



EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE β-GLUCANA DE LEVEDURAS RESIDUAIS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

**Bruna de Carvalhosa Maiato
Felipe de Araujo Lima**

Projeto de Final de Curso

Orientadoras

Maria Alice Zarur Coelho, D. Sc.
Tatiana Felix Ferreira, Quim.

Fevereiro de 2007

EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE β -GLUCANA DE LEVEDURAS RESIDUAIS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

Bruna de Carolhosa Maiato
Felipe de Araujo Lima

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro Químico.

Aprovado por:

Andréa Medeiros Salgado - D.Sc.

Elioni Maria de A. Nicolaiewsky - D.Sc.

Priscilla Filomena Fonseca Amaral - M.Sc.

Orientado por:

Maria Alice Zarur Coelho - D.Sc.

Tatiana Felix Ferreira - Química.

Rio de Janeiro, RJ - Brasil

Fevereiro de 2007

Maiato, B. C.; Lima, F. A.
Extração enzimática de β -glucana de leveduras
residuais para aplicação industrial.
Bruna de Carvalhosa Maiato, Felipe de Araujo Lima.
Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2007.
xi, 122 p.; il. (romano: pags. texto inicial; arábico: pags. trabalho)
(Projeto Final) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2007.
Orientadoras: Maria Alice Zarur Coelho, Tatiana Felix Ferreira.
1. Extração. 2. β -glucana. 3. Leveduras. 4. Projeto final.
(Graduação – UFRJ/EQ). 5. Maria Alice Zarur Coelho D. Sc.

"Se dois homens vêm andando por uma estrada,
cada um carregando um pão, e, ao se encontrarem,
eles trocam os pães, cada um vai embora com um pão...
Porém, se dois homens vêm andando por uma estrada,
cada um carregando uma idéia, e, ao se encontrarem,
eles trocam as idéias, cada homem vai embora com duas idéias..."

Provérbio chinês

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado àqueles que deram sua contribuição para que este projeto fosse realizado. A todas estas pessoas deixamos aqui nosso agradecimento sincero.

Em primeiro lugar agradecemos a Deus e aos nossos familiares pela paciência e apoio, não somente durante o projeto, mas durante todo o curso de graduação.

Agradecemos a Prof^a. Maria Alice Zarur Coelho responsável pela orientação no projeto. A nossa orientadora Tatiana Felix Ferreira por toda ajuda, paciência e dedicação.

Aos alunos do Laboratório de Enzimologia, especialmente a Mariana Miguez Francisco de Sá pela ajuda com a microscopia e o tratamento de dados. Aos amigos Bernardo e Nairalice pela paciência e ajuda. Ao Prof. Daniel W. Barreto por fornecer o óleo de buriti empregado neste trabalho.

Aos membros da Banca Examinadora e a todos que não foram citados aqui, mas de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

Resumo do Projeto Final apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de Engenheiro Químico.

EXTRAÇÃO ENZIMÁTICA DE β -GLUCANA DE LEVEDURAS RESIDUAIS PARA APLICAÇÃO INDUSTRIAL

**Bruna de Carolhosa Maiato
Felipe de Araujo Lima
Fevereiro, 2007**

**Orientadoras: Maria Alice Zarur Coelho, D.Sc
Tatiana Felix Ferreira, Química**

Saccharomyces cerevisiae é provavelmente a levedura mais importante e largamente utilizada desde tempos mais remotos em panificação e na produção de etanol, incluindo fabricação de cervejas e vinhos. Cerca de 11 milhões de toneladas de células secas por ano desta levedura são geradas como subproduto das indústrias de alimentos e alcooleira, o que a torna uma matéria-prima barata.

Saccharomyces cerevisiae tem a β -glucana como um dos principais componentes da parede celular. Este polissacarídeo reduz o nível de glicose na corrente sangüínea, e, além disso, apresenta propriedade anti-tumoral e anti-inflamatória.. A β -glucana tem sido utilizada em vários setores como na indústria de alimentos, no tratamento e prevenção de doenças e na indústria de cosméticos.

A indústria de cosméticos tem crescido muito e vem sendo objeto de muitos estudos e análises. Os investimentos nessa indústria para o lançamento de novos produtos são cada vez maiores. Novos produtos surgem baseados em substâncias bioativas obtidas da grande biodiversidade brasileira e a β -glucana é um exemplo dessas substâncias.

Nesse trabalho, produziu-se “ghosts” de *Saccharomyces cerevisiae* contendo β -glucana para serem utilizados no preparo de emulsões. Estas emulsões foram preparadas utilizando óleo de buriti e suspensão aquosa de β -glucana, variando a concentração dos dois biocomponentes: 20 e 50% (v/v) de óleo e 0,05, 0,1 e 1,0 % (v/v) de β -glucana.

A amostra contendo 50% (v/v) de óleo e 0,05% (v/v) de β -glucana foi a que formou a emulsão mais estável, gerando somente uma fase, que demorou algumas horas para perder a estabilidade. Já as demais emulsões apresentaram separação das fases aquosa e orgânica logo

após a preparação. A amostra contendo 50% (v/v) de óleo e 0,1% (v/v) de β -glucana também apresentou certa estabilidade formando uma fase de emulsão entre as fases aquosa e orgânica depois de algumas horas.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO.....	1
I.1) β -glucana.....	1
I.2) Fontes de β -glucana.....	2
I.2.1) Grãos de Cereais.....	2
I.2.2) Algas	3
I.2.3) Cogumelos.....	4
I.2.4) Leveduras.....	6
I.3) <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
I.3.1) Estrutura Interna da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
I.3.2) Parede Celular da Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
I.3.3) Enzimas Líticas.....	9
I.3.4) <i>Sacchoromyces cerevisiae</i> como fonte de β -glucana.....	9
I.4) Aplicações de β -glucanas.....	10
I.4.1) β -glucanas na indústria de alimentos.....	10
I.4.2) β -glucanas em tratamentos e prevenções de doenças.....	10
I.4.3) β -glucanas na indústria de cosméticos.....	11
I.5) Cosméticos.....	11
I.6) Buriti.....	14
I.7) Emulsão.....	15
CAPÍTULO II - OBJETIVO.....	16
CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
III.1) Microorganismo	17
III.2) Matérias-primas utilizadas.....	17
III.3) Metodologia.....	17
III.3.1) Preparação dos “ghosts”	17
III.3.2) Preparo das emulsões.....	18
III.3.3) Aquisição e Tratamento de imagens.....	19
III.3.4) Teste de Capacidade de Estabilidade da Emulsão.....	20

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	21
IV.1) Preparo das emulsões.....	21
IV.2) Aquisição e Tratamento das Imagens Digital.....	22
IV.3) Distribuição do Tamanho das Micelas.....	23
IV.4) Teste de Capacidade de Estabilidade da Emulsão.....	25
CAPÍTULO V - CONCLUSÃO.....	26
CAPÍTULO VI - SUGESTÕES.....	27
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	28
GLOSSÁRIO.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura de β -glucanas.....	2
Figura 2: Cevada e Aveia.....	3
Figura 3: Frutificação de <i>Agaricus subrufescens</i> com píleo aberto e detalhe da estrutura química da (1 \rightarrow 6)-(1 \rightarrow 3) β -glucana isolada deste fungo.....	5
Figura 4: Esquema da estrutura da parede celular de um cogumelo.....	5
Figura 5: Colônia (a) e Célula (b) de <i>S. cerevisiae</i> . Leveduras selvagens.....	6
Figura 6: <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 7: Estrutura celular de levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
Figura 8: Composição e estrutura da parede celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
Figura 9: Creme a base de β -glucana.....	12
Figura 10: Óleo trifásico de buriti.....	13
Figura 11: Desodorante corporal de polpa de buriti.....	13
Figura 12: Sabonete esfoliante de buriti com semente de linhaça.....	13
Figura 13: Árvore e Fruto do Buriti.....	14
Figura 14: Ultra-Turrax®, modelo T-25, marca Kia®.....	18
Figura 15: Equipamento utilizado para aquisição de imagens.....	19
Figura 16: Emulsões.....	21
Figura 17: Emulsões 24h após a preparação.....	22
Figura 18: Etapas do processo de tratamento das imagens.....	23
Figura 19: Distribuição do tamanho das micelas para amostra 4.....	23
Figura 20: Distribuição do tamanho das micelas para amostra 5.....	24

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição do creme a base de β -glucana.....	12
Tabela 2: Composição das emulsões.....	18
Tabela 3: Análise do tamanho das micelas.....	25

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

Os biopolímeros têm sido objetos de intensa pesquisa, tendo em vista seu elevado potencial de aplicação em diferentes setores. Os polissacarídeos de origem microbiana além de apresentarem propriedades similares ou superiores aos de origem vegetal e algas marinhas são, muitas vezes, capazes de formar soluções viscosas. Alguns deles também formam géis em meio aquoso, mesmo em baixas concentrações e, em alguns casos, esses biopolímeros são utilizados como substratos para o desenvolvimento de novos produtos (Barbosa *et al.*, 2004). Dentre os biopolímeros mais estudados trataremos em especial da β -glucana.

I.1) β -glucana

β -glucanas são polímeros não cíclicos de anidroglicose unidos por ligações β -1,3 glicosídicas contendo ramificações β -1,6 que desempenham uma variedade de funções biológicas. Podem ser encontradas em microorganismos e plantas superiores, como principais constituintes da parede celular, como material citoplasmático, material de reserva vacuolar e como substâncias extracelulares (Hinton & Pressey, 1980).

