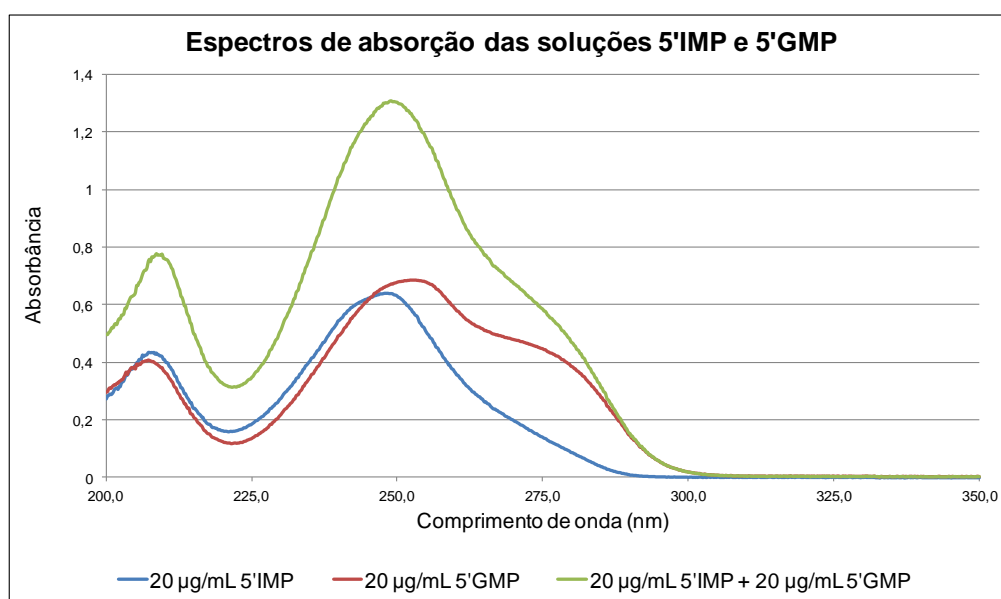


FIGURA 5.4 - Espectros de absorção na faixa de 200 a 350 nm das soluções de 5'IMP (20 µg/mL), 5'GMP (20 µg/mL) e a mistura dos dois compostos em pH 4,0.

5.2- Modelo de regressão

Modelos de regressão foram criados para testar a capacidade preditiva nos produtos (Amostra de processo, Produto A e Produto B). Para cada produto foi criado um modelo específico, devido às diferenças nas características de cada um.

5.3- Amostras de processo (AP)

5.3.1- Modelo de regressão (AP)

Para a criação do modelo de regressão das Amostras de processo foram utilizadas 104 amostras no conjunto de calibração e 14 amostras foram avaliadas no conjunto de validação. As amostras utilizadas para a validação não foram utilizadas no conjunto de calibração.

As concentrações de nucleotídeos dessas amostras variaram de 9 a 20%. Na Figura 5.5 podemos observar o perfil dos coeficientes de regressão para o modelo das Amostras de processo. O modelo mais adequado foi aquele que apresentou 3 variáveis latentes. Nessa figura é possível verificar que os maiores coeficientes de variação foram obtidos nas regiões de aproximadamente 210, 230 e 280 nm. É importante lembrar que o parâmetro que está sendo calibrado é a concentração total de nucleotídeos, ou seja, 5'IMP + 5'GMP. As Figuras de coeficiente de regressão simulam o cálculo da equação de regressão com 751 variáveis (β). Equação de regressão: $Y = \beta_0 \pm \beta_1x \pm \beta_2x^2 \dots$

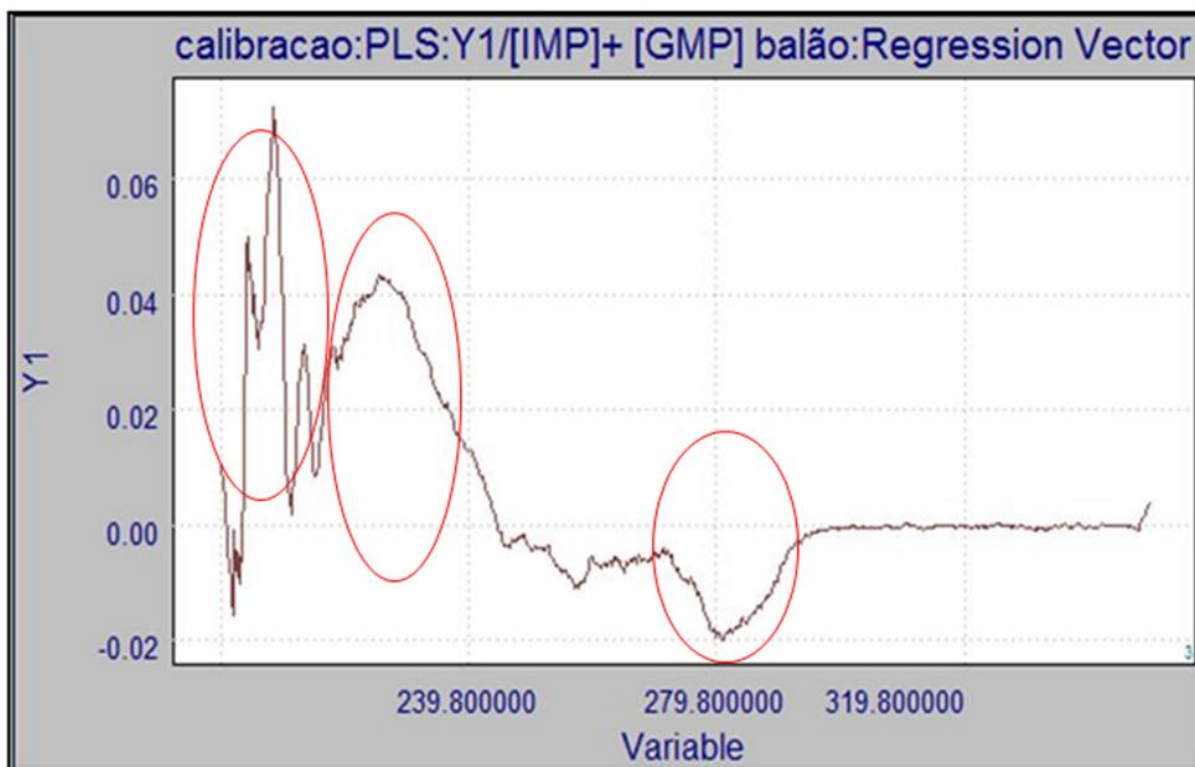


FIGURA 5.5 - Coeficientes de regressão com 3 componentes principais ou variáveis latentes do modelo de regressão, utilizando o PLS das Amostras de processo.