As β -glucanas foram identificadas pela primeira vez há 40 anos, e desde então, suas atividades têm sido amplamente estudadas e utilizadas na prática. São recomendadas na dieta humana por apresentarem inúmeras propriedades bioativas, são imunoestimulantes, reduzem o nível de glicose na corrente sanguínea, e, além disso, apresentam propriedades anti-tumoral e anti-inflamatória.

Este polissacarídeo é o principal componente da parede celular de leveduras, chegando a até 30% do peso seco da célula. A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* contém duas frações de β -1,3 glucana (uma solúvel em álcali e outra insolúvel) e uma fração de β -1,6 glucana com poucas ligações β -1,3 (insolúvel em álcali e solúvel em soluções diluídas de ácido). As β -1,3 glucanas têm tamanho estimado de 1.500 resíduos de glicose, enquanto que as β -1,6 glucanas são menores, apresentando de 150 a 200 resíduos (Stratford, 1994). A Figura 1 mostra a estrutura de β -glucanas.

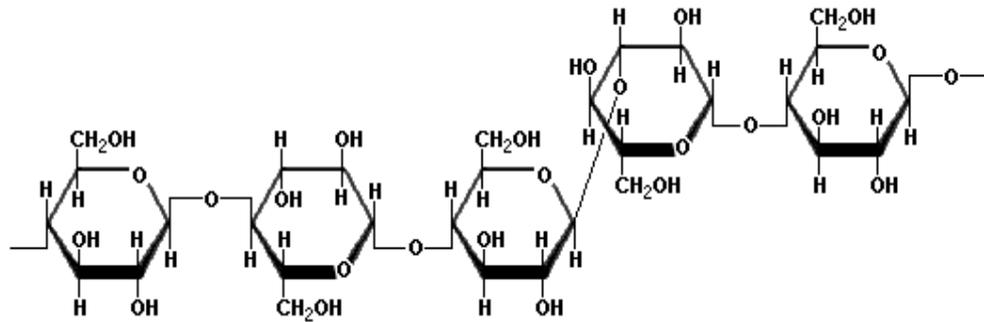


Figura 1: Estrutura de β -glucanas (Fonte: www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html)

O interesse comercial em polissacarídeos da parede celular de leveduras vem aumentando (Nguyen *et al.*, 1998) e as β -glucanas vêm ganhando destaque nas indústrias. Isso ocorre principalmente porque essas substâncias bioativas estão disponíveis em larga escala já que a levedura *S. cerevisiae* é um subproduto das indústrias de fermentação. Sendo assim, esse polissacarídeo tem sido amplamente utilizado na indústria alimentícia, farmacêutica e de cosméticos.

I.2) Fontes de β -glucana

I.2.1) Grãos de Cereais

As β -glucanas existem em cereais como fibras solúveis que formam os componentes estruturais das paredes celulares dos grãos e se concentram principalmente na camada sub-aleurona e aleurona, onde estão presentes as maiores quantidades de células da parede. São polissacarídeos lineares, não ramificados, compostos por unidades de glicose (β -D-glicopiranosil) unidas por ligações glicosídicas β -1,4 e β -1,3. As ligações β -1,4 respondem aproximadamente por 70% das ligações glicosídicas, e ocorrem em seqüência de duas ou três unidades de glicose, interrompidas por uma ligação β -1,3 isolada. São solúveis em água e resistentes aos processos digestivos humanos. Existem diferenças entre as β -glucanas do farelo e do endosperma. As β -glucanas do farelo produzem soluções com viscosidade mais alta e apresentam maior concentração de proteínas e outros carboidratos do que as soluções de β -glucanas do endosperma (De Sá & Soares, 1998).

Este polissacarídeo atua como fibra alimentar, estando presente em mínimas quantidades no trigo e centeio, porém em grande concentração em aveias e em cevada (De Sá

& Soares, 1998). A Figura 2 mostra os cereais que apresentam as maiores concentrações dessas fibras alimentares.



Figura 2: Cevada e Aveia (Fonte:pt.wikipedia.org)

As β -glucanas presentes em cereais diminuem a taxa de colesterol, principalmente em indivíduos hipercolesterolêmicos e atenuam a resposta glicêmica e insulínica pós-prandial, o que possibilita sua utilização no controle ou retardo do aparecimento de doenças crônicas, como doenças coronárias e diabetes melito (De Sá & Soares, 1998).

1.2.2) Algas

As algas são organismos eucariotos relativamente simples, que não possuem tecidos (raízes, caules e folhas), podendo ser unicelulares ou pluricelulares (agregados de células formando colônias ou filamentos). Normalmente, são organismos fotoautotróficos, que usam a luz solar como fonte de energia e o CO_2 como fonte de carbono, sendo, assim, incapazes de crescer na ausência de luz e utilizar compostos orgânicos.

Existem três divisões principais onde estão classificados estes organismos fotossintetizantes unicelulares: *Euglenophyta* (Euglenófitas), *Pyrrhophyta* (Dinoflagelados) e *Chrysophyta* (Crisófitas). As crisófitas são subdivididas em três classes: *Chrysophyceae* (algas douradas), *Xanthophyceae* (algas verde-amareladas) e *Bacillariophyceae* (diatomáceas). As algas diatomáceas são organismos em geral unicelulares de grande importância na composição do fitoplâncton, constituindo a fonte alimentar primária para a

fauna aquática. A maioria das espécies desta classe é planctônica, porém podemos encontrar algumas espécies em sedimento ou sobre outras algas ou plantas.

A principal substância de reserva das diatomáceas é o carboidrato chamado crisolaminarana, a qual está localizada dentro de vesículas celulares. A crisolaminarana de diatomáceas difere da laminarana, que é o material de reserva das macroalgas marrons, por não apresentarem terminais redutores de manitol. A descoberta de β -1,3 glucana *O*-substituída, com ramificações em C-6, que compreendia aproximadamente 14% do peso seco da diatomácea marinha *Phaeodactylum tricornutum*, foi a primeira caracterização química detalhada da crisolaminarana. Myklestad (1989) estudando o polissacarídeo de reserva da diatomácea *Skeletonema costatum*, caracterizou sua estrutura como sendo uma cadeia média de 11 unidades de D-glicose (1-3) ligadas, com ramificações nas posições 2 e 6. Este foi o primeiro registro de ligações 1,2 em polissacarídeos de reserva de microalgas, sendo também mais tarde identificadas em algas do continente Antártico.

A função mais conhecida da β -1,3 glucana nas diatomáceas é como produto de reserva. A existência de uma exoenzima β -1,3 glucanase em diatomáceas marinhas provavelmente tem a função de hidrolisar esta glucana. A glicose produzida em quantidade considerável fornece energia para os ciclos metabólicos das microalgas e pode suprir o esqueleto carbônico para a biossíntese de aminoácidos. Outra função atribuída à crisolaminarana em diatomáceas pode estar envolvida no desenvolvimento dos esporos, uma vez que estas estruturas são formadas sob condições de grande acúmulo de glucanas.

1.2.3) Cogumelos

As β -glucanas dos cogumelos são polissacarídeos com função estrutural na parede celular do micélio, dos órgãos de frutificação do fungo, ou ainda podem ser exopolissacarídeos. As β -glucanas da parede celular estão ligadas à quitina (glucosaminaglicana) e proteínas (Mol *et al.*, 1990). Essas moléculas são estruturas altamente ordenadas, formadas principalmente por unidades de glicose (anéis do tipo β -glicopiranosídico), diferenciando-se da celulose das plantas, por exemplo, pelo tipo de ligação entre as unidades desses açúcares da cadeia principal e por possuírem ramificações, apresentando usualmente elevado peso molecular (Cleary *et al.*, 1999; Shu *et al.*, 2003). Essas características conferem ações biológicas distintas a estas macromoléculas sendo a estrutura química, um fator fundamental para a atividade das β -glucanas sobre o sistema imunológico (Brown & Gordon, 2001; Beta Glucan Research, 2003).

Agaricus subrufescens Peck (= *Agaricus blazei* Murrill *sensu* Heinemann, = *Agaricus brasiliensis* Wasser, Diduck, de Amazonas & Stamets), popularmente conhecido no Brasil como Cogumelo Medicinal, é um fungo nativo e cultivado no país. Devido às suas propriedades medicinais, particularmente em relação ao conteúdo e a estrutura da β -glucana com atividade biológica, este vem ganhando importância em diversos países, principalmente para uso nutracêutico (Camelini *et al.*, 2005). A Figura 3 mostra uma fotografia de *Agaricus subrufescens* e a Figura 4 representa a estrutura da parede celular de um cogumelo.

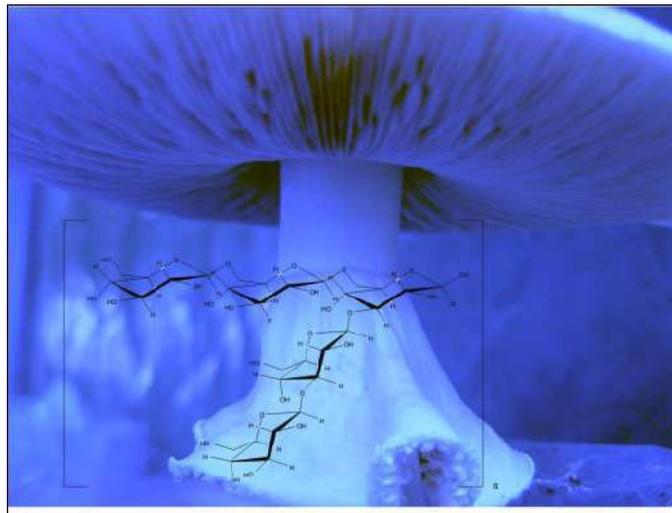


Figura 3: Frutificação de *Agaricus subrufescens* com píleo aberto e detalhe da estrutura química da (1→6)-(1→3) β -glucana isolada deste fungo (Fonte: Camelini *et al.*, 2005)

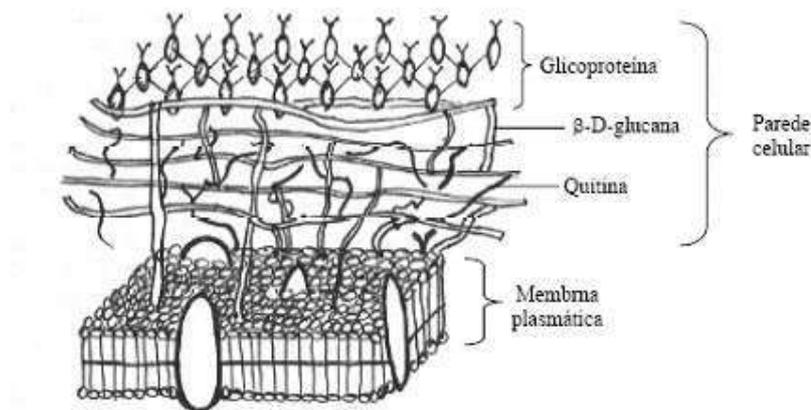


Figura 4: Esquema da estrutura da parede celular de um cogumelo (Fonte: www.iq.unesp.br/flotacao/MODULO4/aula1/aula1.htm#4)

I.2.4) Leveduras

As leveduras são a mais antiga fonte de proteínas unicelulares, consumida inconscientemente pelo homem através de produtos naturais, bebidas e alimentos elaborados por processos fermentativos ao longo dos tempos.

A β -glucana de leveduras consiste em polímeros de cadeias lineares e ramificadas. As estruturas de cadeia linear são polímeros de β -1,3 glicose e as ramificadas, polímeros de β -1,6 glicose. Os polímeros ramificados consistem em uma cadeia de β -1,3 glicose contendo vários graus de ramificações de β -1,6 glicose (Shu *et al.*, 2003). As β -glucanas de leveduras possuem propriedades imunoestimulante, podendo aderir a várias células do sistema imunológico não específico, como macrófagos e neutrófilos. PGG-glucana ou poli-[1,6]- β -D-glicopiranosil-[1,3]- β -D-glicopiranosose é uma β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* geneticamente modificada que vem sendo avaliada em estudos clínicos como um agente imunoestimulante e um modificador de resposta biológica (Shu *et al.*, 2003).

I.3) *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada um organismo modelo para estudos das células eucarióticas e tem sido amplamente utilizadas em produção de etanol combustível, bebidas e pães. É um organismo eucarioto pertencente ao reino Fungi. Esta levedura é constituída de uma única célula, a qual, geralmente, se apresenta sob a forma oval ou esférica. A multiplicação destas células dá origem a uma colônia de aspecto semelhante ao de uma bactéria (Stratford, 1994). A Figura 5 mostra células e colônias de leveduras.

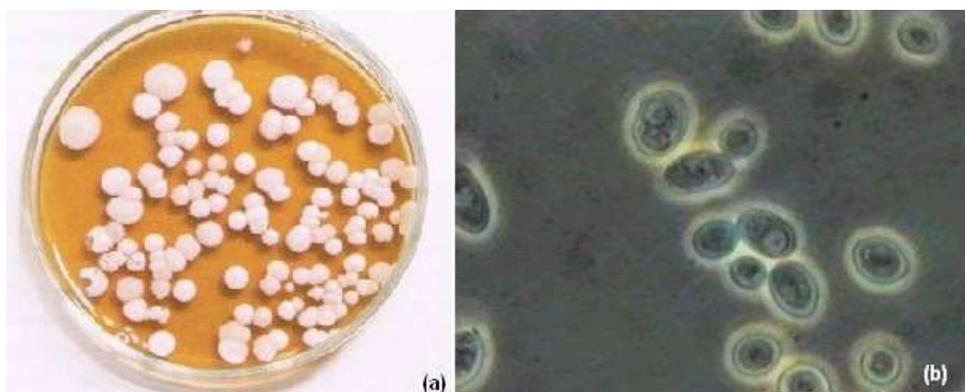


Figura 5: Colônias (a) e Célula (b) de *S. cerevisiae*. Leveduras selvagens (Fonte: Amorim, 2005)

Suas células possuem 5-10 µm de diâmetro e se reproduzem por brotamento (Figura 6). É muito útil no estudo do ciclo celular, pois é de fácil cultivo, mas como um ser eucarioto, possui uma estrutura interna complexa, similar à dos vegetais e animais (Stratford, 1994).

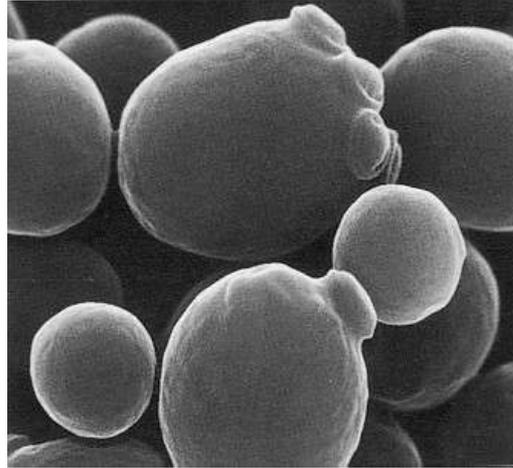


Figura 6: *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: <http://cosmeticbaz.tripod.com/cmglucan.htm>)

1.3.1) Estrutura Interna da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A estrutura interna da célula desta levedura apresenta as organelas características de uma célula eucariótica, como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático e outras (Figura 7). De forma semelhante às plantas, a levedura *S. cerevisiae* tem parede celular rígida e também um grande vacúolo no citoplasma, o qual pode acumular água e, assim, alterar o volume da célula. Por esta razão, estas células podem aumentar ou diminuir de volume e até mesmo perder toda água sem perda de viabilidade. O material genético está organizado, no núcleo destas células, em 16 cromossomos.

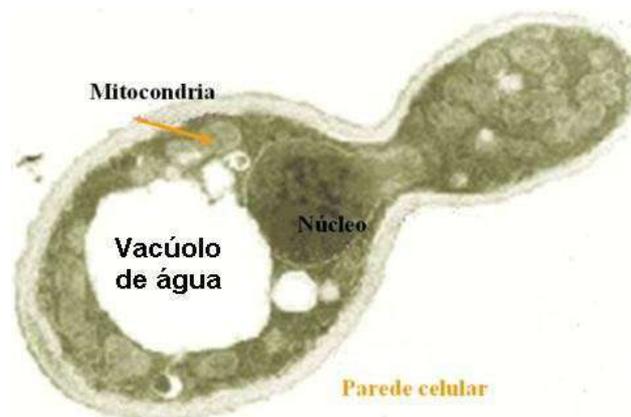


Figura 7: Estrutura celular de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: Stratford, 1994)

1.3.2) Parede Celular da Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

As células de leveduras são envolvidas por uma resistente e rígida parede celular que representa 20-25% do seu peso seco (Fleet, 1991; Klis, 1994). A parede celular de leveduras tem muitas funções: proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva. Além dessas funções, a parede celular promove rigidez e transporte de nutrientes para o citoplasma, proporcionando a integridade, o metabolismo e o crescimento celular. A parede celular não é uma estrutura estática e sim, uma estrutura em constante crescimento e mudança. Os componentes da parede celular são sintetizados e unidos entre si, onde estruturas especializadas, como os septos, são formados em sincronia com o crescimento e divisão celular (Fleuri & Sato, 2004).

A parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* é formada por três componentes principais: glucana, que é um polímero composto por unidades de glicose unidas por ligações β -1,3 e β -1,6, mananaproteínas e quitina, que é um polímero de β -1,4 N-acetilglicosamina. Possui duas camadas principais: uma externa, composta de mananaproteínas e uma interna, de glucana. A camada de mananaproteínas sobrepõe a camada de glucana, o que explicaria a resistência das células vivas de leveduras ao ataque de misturas enzimáticas elaboradas por alguns microorganismos (Fleuri & Sato, 2004). A Figura 8 representa a estrutura da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*.