5.3.2- Modelo de validação (AP)

Os resultados da validação do modelo de regressão para as Amostras de processo podem ser visualizados na Figura 5.6. Os resultados do modelo de regressão foram comparados com os obtidos por cromatografia e sobrepostos para uma melhor visualização.

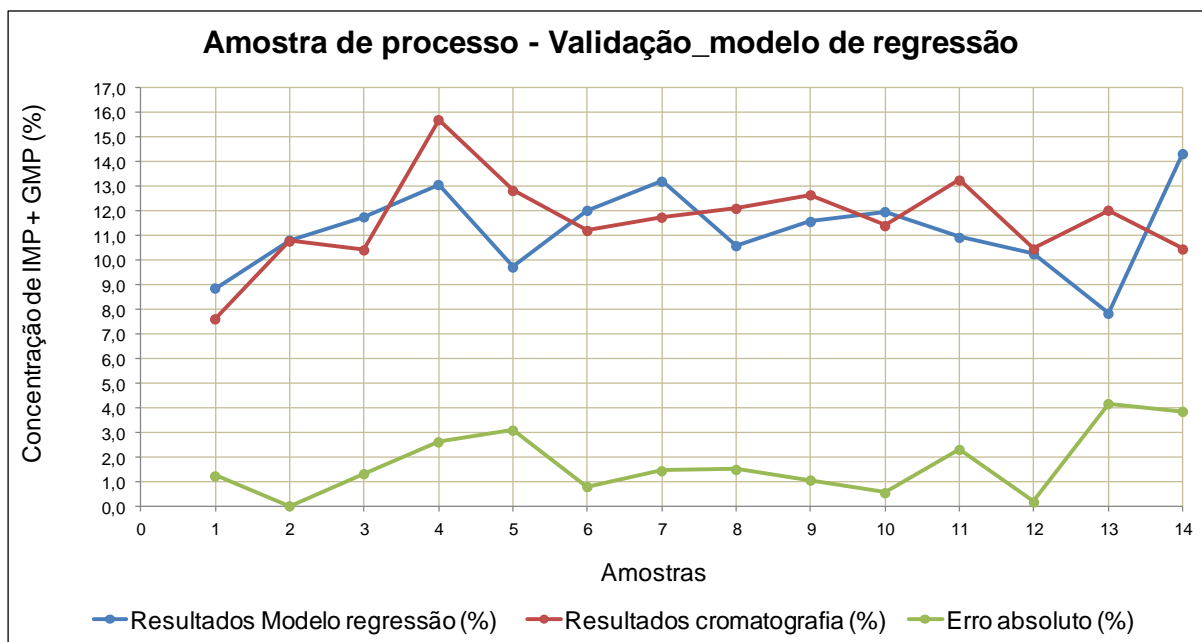


FIGURA 5.6 - Resultados de validação das análises de Amostras de processo realizadas pelos Modelos de regressão *versus* Cromatografia.

Os dados e informações do modelo e sua validação podem ser observados na Tabela 5.6. Os erros encontrados para esse modelo foram da ordem de 2,0% para RMSEC e 2,15% para RMSEV. Com a introdução de novas amostras que reflitam diversas condições experimentais é esperado que esse erro diminua.

TABELA 5.6 - Dados e informações do modelo de regressão (calibração e validação) das Amostras de processo (AP).

Dados do modelo de regressão (calibração e validação) das Amostras de processo (AP)		
Amostras	Dados do modelo regressão	Dados da cromatografia
104 - conjunto de calibração	*RMSEC: 2,00%	0,32%
014 – conjunto de validação	*RMSEV: 2,15%	1,76%
-	Erro médio do conjunto validação: 1,74%	1,29%
-	Faixa de erros do conjunto validação: 0 a 4,2%	0,1 a 4,1%
-	Componentes principais ou variáveis Latentes: 3	-

*RMSEC - *Root mean square error of calibration (%)*

*RMSEV - *Root mean square error of validation (%)*

5.3.3- Monitoramento (AP)

O modelo proposto foi empregado para o monitoramento de outras Amostras de processo. Entretanto, é importante ressaltar que esse produto possui diferentes concentrações de sal. Como é mostrado na Figura 5.7, o primeiro conjunto de amostras (1 a 9) as amostras possuem concentração de sal 0%, no segundo conjunto (10 a 44) amostras com 18% de sal e no terceiro conjunto (45 a 48) amostras com 36% de sal.

No modelo de regressão (mostrado na sessão anterior) existem poucas amostras com 0% ou 36% de sal e a maioria apresentam 18%.

Nas amostras de monitoramento foi constatado que os erros absolutos são maiores em amostras com 0% de sal (entre 0 a 4%). Nas amostras com 18% de sal os erros apresentam-se abaixo de 2,2% com exceção das amostras 42 (erro absoluto de 2,5%) e 43 (erro absoluto de 5,0%). Para as amostras com 36% de sal os erros absolutos se mantiveram abaixo de 1,4%. Na Figura 5.7 podemos visualizar os resultados obtidos pelo monitoramento das amostras em suas diferentes concentrações de sal.

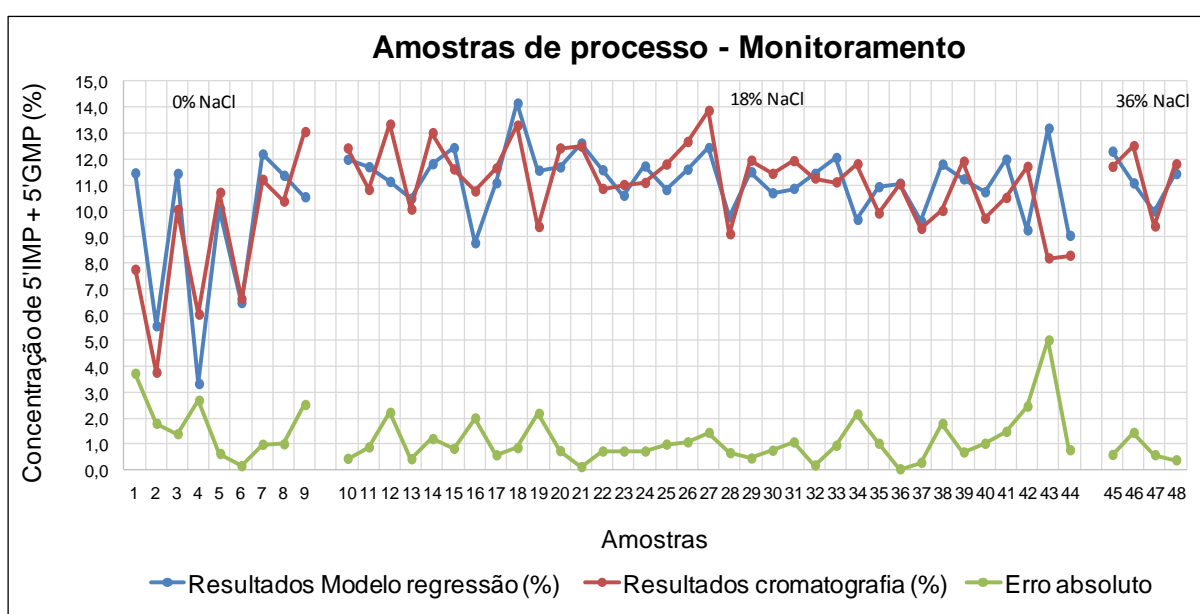


FIGURA 5.7 - Análise de monitoramento das Amostras de processo.