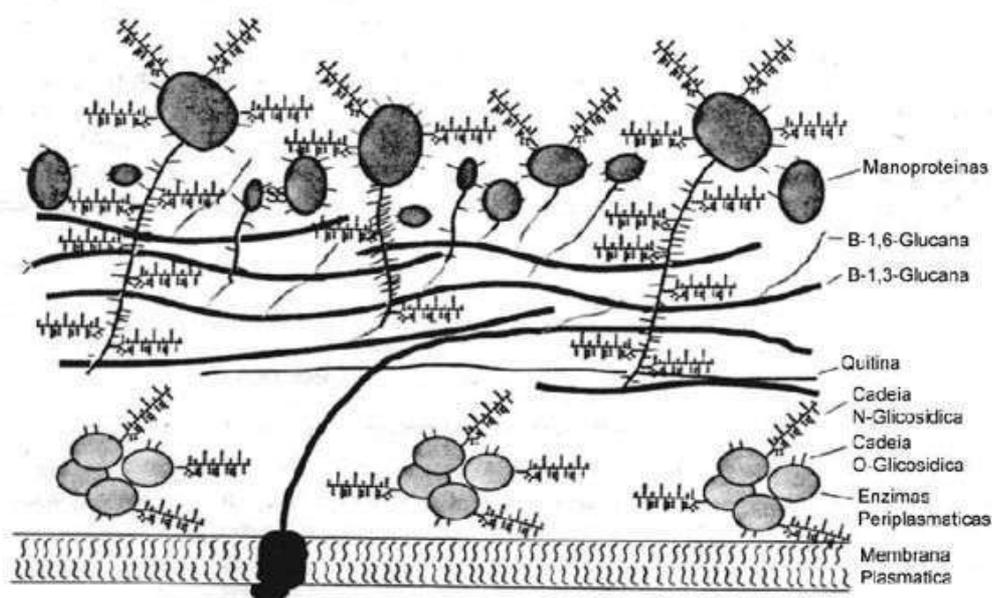


Figura 8: Composição e estrutura da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Fonte: Stratford, 1994)

1.3.3) Enzimas Líticas

Existem microrganismos capazes de lisar a parede celular de leveduras. Estes microrganismos utilizam algumas enzimas que agem em grupos específicos da parede celular, e em conjunto degradam esta parede. As enzimas mais importantes para o rompimento da célula são a protease lítica específica, para degradar a camada externa de mananaproteína, e a β -1,3-glucanase lítica, para degradar a camada interna de glucana. Dentre outras utilizações, as enzimas líticas podem ser usadas no pré-tratamento para ruptura mecânica de células, pois reduz a energia necessária e aumenta a eficiência do processo.

As enzimas líticas têm sido utilizadas também como ferramenta para determinação da composição da parede celular de leveduras e no estudo do mecanismo da síntese da parede celular para controle de leveduras patogênicas (Fleuri & Sato, 2004).

*1.3.4) **Saccharomyces cerevisiae** como fonte de β -glucana*

No Brasil, são geradas cerca de 11 milhões de toneladas por ano de células de leveduras como subprodutos das indústrias de alimentos e alcooleira. Devido à presença de inúmeras substâncias bioativas estas células possuem alto valor nutricional. Mas a degradação da parede celular e a separação dos compostos bioativos presentes na parede ou no interior das células são processos ainda desafiantes. No entanto, substâncias intracelulares de baixo peso molecular são facilmente obtidas após permeabilização das células com solvente orgânico e vigorosa agitação (Serrano *et al.*, 1973). As membranas do citoplasma e das organelas celulares são rompidas e a barreira de permeabilidade celular é desfeita. As estruturas obtidas são denominadas “ghosts”, onde o material de revestimento é a parede celular, e o núcleo, as macromoléculas intracelulares.

Os “ghosts” são estruturas de grande interesse visto que possuem a parede celular íntegra e composta por cerca de 48-60% de β -glucana. Além disso, muitos trabalhos científicos confirmam os benefícios causados pela ingestão desse polissacarídeo quando este provém da parede celular de leveduras.

I.4) Aplicações de β -glucanas

I.4.1) β -glucanas na indústria de alimentos

Até recentemente, a expressão “alimentos funcionais” estava restrita a profissionais das áreas de saúde e nutrição. No início da década passada, o tema migrou dos laboratórios e congressos científicos para a mídia e, em pouco tempo, a discussão sobre alimentos funcionais e nutracêuticos ganhou espaço junto à sociedade.

As β -glucanas são ingredientes funcionais em potencial e a conveniência ou não de estimular sua incorporação em alimentos deve ser mais estudada. Na indústria de alimentos tem sido utilizada em produtos como fibras alimentares, espessantes, estabilizantes não calóricos, em sorvetes e cremes, em produtos extrusados para a melhoria da textura e também pela sua capacidade de formar gel (Nguyen *et al.*, 1998).

I.4.2) β -glucanas em tratamentos e prevenções de doenças

Na indústria farmacêutica, as β -glucanas têm sido utilizadas por sua ação hipocolesterolêmica e hipoglicêmica, pela capacidade de aumentar as resistências do sistema imunológico no tratamento de certos tumores malignos, em infecções causadas por algumas bactérias e vírus, e em pomadas, agindo como antiinflamatório e diminuindo irritações na pele (Nguyen *et al.*, 1998).

Alguns estudos têm demonstrado que dietas suplementadas com farelo de aveia promovem decréscimo significativo do colesterol sérico total, fração LDL-colesterol e da razão HDL/LDL colesterol em humanos hipercolesterolêmicos e animais. (Braaten *et al.*, 1994; Behal *et al.*, 1997; Bell *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 1981). Esta qualidade hipocolesterolêmica da aveia é atribuída principalmente às β -glucanas que possuem capacidade de aumentar a síntese de ácidos biliares e reduzir a absorção do colesterol resultando, por conseguinte, na diminuição do colesterol sanguíneo (De Sá & Soares, 1998; Duarte & Costa, 1997). Também existem evidências de que as β -glucanas têm efeito protetor no desenvolvimento do câncer de cólon e na menor absorção da glicose por diabéticos (De Sá & Soares, 1998; Hallfrishcht *et al.*, 1995; Pick *et al.*, 1996).

Desde 1940, cientistas vêm pesquisando um produto obtido a partir da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, comercializado como Zymosan® na Europa. Este produto inclui a parede celular da levedura, e é constituído por proteínas, lipídios e polissacarídeos, com

capacidade de ativar células independentes do tipo de agressor, vírus, bactérias, fungos, parasitas e células tumorais. Em 1960, foi descoberto que a substância ativa da levedura era o polissacarídeo β -glucana, e em 1975, este composto foi testado na forma injetável, em nove pacientes com câncer maligno de pele, no *National Cancer Institute* (USA), obtendo-se significativa redução das lesões em curto período de tempo (Beta Glucan Research, 2003).

1.4.3) β -glucanas na indústria de cosméticos

O envelhecimento da pele e o estresse submetido a ela têm se tornado sérios problemas. Uma das soluções para manter a pele em sua condição natural e saudável é suplementá-la com compostos biologicamente ativos. Extratos crus de leveduras são usados em cosméticos e aplicações farmacêuticas há muito tempo por possuírem fortes propriedades antioxidantes, combatendo radicais livres. (Kim & Yun, 2006).

A β -glucana isolada da parede celular de leveduras contém uma fração insolúvel em água que não é adequada para algumas aplicações. Porém, as propriedades toxicológicas indesejáveis da glucana insolúvel, como a formação de granulomas, têm atraído interesses em preparações de glucana insolúvel para cosméticos.

β -glucanas apresentam resultados bastante promissores no combate ao envelhecimento da pele, estimulam as células imunológicas da pele o que leva ao aumento da formação das células básicas para a manutenção da firmeza da pele, isto é, colágeno e elastina (A Calvície e o Rejuvenescimento, 2007).

I.5) Cosméticos

Ao contrário do que ocorre em muitos outros setores industriais, a indústria de cosméticos tem crescido muito e vem sendo objeto de muitos estudos e análises, sejam acadêmicos ou não.

A indústria de cosméticos é classificada como um segmento da indústria química, juntamente com perfumaria, higiene pessoal e limpeza. Juntos, esses segmentos respondem por algo em torno de 1/8 da produção da indústria química mundial. Com todo o investimento que a indústria de cosméticos vem movimentando podemos observar que diversos novos

produtos têm sido lançados no mercado. Esses produtos contêm as mais variadas formulações, como por exemplo, cosméticos contendo β -glucana.

Cosméticos a base de β -glucanas são comercializados por diversas empresas. Pesquisas mostram que cerca de 0,04% desse polissacarídeo em produtos relacionados a Fatores de Proteção Solar (FPS) diminui consideravelmente a formação de peróxidos na superfície da pele – 59% de inibição. Quando a concentração desse polissacarídeo é aumentada para 0,2% a proteção é quase completa – 94,9% (<http://cosmeticbaz.tripod.com/cmglucan.htm> acesso em fev. de 2007).

Assim, encontramos no mercado desde cosméticos com concentrações muito baixas de β -glucana até formulações contendo valores mais elevados, como por exemplo, um creme a base retinol e vitaminas contendo 1% de β -glucana (Figura 9). A Tabela 1 apresenta a composição desse creme comercial.



Figura 9: Creme a base de β -glucana (Fonte: <http://www.mydiscountvitaminonline.com>)

Tabela 1: Composição do creme a base de β -glucana

Ingredientes
Água, Propileno Glicol, Sorbitol, Estearato de Glicerina, Stearath-20
600mg de β -glucana, Retinol A 600.000 IU
Vitamina E, 1000 IU metil parabeno, propil parabeno

Fonte: <http://www.mydiscountvitaminonline.com>

Outro componente que tem sido facilmente encontrado nas formulações de cosméticos é o óleo de buriti. No mercado temos acesso fácil a cremes, sabonetes, entre outros cosméticos contendo esse óleo em sua composição (Figuras 10, 11 e 12).



Figura 10: Óleo trifásico de buriti (Fonte: www.natura.com.br)



Figura 11: Desodorante corporal de polpa de buriti (Fonte: www.natura.com.br)



Figura 12: Sabonete esfoliante de buriti com semente de linhaça (Fonte: www.natura.com.br)

I.6) Buriti

Buriti é um nome derivado do tupi-guarani e significa “o que contém água”. Típico das regiões brejosas, o buriti é uma palmeira de grande porte, com até 35m de altura e folhas grandes dispostas em leque. Suas flores são amareladas e caem em longos cachos. O fruto castanho-avermelhado tem superfície revestida por escamas brilhantes e polpa de cor amarelo forte. Nas regiões onde se encontra, o buriti é a planta mais importante, de onde o homem local aprendeu a retirar parte essencial do seu sustento. Por isso é considerada pelos nativos como a *Árvore da Vida*, pois dela tudo se aproveita. É explorada de diversas formas: fruto para consumo *in natura*; extração de óleo; doces; sorvetes; vinho da polpa: tocos para postes, pontes e canoas; extração da larva de um coleóptero conhecido por “*turu*” no Brasil e “*suris*” no Peru; folhas usadas em coberturas; fibras para confecção de cordas, redes e esteiras. Outro uso corrente do fruto é na alimentação animal. É uma fruta muito rica em Vitamina C, Vitamina A, contendo também óleo, Cálcio, Ferro, Niacina, Riboflavina e Tiamina. Seu uso cosmético é devido à sua composição em ácidos graxos: o óleo de buriti possui propriedades emolientes, que proporcionam maciez e um toque sedoso à pele.



Figura 13: Árvore e Fruto do Buriti (Fonte: <http://pt.wikipedia.org>)

I.7) Emulsão

Emulsão é a mistura de dois líquidos imiscíveis, sendo que um deles fica disperso no outro, na forma de pequenos glóbulos. O líquido que forma os glóbulos é chamado de fase dispersa, e o outro de fase contínua. Na fase dispersa, o tamanho das partículas pode variar de 0,1 a 5,0 μm (Stratford, 1994).

Normalmente, as emulsões são instáveis, necessitando-se de um agente estabilizante. Quando a gordura está em contato com a água, ocorre uma grande tensão interfacial entre as fases. O agente emulsificante atua reduzindo esta tensão, permitindo a formação de uma emulsão sem muito gasto de energia, além de aumentar a estabilidade do sistema. Para que isso ocorra, os agentes emulsificantes devem possuir afinidade com a água e com a gordura ao mesmo tempo, isto ocorre quando há grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula. Exemplos de agentes emulsionantes são os detergentes, que são capazes de emulsionar óleos em água, criando uma suspensão coloidal (Stratford, 1994).

Como exemplo de emulsões típicas pode-se citar a maionese e o leite, ambos apresentam a gordura como fase dispersa na água. Também podemos tomar como exemplo, a indústria farmacêutica, que usa preparações gordurosas finamente divididas em suspensão (Stratford, 1994).

CAPÍTULO II - OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi obter “ghosts” de levedura *Saccharomyces cerevisiae* contendo β -glucana da parede celular, e utilizar esses “ghosts” para a preparação de emulsões estáveis com óleo de buriti visando aplicá-las em cosméticos.

CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS

III.1) Microorganismo

O microorganismo utilizado foi *Saccharomyces cerevisiae* proveniente do fermento da marca Fleischmann.

III.2) Matérias-primas utilizadas

O óleo de buriti utilizado foi proveniente da BERACA, gentilmente cedido pelo Laboratório de Tecnologia de Produtos Naturais do Prof. Daniel Weingart Barreto. A enzima utilizada foi amiloglicosidade fúngica de *Rhizopus* (280 U/mL) proveniente da SIGMA.

III.3) Metodologia

III.3.1) Preparação dos “ghosts”

Os “ghosts” foram obtidos seguindo a metodologia proposta por Ferreira (2007).

Permeabilização celular

Suspendeu-se o fermento de panificação em tampão acetato 0,075 mM e 0,4% de etanol e agitou-se em vórtex. Para liberação da trealose o procedimento de agitação foi repetido algumas vezes com intervalos para repouso da solução. Após a permeabilização, as células foram lavadas e centrifugadas, e o resíduo foi suspenso em tampão acetato 0,2 M.

Tratamento com pérolas de vidro

Alíquotas da suspensão de células permeabilizadas foram incubadas com pérolas de vidro. A suspensão foi submetida a ciclos de agitação em vórtex com intervalos em banho de gelo.

Tratamento enzimático

Após tratamento com pérolas de vidro, adicionou-se às células tampão acetato 0,2 M, ácido acético 3M e a preparação enzimática, contendo amiloglicosidase. Levou-se a suspensão ao banho para que houvesse hidrólise total do glicogênio e parcial da β -glucana. Os

“ghosts” contendo β -glucana parcialmente hidrolisada foram, então, lavadas e suspensos em água destilada.

III.3.2) Preparo das emulsões

Foram preparadas seis amostras de emulsões de óleo de buriti e suspensão aquosa de β -glucana com volume final de 70 mL. As amostras possuíam duas concentrações diferentes de óleo de buriti (20 e 50% v/v) e para cada concentração de óleo preparou-se soluções com três diferentes concentrações de β -glucana (0,05, 0,1 e 1,0% v/v). A Tabela 2 mostra a composição de cada emulsão.

Tabela 2: Composição das emulsões

Amostra	Óleo (%)	β -Glucana (%)
1	20	0,05
2	20	0,1
3	20	1,0
4	50	0,05
5	50	0,1
6	50	1,0

As emulsões foram preparadas com auxílio do Ultra-Turrax®, modelo T-25, marca KIA® (Figura 14), operando a 13500 rotações por minuto durante 5 minutos.



Figura 14: Ultra-Turrax®, modelo T-25, marca Kia®

III.3.3) Aquisição e Tratamento de imagens

As imagens foram obtidas em microscópio óptico modelo Eclipse E200, marca Nikon®, com auxílio de câmera fotográfica acoplada (Figura 15). A ampliação total utilizada no microscópio óptico foi de 1000 x e as imagens foram obtidas com o auxílio do programa Qcapture 2.73.0, marca *Quantitative Imaging Corporation*® e o tratamento de dados foi feito em Matlab 7.0 (*The Math Works Inc.*,1997). O programa lê uma imagem como um vetor a duas dimensões, ou seja, uma matriz onde cada elemento desta corresponde a um único *pixel* da imagem (Freire *et al.*, 2005).



Figura 15: Equipamento utilizado para aquisição de imagens

O programa desenvolvido por Freire *et al.* (2005) para determinar o diâmetro das micelas das emulsões está dividido em três componentes principais: a binarização das imagens obtidas, a quantificação das micelas e o cálculo de parâmetros estatísticos. A binarização consiste na conversão da imagem obtida para uma imagem a preto e branco, com o seu subsequente tratamento de forma a eliminar possíveis ruídos. Esta parte é efetuada de forma a transformar uma matriz de três dimensões em uma matriz de duas dimensões composta simplesmente por elementos 0's (*pixels off*) e 1's (*pixels on*), facilitando o seu posterior tratamento e quantificação dos objetos em causa. A segunda componente do programa efetua a quantificação das micelas, apresentando resultados como diâmetro e área de cada micela. Por último existe uma componente que reúne os dados de um determinado número de imagens já quantificadas anteriormente e dá um resultado final do número de objetos analisados, do desvio padrão da medição do diâmetro, o diâmetro médio final e ainda o histograma da distribuição de tamanhos das micelas.

III.3.4) Teste de Capacidade de Estabilidade da Emulsão

Foi realizado um teste para verificar a estabilidade da emulsão contendo 50% v/v de óleo de buriti e 0,05% v/v de β -glucana, já que esta amostra foi a que apresentou melhor resultado visual, formando apenas uma fase. A capacidade de estabilidade da emulsão foi determinada por uma modificação do procedimento realizado por Smiles *et al.* (1989). Adicionou-se 10 mL da amostra em um tubo graduado e centrifugou-se a 1300 g por 5 minutos numa centrífuga modelo 2K15 da marca SIGMA. Depois, mediu-se o volume das fases que se separam e o volume de emulsão que permaneceu estável. A estabilidade, então, é calculada através da porcentagem do volume de emulsão que não se separou em relação ao volume inicial.

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES

IV.1) Preparo das emulsões

A Figura 16 mostra as emulsões que foram preparadas com diferentes concentrações de óleo de Buriti e β -glucana. É possível observar que a amostra 4, formada por 50% do óleo e 0,05% de β -glucana, obteve o melhor resultado na formação de emulsão. As demais amostras apresentaram separação de fases logo após a preparação. A amostra 5, formada por 50% de óleo e 0,1% de β -glucana, foi uma exceção, pois apresentou três fases: uma fase aquosa, uma fase orgânica e uma fase bem pequena de emulsão entre as duas fases citadas anteriormente.