A fim de investigar com mais critério a variação dos erros da Figura 5.7, os resultados foram colocados por ordem crescente de concentração de 5'IMP + 5'GMP que são mostrados na Figura 5.8. Nessa figura, é possível observar os resultados obtidos pelo modelo de regressão em comparação com os resultados obtidos por cromatografia. São mostrados também os erros absolutos entre as técnicas.

Na Figura 5.8 observa-se uma região onde os resultados se mostram na faixa de concentração entre 10,5 e 12,5% de nucleotídeos (5'IMP + 5'GMP), esses resultados apresentam erros mais baixos, com exceção das amostras 31 e

34. Uma hipótese é que isso ocorre porque o modelo até então utilizado, é composto em sua maioria por amostras com essa concentração.

Nas demais faixas de concentração há uma tendência dos erros serem maiores. Isso indica que o modelo ainda não está representativo para toda a faixa de concentração que esse produto pode abranger. Dessa forma, o modelo precisa ser alimentado com amostras que contenham diferentes concentrações de nucleotídeos.

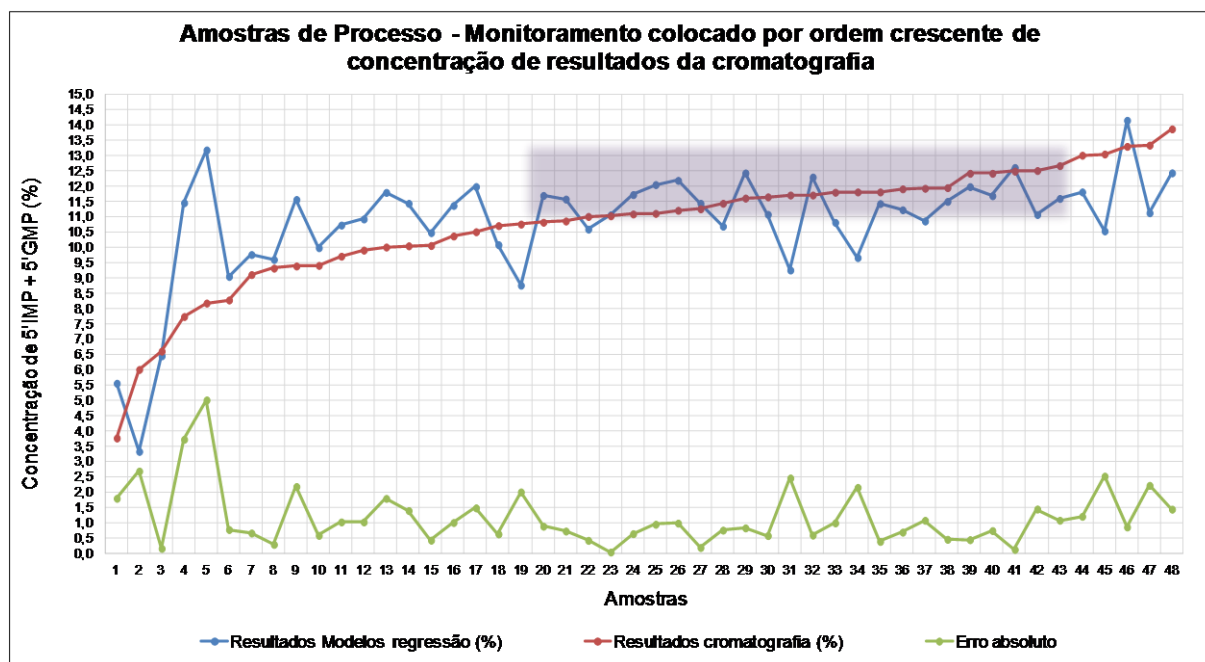


FIGURA 5.8 - Análise de monitoramento das Amostras de processo (AP) colocadas por ordem crescente de concentração de 5'IMP + 5'GMP (%) provenientes da cromatografia.

5.4- Produto A (PA)

5.4.1- Modelo de regressão (PA)

Para a criação do modelo de regressão do Produto A, foram utilizadas 121 amostras no conjunto de calibração e 30 amostras foram avaliadas no conjunto de validação do modelo. As amostras utilizadas para a validação não foram utilizadas no conjunto de calibração.

A concentração de nucleotídeos para esse produto é de 8 a 10%. Na Figura 5.9 podemos observar o perfil dos coeficientes de regressão para o modelo

do Produto A e suas principais regiões (circuladas em vermelho). A faixa espectral utilizada foi a mesma e nesse caso também foram escolhidas 3 variáveis latentes.