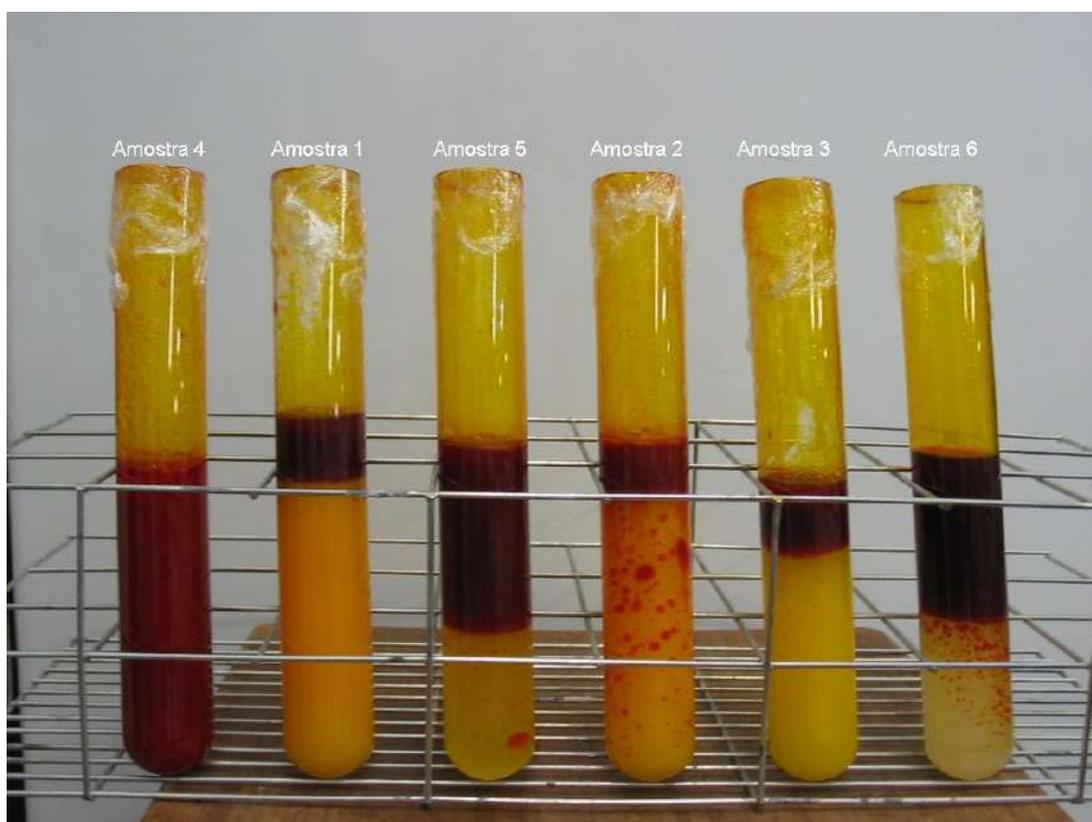


Figura 16: Emulsões Preparadas

Após a retirada de alíquotas da amostra 4 e da fase de emulsão da amostra 5 para aquisição e tratamento das imagens, as amostras permaneceram em repouso. Depois de 24 horas pôde-se verificar que ocorreu separação de fases na amostra 4, assim como, verificou-se também a presença de uma fase de emulsão entre as fases aquosa e orgânica nas duas

amostras analisadas (Figura 17). Foram novamente coletadas alíquotas das amostras 4 e 5 para aquisição e tratamento de imagens, cuidando para que as mesmas fossem retiradas da fase emulsificada.

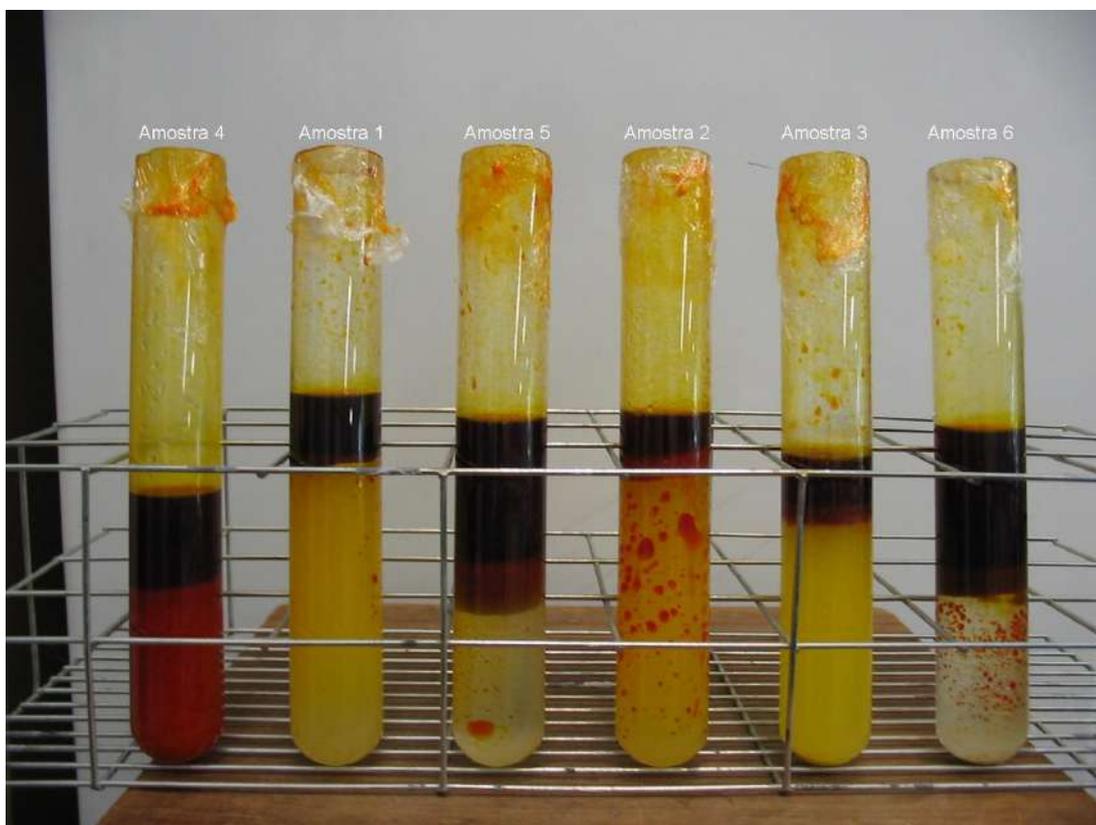
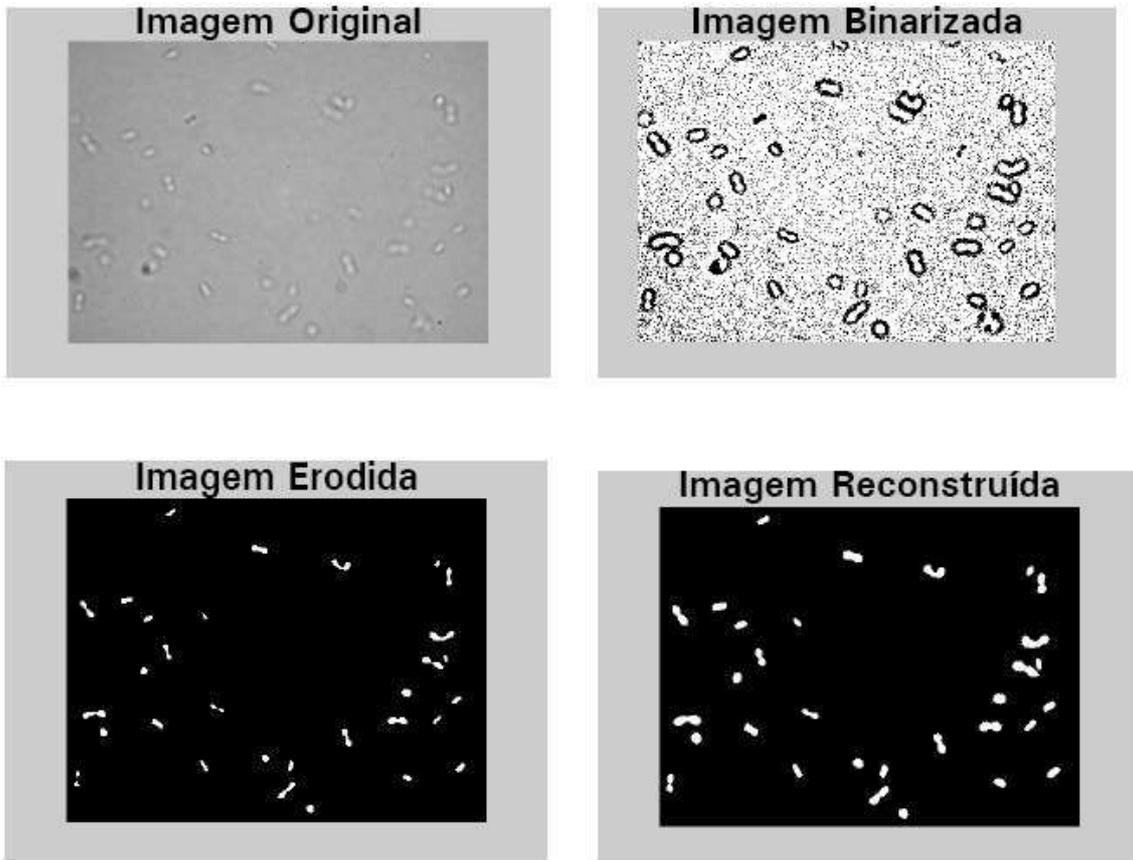


Figura 17: Emulsões 24h após a preparação

IV.2) Aquisição e Tratamento das Imagens Digital

A aquisição de imagens para posterior determinação da distribuição de tamanhos das micelas foi realizada logo após a preparação das emulsões e após 24 horas, possibilitando avaliar o processo de perda de estabilidade das emulsões.

A Figura 18 mostra um exemplo da seqüência de imagens obtidas durante o processo de tratamento, partindo da imagem original até à última imagem tratada usada na quantificação.



.Figura 18: Etapas do processo de tratamento das imagens (Miguez, 2006)

IV.3) Distribuição do Tamanho das Micelas

A distribuição do tamanho de micelas apresenta um comportamento parecido com o de uma gaussiana de acordo com as Figuras 19 e 20.

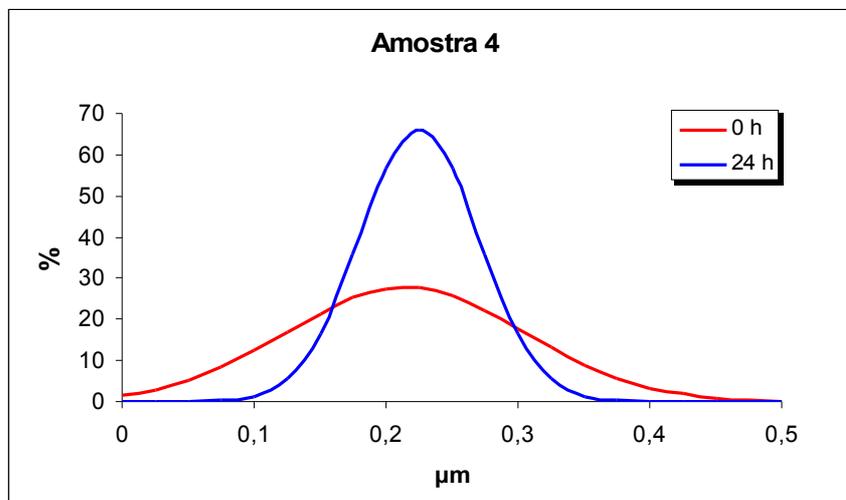


Figura 19: Distribuição do tamanho das micelas para amostra 4

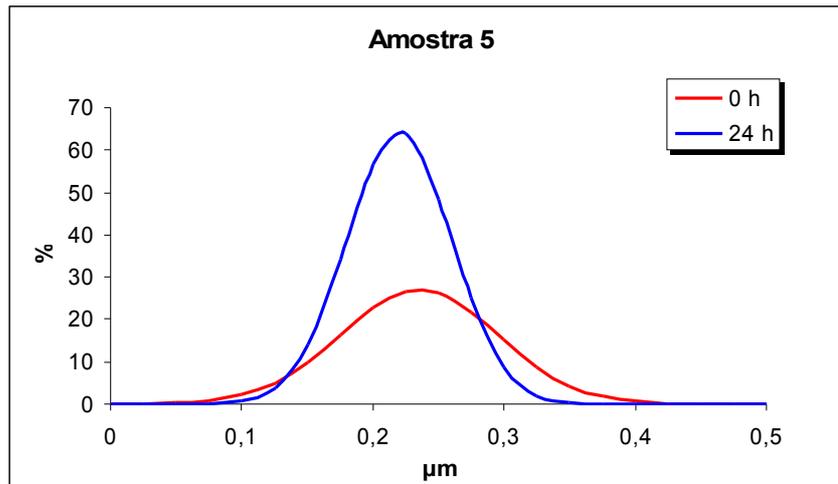


Figura 20: Distribuição do tamanho das micelas para amostra 5

A estimativa dos parâmetros de ajuste do comportamento gaussiano (Eq.1) para a distribuição de tamanho das micelas foi obtida através da ferramenta *solver* do programa *Excel* (Eq.2).

$$f(x) = \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{\left[-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2} \right]}, -\infty < x < +\infty \quad [1]$$

onde :

π : constante $\cong 3,1416$;

e : constante $\cong 2,718$;

μ : constante \cong média aritmética;

σ : constante \cong desvio padrão.

$$fobj = \sum_{i=1}^{np} (y_{exp} - y_{calc})^2 \quad [2]$$

Na Tabela 3 podemos verificar que o diâmetro médio das micelas presentes na amostra 4 é ligeiramente inferior ao das micelas presentes na amostra 5. Após 24 horas, há um pequeno aumento no diâmetro médio das micelas da amostra 4 indicando que esta forma uma emulsão não muito estável. Na amostra 5, parece ocorrer fenômeno inverso, houve uma diminuição do diâmetro médio das micelas. Porém, o fato mais relevante na análise relaciona-se com a diminuição do desvio-padrão, indicando uma maior homogeneidade destas emulsões após 24 h de preparo (Figuras 19 e 20). Esta maior homogeneidade pode ser alcançada por diferentes mecanismos (coalescência ou difusão molecular) que conduzem a perda completa da estabilidade da emulsão. Para verificar qual destes mecanismos é o mais significativo no

sistema em estudo, é necessário a obtenção de dados dinâmicos em um intervalo de tempo maior.

Tabela 3: Análise do tamanho das micelas

Tempo (h)	Amostra 4		Amostra 5	
	Diâmetro médio (µm)	Desvio padrão	Diâmetro médio (µm)	Desvio padrão
0	0,1941	0,0460	0,2334	0,0373
24	0,2222	0,0342	0,1796	0,0249

IV.4) Teste de Capacidade de Estabilidade da Emulsão

A amostra 4 foi adicionada em um tubo graduado até a marca de 10 mL e realizou-se o teste de estabilidade descrito no item 3.3.4. Em seguida verificou-se o volume da emulsão que não havia se separado. A capacidade de estabilidade foi, então, calculada segundo a Eq.3.

$$\% \text{ Capacidade de Estabilidade} = \left(\frac{V_f \text{ da emulsão}}{V_i \text{ da emulsão}} \right) \times 100 \quad [3]$$

O volume final da emulsão foi cerca de 2,2 mL. Assim, obtém-se:

$$\% \text{ Capacidade de Estabilidade} = \left(\frac{2,2}{10,0} \right) \times 100 = 22\%$$

Este resultado indica que a estabilidade da emulsão é baixa, estando esse valor um pouco abaixo do encontrado na literatura para emulsões contendo suspensão na fase aquosa. Porém, outro ponto a ser considerado é o fato de não ter sido adicionado nenhum agente emulsificante, o que reduz a capacidade emulsificante.

CAPITULO V - CONCLUSÃO

A geração de milhões de toneladas por ano de células secas como subprodutos das indústrias de alimentos e alcooleira torna a levedura *Saccharomyces cerevisiae* uma fonte barata de β -glucana.

A metodologia adotada torna o processo ainda viável, pois utiliza “ghosts” de levedura contendo β -glucana, ou seja, não necessita de etapas como extração e purificação desse polissacarídeo, já que esses processos realizados para obtenção de biomoléculas encarecem o processo.

Dentre as emulsões propostas, a amostra contendo 50% (v/v) de óleo de buriti e 0,05% (v/v) de β -glucana de *Saccharomyces cerevisiae* obteve o melhor resultado, sendo a única amostra que foi completamente emulsificada.

A distribuição de tamanho das micelas obtidas após a preparação da amostra contendo 50% (v/v) de óleo de buriti e 0,1% (v/v) de β -glucana, demonstra que há uma dispersão, ou seja, que o tamanho das micelas não é uniforme, indicando que a baixa estabilidade da emulsão. Outro indicador de sua instabilidade é o aumento do tamanho de suas micelas após 24 horas.

CAPÍTULO VI - SUGESTÕES

A metodologia usada neste trabalho pode ser aplicada a outros tipos de óleo. Podemos também testar outras concentrações de óleo e de β -glucana a fim de obter emulsões mais estáveis.

Outro ponto a ser estudado seria a adição de um agente emulsificante para melhorar a estabilidade das emulsões. Além disso, poder-se-ia acompanhar a evolução do tamanho das micelas durante um tempo maior.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. A Calvície e o Rejuvenescimento. Disponível em: <<http://boasaude.uol.com.br/lib/ShowDoc.cfm?LibDocID=3153&ReturnCatID=1770>>. Acesso em fev. de 2007.
2. BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; SILVA, M. L. C.; **Semina** 2004, 25, 29.
3. BEHALL, K.M et al. Effect of beta-glucan level in oat fiber extracts on blood lipids in men and women. *J. Am. Coll. Nutr.*, 16(1): 46-51 (1997).
4. BELL S. et al. Effect of beta-glucan from oats and yeast on serum lipids, *Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, 39 (2): 189-202 (1999).
5. Beta Glucan Research – *Saccharomyces cerevisiae*. Disponível em: www.betaglucan.org. Acesso em: ago. de 2006.
6. BRAATEN, J.T.; WOOD, P.J.; SCOTT, F.W.; WOLYNETZ, M.S.; LOWE M.K., WHITE P.B.; COLLINS, M.W. Oat β -glucan reduces blood cholesterol concentration in hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Clinical Nutrition*, 48, 465-474 (1994).
7. BROWN, G. D; GORDON, S. A new receptor for β -glucans. *Nature*, 413, 36–37 (2001).
8. CAMELINI, C. M.; MENDONÇA, M.; DIAS, P. F.; MARASCHIN, M. β -Glucanas do cogumelo. *Biotechnology - Ciência e Desenvolvimento*, 35,36 (2005).
9. Carboxymethylated Beta-(1-3) Glucan in Skin Care Prophylactic and Therapeutic Activities. Disponível em: <<http://cosmeticbaz.tripod.com/cmglucan.htm>>. Acesso em: fev. de 2007.
10. CHEN WJI et al. Effects of oat bran, guar gum and pectin on lipid metabolism of cholesterol-fed rats. *Nutr. Rep. Int.*, 24, 93-98 (1981).
11. CLEARY, J. A.; GRAHAM, G. E.; HUSBAND, A. J. The effect of molecular weight and β -1,6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1,3)- β -D-glucan. *Immunology and Cell Biology*, 77, 395-403 (1999).
12. DE SÁ RM & SOARES et al. Concentração de beta-glucanas nas diferentes etapas do processamento da aveia (avena sativa L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 18 (4): 425-427 (1998).
13. DIJKGRAAF, G. J. P.; HUIJUAN, L.; BUSSEY, H. Cell-wall β -glucans of *Saccharomyces cerevisiae*. *Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes*, 26, 179-213 (2002).