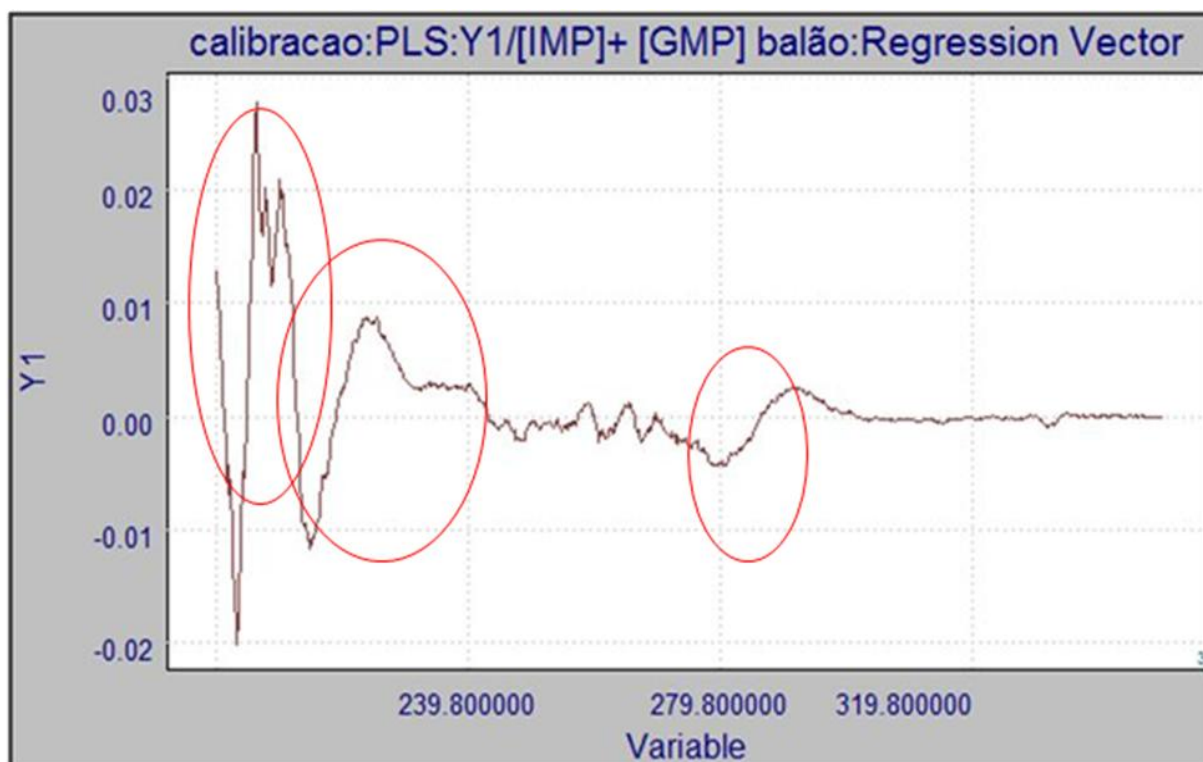


FIGURA 5.9 - Coeficientes de regressão do modelo de regressão do Produto A, utilizando o PLS e 3 variáveis latentes.

5.4.2- Modelo de validação (PA)

Os resultados da validação do modelo de regressão para o Produto A podem ser visualizados na Figura 5.10. Os resultados do modelo de regressão foram comparados com os obtidos por cromatografia e sobrepostos para uma melhor visualização.

Os erros absolutos entre os resultados de ambas as técnicas também podem ser observados na figura.

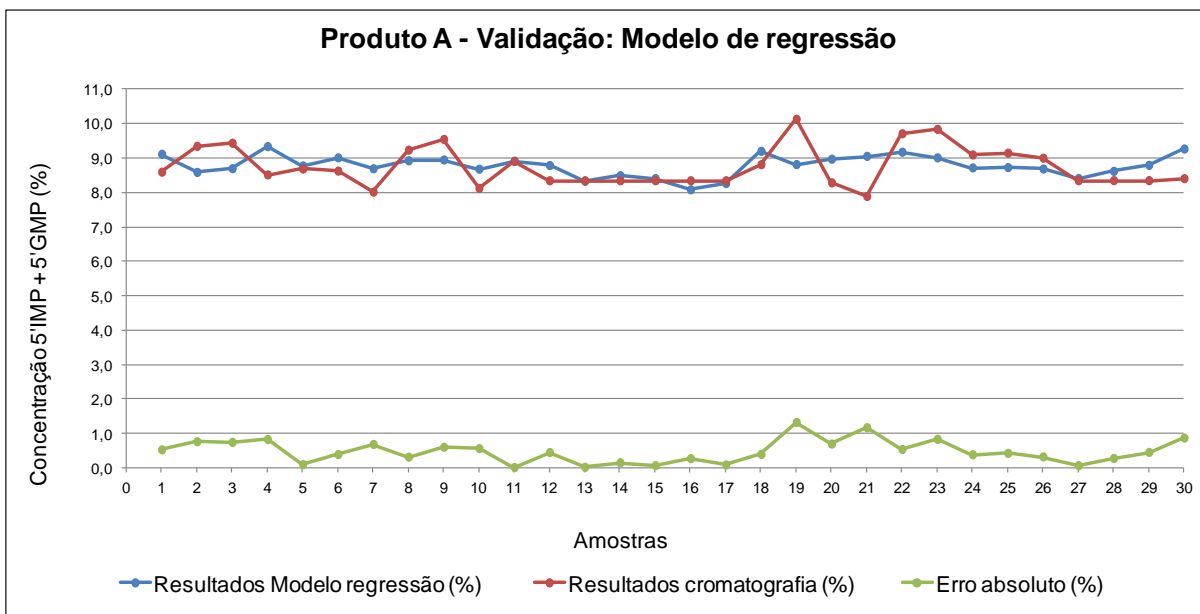


FIGURA 5.10 - Resultados de validação para o Produto A das análises realizadas pelos Modelos de regressão *versus* Cromatografia.

Os dados e informações do modelo e sua validação podem ser observados na Tabela 5.7. Os valores de RMSEC e RMSEV foram da ordem de 0,6%. Entretanto, como afirmado anteriormente, com a adição de mais amostras representativas, o modelo se tornará mais robusto.

TABELA 5.7 - Dados e informações do modelo de regressão (calibração e validação) e cromatografia para as amostras do Produto A (PA).

Dados do modelo de regressão (calibração e validação) do Produto A (PA)		
Amostras	Dados do modelo de regressão	Dados da cromatografia
121 – conjunto de calibração	RMSEC: 0,67%	0,20%
030 – conjunto de validação	RMSEV: 0,57%	0,57%
-	Erro médio do conjunto de validação: 0,47%	0,48%
-	Faixa de erros do conjunto de validação: 0 a 1,3%	0,1 a 1,4%
-	Componentes principais ou variáveis Latentes: 3	-

5.4.3- Monitoramento (PA)

No monitoramento proposto para o Produto A foram observados erros absolutos na faixa de 0,5 a 2%.

No monitoramento verificou-se uma tendência de que os resultados do Modelo de regressão são sistematicamente maiores que o de cromatografia, embora isso não tenha sido observado nas amostras de validação do modelo. Na Figura 5.11 podemos visualizar os resultados obtidos pelo monitoramento das amostras para esse produto, onde os resultados obtidos pelo Modelo de regressão são comparados com os resultados da cromatografia e os erros absolutos entre os métodos. Os resultados estão sobrepostos para facilitar a comparação entre eles.

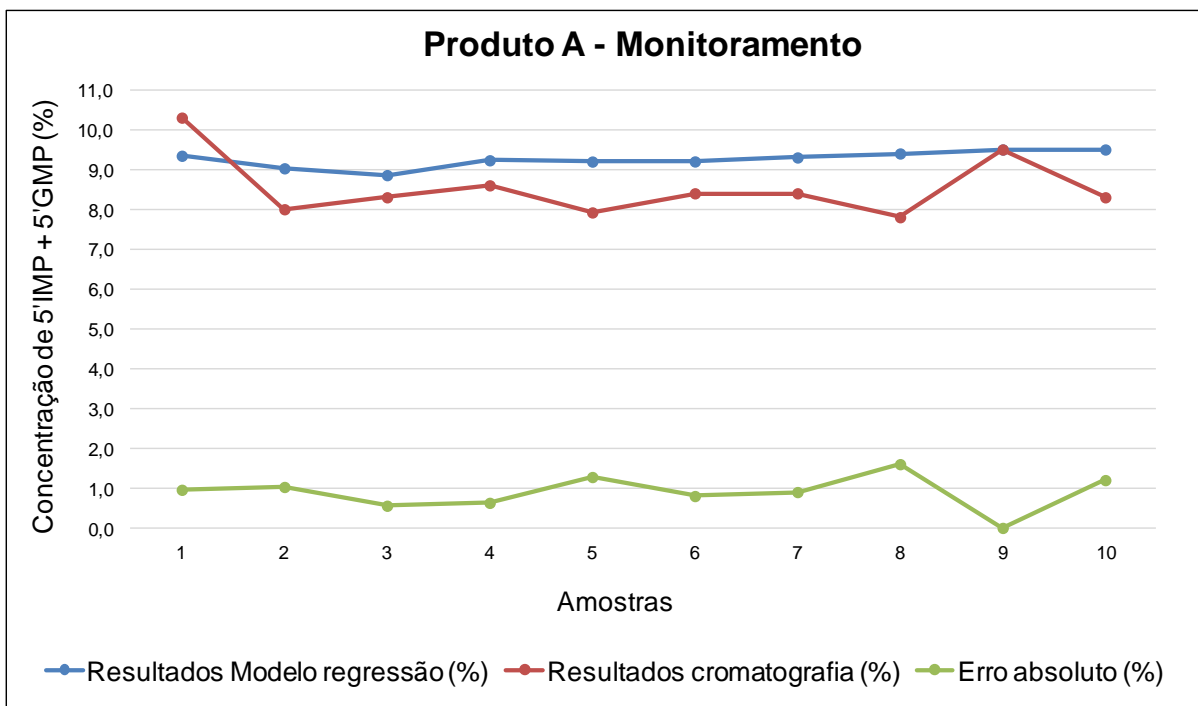


FIGURA 5.11 - Análise de monitoramento do Produto A.

5.5- Produto B (PB)

5.5.1- Modelo de regressão (PB)

Na Figura 5.12 podemos observar como ficaram os coeficientes de regressão para o modelo do produto B, e verificar que as regiões em aproximadamente 210 a 290 nm são as regiões do espectro mais importantes para o modelo. Nesse modelo foram também selecionadas 3 variáveis latentes.

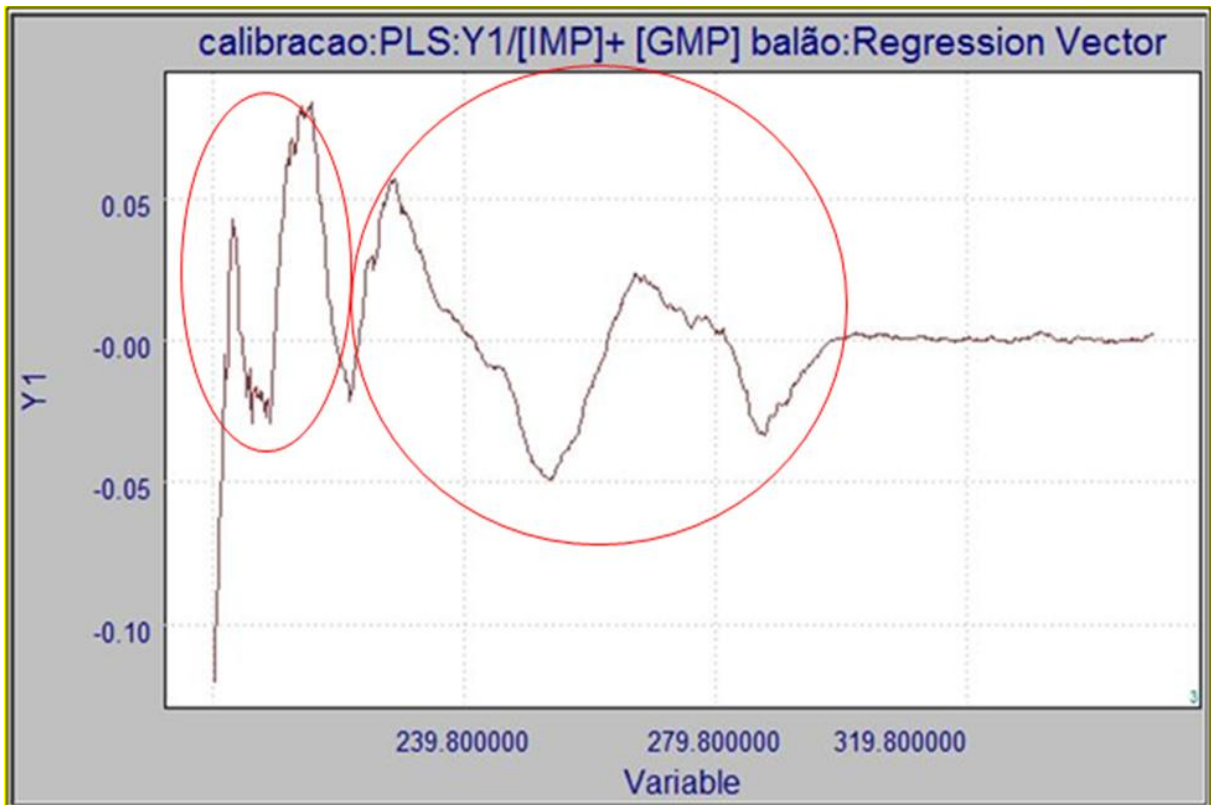


FIGURA 5.12 - Coeficientes de regressão do modelo de regressão do Produto B, utilizando o PLS e 3 variáveis latentes.

5.5.2- Modelo de validação (PB)

Os resultados da validação do modelo de regressão para o Produto B podem ser visualizados na Figura 5.13. Os resultados do modelo de regressão foram comparados com os obtidos por cromatografia e sobrepostos para uma melhor visualização.