14. DUARTE HS et al. Alimentos hipocolesterolêmiantes: feijão, soja, farelo de aveia, cebola e alho – seus efeitos e mecanismos de ação. *Cadernos de Nutrição*, 14, 23-40 (1997).
15. FERREIRA, T. F. Um método novo de obtenção de células de *Saccharomyces cerevisiae* permeabilizadas contendo β -glucana parcialmente hidrolisada. 2006. 38f. Trabalho de Conclusão de Curso – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.
16. FLEET, G. H. *Curr. Top. Med. Mycol.* 1985, 1, 24.
17. FLEURI, L. F. and SATO, H. H. Production, purification, cloning and application of lytic enzymes. *Quím. Nova.*, 28 (5), 871-879 (2005).
18. Freire G. M., Dias, A.M.A, Coelho, M.A.Z. Coutinho, J. A.P., Marrucho, I.M, “Ageing Mechanisms of Perfluorocarbon Emulsions using Image Analysis”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 286, 224-232, 2005.
19. GANCEDO, C. Assay of Yeast: Enzymes in situ. *Eur.J.Biochem.*, 61, 479-482 (1973).
20. HINTON, D.M., PRESSEY, R. Glucanase in fruits and vegetables. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 105, 499–502 (1980).
21. “Image Processing Toolbox, For Use With Matlab”, The Math Works Inc., version 2, (1997).
22. JONG, C. S. Fungal cell wall glycans. *Polysaccharides II – Polysaccharides from eukaryotes*, 6,159-178 (2002).
23. KAPTEYN, J. C. *Mol. Microbiol.*, 35, 601 (2000).
24. KAPTEYN, J. C.; VAN EGMOND, P.; SIEVI, E.; VAN DEN ENDE, H.; MAKAROW, M.; KLIS, F. M. *Mol. Microbiol.*, 31, 1835 (1999).
25. KLIS, F. M.; *Yeast*. 1994, 10, 851.
26. KIM, K. S.; YUN. H. S. Production of soluble β -glucan from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* *Enzyme and Microbial Technology*, 39, 496–500 (2006).
27. MANNERS, D. J.; MASSON, A. J.; PATTERSON, J. C. *Biochem. J.*, 135, 19 (1973).
28. MASON, R. Will the real beta glucan please stand up? Disponível em: <<http://www.thenaturalwoman.com/article>>. Acesso em: dez. de 2006.
29. MIGUEZ, M. F. S. Determinação do tamanho de partícula e das características reológicas de emulsões em produtos alimentícios. 2006. 46f. Trabalho de Conclusão de Curso – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

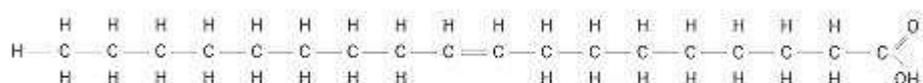
30. MOL, P.C.; VERMEULEM, C. A.; WESSELS, J. G. Diffuse extension of hyphae in stipes of *Agaricus bisporus* may be based on unique wall structure. *Mycological Research*, 94, 480-488 (1990).
31. My Discount Vitamins Online. Disponível em: <http://www.mydiscountvitaminonline.com/site/1307245/product/BETA%20GLUCAN_Cream_with_Retinol_A_Vitamin_E_SS428>. Acesso em: fev. 2007.
32. Natura. Disponível em: <www.natura.com.br>. Acesso em: fevereiro de 2007.
33. NGUYEN, T. H.; FLEET, G. H.; ROGERS, P. L. Composition of the cell walls of several yeast species. *Appl Microbiol Biothechnol*, 50, 206-212 (1998).
34. POPOLO, L.; VAI, M.; *BBA-Gen. Subjects 1426*, 385 (1999).
35. ROSS, G. D.; VETVICKA, V.; YAN, J.; XIA Y.; VETVICKOVA, J. Therapeutic intervention with complement and β -glucan in cancer. *Immunopharmacology*, 42, 61 – 74 (1999).
36. SHU, C. H.; WEN, B. J.; LIN, K. J. Monitoring the polysaccharide quality of *Agaricus blazei* in submerged culture by examining molecular weight distribution and TNF- α release capability of macrophage cell line RAW 264.7 *Biotechnology letters*, 25, 2061-2064 (2003).
37. SOUSA, S. R., Flotação de Microorganismos. Disponível em: <<http://www.iq.unesp.br/flotacao/MODULO4/aula1/aula1.htm#4>>. Acesso em: dez. de 2006.
38. STRATFORD, M. *Yeast*, 10, 1741 (1994).
39. University of Bath, Disponível em: <<http://www.bath.ac.uk/bio-sci/wheals2.gif>>. Acesso em: fev. de 2007.
40. WASSER, S. P.; WEIS, A. L Medicinal properties of substances occurring in higher basidiomycetes mushrooms: Current perspectives. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 1, 31-62 (1999).
41. Wikipedia. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org>>. Acesso em: fev. de 2007.
42. Yeast Beta-D-Glucan. Disponível em: <http://www.pdrhealth.com/drug_info/nmdrugprofiles/nutsupdrugs/yea_0298.shtml>. Acesso em: jan. de 2007.
43. YAMAGUCHI, H. Schematic structure of fungus cell wall. Disponível em: <<http://www.sambomed.co.kr>>. Acesso em set. de 2004.

44. ZAMORA, A. Carbohydrates - Chemical Structure. 2005. Disponível em: <<http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates2.html>>. Acesso em: jan. de 2007.

GLOSSÁRIO

Ácido linoléico: É um tipo da gordura do insaturada, mais concretamente poliinsaturada e pertence ao grupo Omega-6.

Ácido oléico: é um ácido graxo insaturado de cadeia longa possuindo 18 carbonos na sua estrutura.



Agar: Um polissacarídeo complexo usado como agente gelatinizante para preparar meios microbiológicos sólidos e semi-sólidos. O agar consiste de aproximadamente 70% de agarose e de 30% de agarpectina. O ponto de fusão do agar está acima de 100°C e se torna gel a 40-50°C.

Brotamento: Reprodução assexuada (geralmente de leveduras) que começa como uma protuberância da célula progenitora que cresce para formar a célula-filha.

Celulose: É um polímero de "cadeia longa" composto de monômeros de glicose, É o componente estrutural primário das plantas e não é digerível pelo homem. Alguns animais, particularmente os ruminantes, podem digerir celulose com a ajuda de micro-organismos simbióticas. É comum nas paredes celulares de plantas, tendo sido assim notado pela primeira vez em 1838.

Crisolaminarana: polissacarídeo de reserva das diatomáceas.

Emulsão: mistura líquida heterogênea de duas ou mais fases, normalmente não miscíveis entre si, mas mantida em suspensão uma na outra, por forte agitação ou emulsionantes que modificam a tensão superficial.

Espessantes: Substâncias com capacidade de aumentar a viscosidade de soluções, emulsões e suspensões.

Esporos: É uma estrutura de reprodução formada por células haplóides produzidas por meiose, encontrada em plantas e fungos.

Estabilizantes: são aditivos alimentares que asseguram as características físicas de emulsões e suspensões, sendo usualmente aplicados em conservas, doces, sobremesas, laticínios, sopas, caldos concentrados, panificação, massas, alimentos processados, biscoitos, sorvetes, achocolatados e sucos.

Eucarioto: Organismo unicelular ou multicelular com células tendo uma membrana ligada ao núcleo, cromossomos múltiplos e organelas internas.

Fungi: Reino de organismos eucariotos que inclui as leveduras, fungos filamentosos e cogumelos.

Fitoplâncton: conjunto dos organismos aquáticos microscópicos que têm capacidade fotossintética e que vivem dispersos flutuando na coluna de água.

Homeostase: é a propriedade de um sistema aberto, seres vivos especialmente, de regular o seu ambiente interno de modo a manter uma condição estável, mediante múltiplos ajustes de equilíbrio dinâmico controlados por mecanismos de regulação interrelacionados.

Neutrófilos: são uma classe de células sanguíneas leucocitárias, que fazem parte do sistema imunitário do corpo humano sendo um dos 5 principais tipos de leucócitos.

Macrófagos: células de grandes dimensões do tecido conjuntivo, ricos em lisossomos, que fagocitam elementos estranhos ao corpo. Os macrófagos derivam dos monócitos do sangue e de células conjuntivas ou endoteliais. Intervêm na defesa do organismo contra infecções. Também são ativos no processo de involução fisiológica de alguns órgãos.

Micélio: Talo dos fungos, composto de filamentos, chamados de hifas, destituídos de clorofila.

Polímeros: são compostos químicos de elevada massa molecular relativa, resultantes de reações químicas de polimerização. Os polímeros são macromoléculas formadas a partir de

unidades estruturais menores, os monômeros. O número de unidades estruturais repetidas numa macromolécula é chamado grau de polimerização.

Polissacarídeos: Polissacarídeos, ou glicanos, são carboidratos que, por hidrólise, originam uma grande quantidade de monossacarídeos. São polímeros naturais. Estes compostos apresentam uma massa molecular muito elevada que depende do número de unidades de monossacarídeos que se unem. Podem ser hidrolisados em polissacarídeos menores, assim como em dissacarídeos ou monossacarídeos mediante a ação de determinadas enzimas.

Procarioto: Organismo unicelular com um único cromossomo, sem envelope nuclear e sem organela ligada à membrana.

Quitina: é um polissacarídeo, insolúvel e córneo formado por unidades de N-acetilglicosamina. É o constituinte principal das carapaças (exosqueleto) dos artrópodes, e está presente, com menor importância, em muitas outras espécies animais.

Saccharomyces cerevisiae: Leveduras utilizadas basicamente na produção de vinhos, cervejas, pingas, etanol-combustível e pães.

Vacúolo: Espaço ou cavidade que se forma no protoplasma de uma célula.