Os erros absolutos entre os resultados de ambas as técnicas também podem ser observados na Figura 5.13.

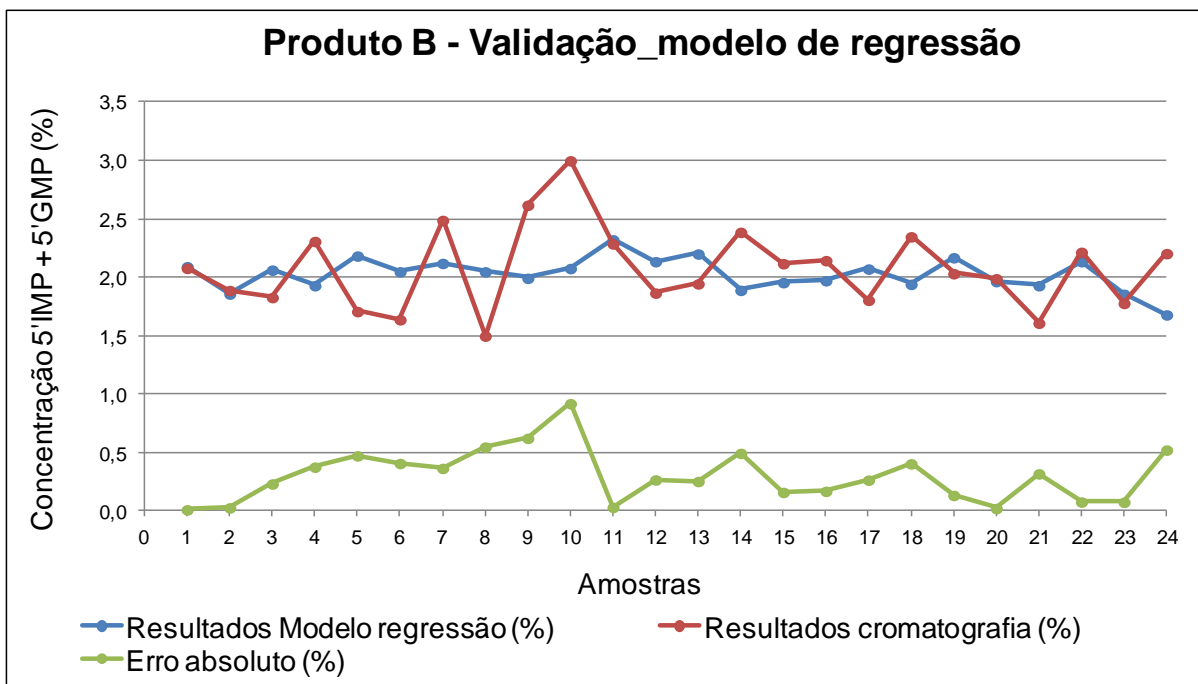


FIGURA 5.13 - Resultados de validação das análises realizadas pelos Modelos de regressão *versus* Cromatografia do Produto B.

Os dados e informações do modelo e sua validação podem ser observados na Tabela 5.8.

TABELA 5.8 - Dados e informações do modelo de regressão (calibração e validação) do Produto B (PB).

Dados do modelo de regressão (calibração e validação) do Produto B (PB)		
Amostras	Dados do modelo de regressão	Dados da cromatografia
95 – conjunto de calibração	RMSEC: 0,43%	0,16%
24 – conjunto de validação	RMSEV: 0,37%	0,34%
-	Erro médio no conjunto de validação: 0,30%	0,28%
-	Faixa de erros do conjunto de validação: 0 a 0,9%	0 a 0,9%
-	Componentes principais ou variáveis latentes: 3	-

5.5.3- Monitoramento (PB)

No monitoramento proposto para o Produto B, observou-se que os erros absolutos estão abaixo de 0,5%.

No monitoramento verificou-se uma tendência de que os resultados do Modelo de regressão são sistematicamente maiores que o de cromatografia embora isso não tenha sido observado nas amostras de validação do modelo. Na Figura 5.14 podemos visualizar os resultados obtidos pelo Modelo de regressão *versus* os resultados de cromatografia e seus respectivos erros absolutos. Os resultados estão sobrepostos para facilitar a comparação entre eles.

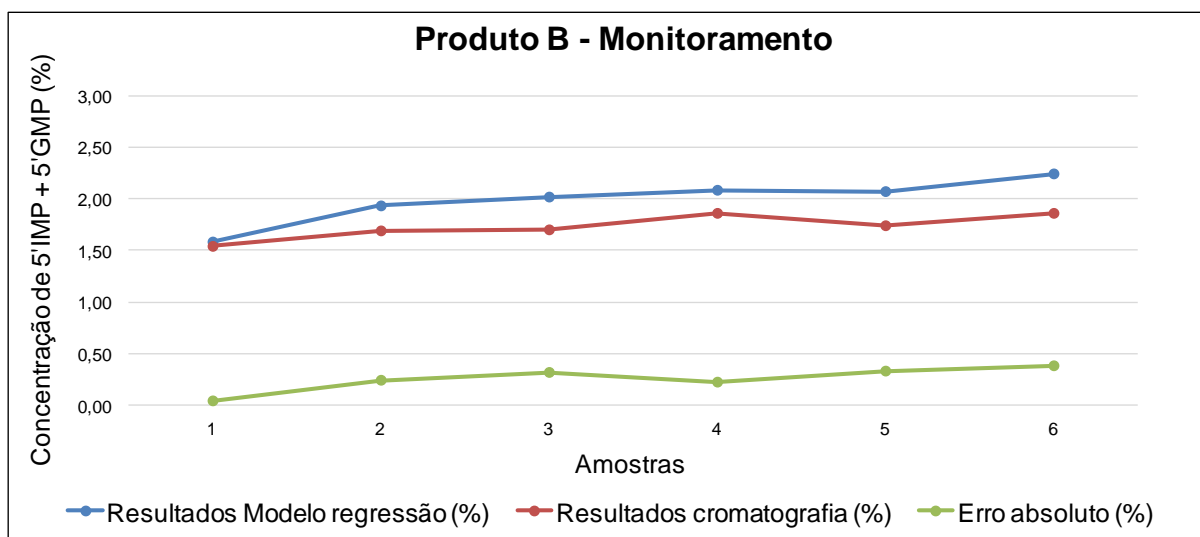


FIGURA 5.14 - Análise de monitoramento do Produto B.

5.6- Avaliação da Amostra Controle

A comparação entre os resultados obtidos pelo modelo de regressão em P&D *versus* cromatografia apresentou-se próximos. Já os resultados obtidos pelo modelo de regressão durante o monitoramento pelo Lab. UQT apresentam valores sistematicamente maiores em comparação com o da cromatografia que é em média 8,7%, como mostra a Figura 15.5. Coincidentemente para os Produtos A e B, também foi observado um erro sistemático. Essa constatação indica um erro analítico que necessita ser mais bem explorado para contorná-lo (rotatividade de analistas, equipamento ou materiais).

Apesar dos erros absolutos encontrados, é importante ressaltar que na média o método proposto apresentou erros comparáveis àqueles mostrados por Acebal *et al.* [32]. No trabalho de Acebal *et al.* [32] os autores também empregaram medidas na região do UV-Vis para a determinação de 5'IMP e 5'GMP em amostras comerciais que intensificam o sabor. Os erros absolutos reportados pelos autores variaram de 0 até 0,8% (média de 0,2%).

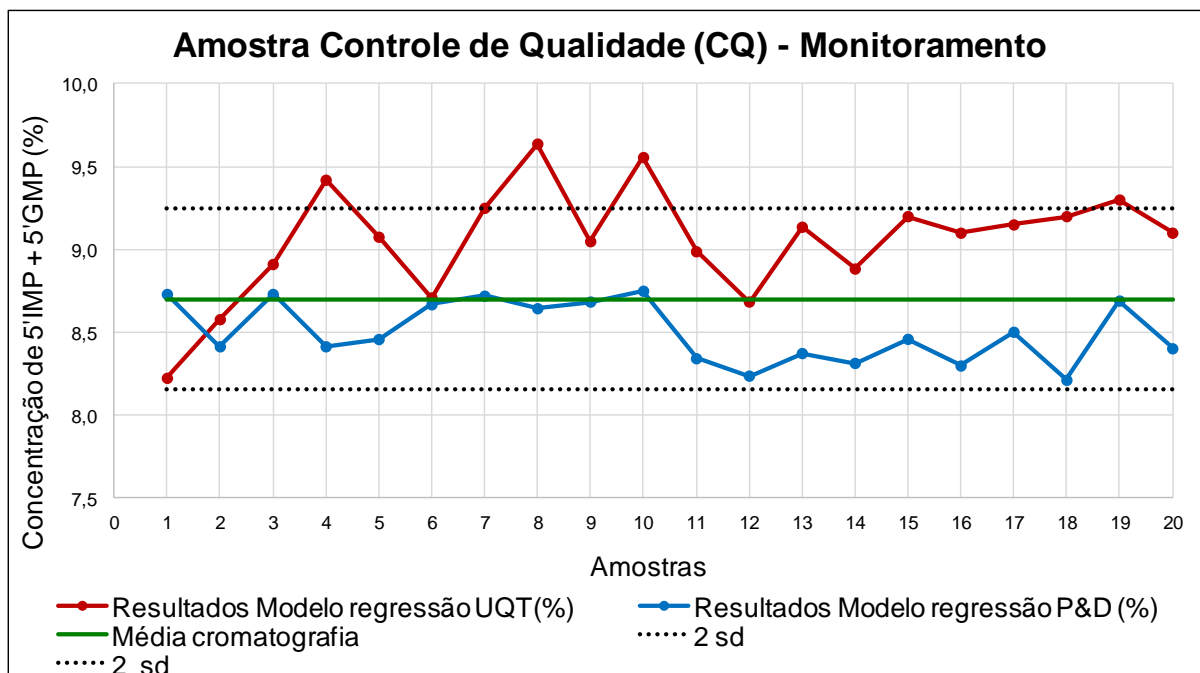


FIGURA 5.15 - Resultados da amostra CQ obtidos através do Modelo de regressão, *versus* resultados obtidos pela Cromatografia.

5.7- Benefícios futuros

O método além de ser diferenciado em relação a custo (analítico e de produção) e facilidade analítica, também é diferenciado em relação a tempo de análise (10 minutos contra no mínimo 60 minutos por amostra na cromatografia) o que pode proporcionar um aumento de frequência analítica das amostras de processo e a possibilidade de aumentar os pontos de monitoramento permitindo ajustes mais finos de processo e assim, menor índice de reprovação de produtos como é mostrado na Tabela 5.9.

Além disso, com análise mais rápida o tempo de espera de produtos em tanques ou no processo tende a diminuir podendo impactar positivamente na produtividade.

TABELA 5.9 - Benefícios futuros advindos da presente dissertação de mestrado profissional.

Benefícios futuros		
Parâmetros avaliados	Modelos de regressão	Cromatografia
Frequência analítica	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 5 – 10 min. ▪ Aumento de pontos de monitoramento. ▪ Ajustes mais finos durante o processo. ▪ Menor índice de reprovação de produtos. 	Mínimo 60 min.
Gasto analítico (2013)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Investimento inicial R\$ 40.000,00 (aquisição do software Piouette). ▪ Manutenção/calibração equipamento. ▪ Custo operacional. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ R\$100.000,00 / ano com colunas analíticas. ▪ Reagentes. ▪ Manutenção e troca de peças do equipamento. ▪ Desgaste do equipamento.
Rotina de análise	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Preparo de soluções. ▪ Aquecimento da lâmpada do espectrofotômetro. ▪ Monitoramento dos Modelos de regressão. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Preparo de soluções. ▪ Preparo fase móvel. ▪ Condicionamento coluna. ▪ Estabilização do equipamento. ▪ Curva analítica.
Potencial de economia	<ul style="list-style-type: none"> ▪ 80 a 90% quando houver Modelos de regressão para todos os extratos de levedura. 	-
Impacto na produtividade	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Obtenção mais rápida de resultados, impacto positivo na produtividade da empresa. 	-

Capítulo 7

CONCLUSÕES

6 - CONCLUSÕES

Foi possível a criação dos modelos para os três produtos propostos (Amostras de processo, Produto A e Produto B).

Os dados de monitoramento do Produto A e B indicaram uma diferença sistemática entre os valores de cromatografia e valores obtidos pelos modelos de regressão, porém essa tendência não foi observada durante a criação dos modelos (validação dos Modelos de regressão). É necessária uma investigação dos erros apresentados a fim de entender as causas.

O monitoramento será realizado até que os erros obtidos entre as técnicas apresentem a menor variação possível. Como a Amostra de processo é utilizada como base na produção dos extratos, é essencial minimizar os erros, visto que dependendo da concentração da Amostra de processo, a base será destinada a produção de um determinado produto, cuja concentração de nucleotídeos também é monitorada no produto final.

Mesmo as diferenças apresentadas em relação a cromatografia durante o monitoramento, não estarem em um nível aceitável para utilização em processo (Amostra de processo), o método de análise por modelos de regressão se mostra com alto potencial de aplicação em regime de rotina.

O método desenvolvido nesse trabalho em parceria Biorigin – UFSCar reafirma a eficiência da interação do conhecimento científico-tecnológico, proporcionado pelas Universidades, com as necessidades do setor produtivo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. “Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria”. Revista de Nutrição, 13, 127-134, 2000.
- 2 <http://www.biorigin.net> (acessado em nov/2014).
- 3 DURÁN-MERÁZ, I.; SALINAS, F.; DE LA PEÑA, A. M.; ROSAS, M. L. “Simultaneous Determination of Flavor Enhancers Inosine 5’monophosphate and Guanosine 5’monophosphate in food Preparations by Derivate Spectrophotometry”. AOAC, 76, 754-759, 1993.
- 4 FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. Microbiologia de alimentos, São Paulo: Atheneu, 2005.
- 5 JAY, J. M. Microbiologia de alimentos, Porto Alegre: Artmed, 2005.
- 6 PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia: conceitos e aplicações, São Paulo: Makron Books, 1996.
- 7 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Microbiologia, Porto Alegre: Artmed, 2000.
- 8 MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. Microbiologia de Brock, São Paulo: Prentice Hall, 2004.
- 9 YAMAUCHI, K.; et al. “Dietary nucleotides prevent In cellular immunity in ground-based microgravity analog”. Journal of Applied Physiology, 93, 161-166, 2002.
- 10 OLIVEIRA, A. M.; GÓMEZ, R. J. H. C. Otimização da Extração de Proteínas da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Ciências Agrárias, Londrina, 26, 521-534, 2005.
- 11 SGARBIERI, V. C.; et al. “Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces SP.*) para uso como ingrediente na formulação de alimentos”. Brazilian Journal of Food Technology, 2, 119-125, 1999.
- 12 BÉHALOVÁ, M.; BLÁHOVÁ, V.; SILLINGER, F. Machek. “Comparison of various ways if extraction of nucleic acids and of preparation of yeast extract from *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis*”. Acta Biotechnologica, 11, 547-552, 1991.
- 13 CHARPENTIER, C.; et al. “Alteration of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during autolysis”. Applied Microbiology Biotechnology, 24, 405-413, 1986.

- 14 OLIVEIRA, A. M. Otimização da Autólise de *Saccharomyces Cerevisiae* de Cervejaria e Extração de RNA. Rio Claro, Ciências Biológicas em Microbiologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, 2008. Tese de doutorado, 107 f.
- 15 RÉVILLION, J. P.; BRANDELLI, A.; AYUB, M. A. Z. “Produção de extratos de leveduras de uso alimentar a partir do soro de queijo: abordagem de elementos técnicos e mercadológicos relevantes”. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 20, 246-249, 2000.
- 16 NAS. National Academic of Science. Recommended Dietary Allowances. 10^a ed., Washington: National Academic Press, 1989.
- 17 CAR, P. R. N. “Leveduras como fonte de micronutrientes. Composição e análise de vitaminas”. In: “WORKSHOP”: Produção de biomassa de levedura - utilização em alimentação humana e animal. Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, 1996. p.28.
- 18 CONN, H. “Umami-the fifth basic taste”. *Nutrition & Food Science*, 21-23, 1992.
- 19 FRATA, M. T. Sucos de Laranja: Abordagem Química, Física, Sensorial e Avaliação de Embalagens. Londrina, Ciência de Alimentos - Universidade Estadual de Londrina, 2006. Tese de Doutorado, 176 f.
- 20 IGUTI, A. M. “Levedura como fonte de ácidos nucleicos e nucleotídeos: Métodos de produção de nucleotídeos, aplicação em alimentos”. In: “WORKSHOP”: Produção de biomassa de levedura-utilização em alimentação humana e animal”. Campinas: Centro de Química de Alimentos & Nutrição Aplicada, 1996.p.32-40.
- 21 BURMEITER, G.; RAINSFORD, K. D. “Discriminating effects of a nucleotide-rich yeast extract, probioticum, as an immunomodulator contrasted with actions in chronic immuno-inflammatory disease (adjuvant-induced arthritis) in rodents, *Inflammopharmacology*”. 1, 161-183, 1991.
- 22 BELLISLE, F. “Glutamate and the UMAMI taste: sensory metabolic, nutritional and behavioural considerations. A review of the literature published in the last 10 years”. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 23, 423–438, 1999.
- 23 CHEN, X.; et al. ‘Gustotopic map of taste qualities in the mammalian brain’. *Science*, 333, 1262-1266, 2011.
- 24 <http://www.ift.org/knowledge-center/learn-about-food-science/food-facts/unleashing-the-power-of-umami.aspx> (acessado em nov/2014).
- 25 YAMAGUCHI, S. “Basic properties of umami and effects on humans”. *Physiology & Behavior*, 49, 833-841, 1991.

- 26 NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger*. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, p. 271-297, 2011.
- 27 INOUE, K.; et al. "Development and application of an HILIC-MS/MS method for the quantitation of nucleotides in infant formula". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 9918-9924, 2010.
- 28 AUSSENAC, J.; et al. "Purification method for the isolation of monophosphate nucleotides from champagne wine and their identification by mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, 907, 155-164, 2001.
- 29 CAI, Z. "Ion-Pairing LC/MS/MS Determination of nucleosides and nucleotides". *Analytical Sciences*, 17, 199-201, 2001.
- 30 COULIER, L.; et al. "Comprehensive analyses of umami compounds by ion-pair liquid chromatography coupled to mass spectrometry". *Journal of Food Science*, 2011.
- 31 ACEBAL, C. C.; et al. "Successive projections algorithm applied to spectral data for the simultaneous determination of flavor enhancers". *Talanta*, 82, 222-226, 2010.
- 32 ACEBAL, C. C.; LISTA, A. G.; BAND, B S. F. "Simultaneous determination of flavor enhancers in stock cube samples by using spectrophotometric data and multivariate calibration". *Food Chemistry*, 106, 811-815, 2008.
- 33 FERREIRA, M. M. C.; et al. "Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial". *Química. Nova*, 22, 1999.
- 34 CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. "Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos". *Química. Nova*, 30, 481-487, 2007.
- 35 SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. "Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I". *Química. Nova*, 35, 223-229, 2012.
- 36 MARTENS, H.; NAES, T. *Multivariate Calibration*. New York: John Wiley & Sons, 1989.
- 37 BEEBE, K. R.; PELL, R. J.; SEASHOLTZ, M. B. *Chemometrics: a Practical Guide*. New York: John Wiley & Sons, 1998.