

CELSO GUARANI RUIZ DE OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSO PARA A PRODUÇÃO DE BIOMASSA
DE LEVEDURA (*Saccharomyces cerevisiae*) RICA EM ORGANOSELÊNIO**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre do Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Paraná.

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

Co-orientadora:
Prof.^a Dr.^a Adriane B. Pedroni Medeiros

CURITIBA

2006

DEDICATÓRIA

À minha esposa Salissa, pelo seu amor e esforço em todo o tempo ao meu lado, te amo. Aos meus pais, Guarani e Gleide, meus grandes amigos, pelo encorajamento e auxílio, admiro vocês e serei sempre devedor do vosso amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus que me deu saúde e força para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol, pela dedicação e orientação nos últimos dois anos.

À Universidade Federal do Paraná, em particular, à Coordenação do Curso de Pós-Graduação, Professora Maria Lúcia, Professor Paulo Fontoura, Professor Renato Sossela de Freitas e Professora Sonia Haracemive pela dedicação ao curso de mestrado.

Ao professor Júlio César de Carvalho, por sua dedicação prestada na correção e sugestões dadas para a melhoria do trabalho.

Ao professor da banca de defesa Dr. José Luis Parada, pelas valiosas idéias e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioprocessos: Mitiyo F. Miyaoka, Elizete, Elza, Débora, Jaime, Cristina Ramirez, Letícia, Cássima, Bruno, Silvia, Marlene, Marcos, Júlio, Herta, Gisele, Clarisse, Radjz, Alexandre, André e Flávera.

À Capes, pelo suporte financeiro, que possibilitou a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| LISTA DE TABELAS | VI |
| LISTA DE FIGURAS | VII |
| LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS | IX |
| RESUMO..... | X |
| ABSTRACT..... | XI |
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 3 |
| 2.1 SELÊNIO | 3 |
| 2.1.1 Distribuição Geográfica do Selênio | 4 |
| 2.1.2 Fontes de Selênio | 6 |
| 2.1.3 Recomendações de Selênio | 10 |
| 2.1.4 Limite Superior Tolerável de Ingestão Relativo ao Selênio | 11 |
| 2.1.5 A Essencialidade do Selênio | 11 |
| 2.1.6 Aspectos Fisiológicos Relativo ao Selênio | 12 |
| 2.1.6.1 Absorção | 12 |
| 2.1.6.2 Armazenamento | 13 |
| 2.1.6.3 Metabolismo | 13 |
| 2.1.6.4 Excreção | 14 |
| 2.1.6.5 Biodisponibilidade | 15 |
| 2.1.7 Toxicidade do Selênio | 15 |
| 2.1.8 Patologias Associadas com a Deficiência de Se..... | 16 |
| 2.1.8.1 Doenças de Keshan e de Kashin-Beck | 16 |
| 2.1.8.2 Patologias em animais associadas com a deficiência de Se | 17 |
| 2.2 FERMENTAÇÃO | 17 |
| 2.2.1 Fermentação Submersa..... | 18 |
| 2.3 LEVEDURAS | 18 |
| 2.3.1 Estrutura Somática..... | 19 |
| 2.3.2 Estrutura de Reprodução | 19 |
| 2.3.3 Metabolismo das Leveduras | 20 |
| 2.3.4 Parâmetros Físicos e Químicos | 22 |
| 2.3.4.1 pH..... | 22 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.4.2 | Temperatura..... | 22 |
| 2.3.5 | Requerimentos Nutricionais | 22 |
| 2.3.5.1 | Substrato..... | 23 |
| 2.3.5.2 | Macroelementos..... | 23 |
| 2.3.5.2.1 | Nitrogênio e suas fontes..... | 23 |
| 2.3.5.2.2 | Relação C:N..... | 24 |
| 2.3.5.2.3 | Fósforo | 24 |
| 2.3.5.2.4 | Outros macroelementos (K, Mg, S) | 25 |
| 2.3.5.3 | Microelementos | 25 |
| 2.3.5.4 | Fatores de crescimento: vitaminas..... | 26 |
| 2.4 | LEVEDURA ENRIQUECIDA DE SELÊNIO | 26 |
| 2.5 | MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ABSORÇÃO ATÔMICA - GERAÇÃO DE HIDRETO PARA DETERMINAÇÃO DE Se ⁴⁺ , Se ⁶⁺ E Se ⁻² | 28 |
| 2.6 | AÇÚCAR MASCAVO..... | 29 |
| 2.7 | PLANIFICAÇÃO EXPERIMENTAL..... | 30 |
| 3 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 31 |
| 3.1 | FLUXOGRAMA DO PROCESSO | 31 |
| 3.2 | MICROORGANISMO..... | 31 |
| 3.3 | PREPARO DO INÓCULO..... | 32 |
| 3.4 | VIABILIDADE CELULAR | 32 |
| 3.4.1 | Procedimento para Determinação da Viabilidade Celular..... | 33 |
| 3.4.2 | Solução de azul de metileno-citrato de sódio..... | 33 |
| 3.5 | AJUSTE E DETERMINAÇÃO DO pH | 33 |
| 3.6 | AJUSTE E DETERMINAÇÃO DO AÇÚCAR..... | 34 |
| 3.6.1 | Procedimento para determinação de açúcares redutores solúveis..... | 34 |
| 3.6.2 | Procedimento para determinação de açúcares totais..... | 35 |
| 3.7 | DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA | 35 |
| 3.8 | COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CRESCIMENTO | 36 |
| 3.9 | PREPARO DO MEIO DE CRESCIMENTO..... | 36 |
| 3.10 | DIGESTÃO DA BIOMASSA PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA- GERAÇÃO DE HIDRETO..... | 37 |
| 3.10.1 | Método de Digestão Sólida para Determinação de Se ⁴⁺ e Se ⁶⁺ | 37 |
| 3.10.2 | Método de Digestão Sólida para Determinação de Se Total..... | 38 |

| | |
|---|-----------|
| 3.11 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 38 |
| 3.12 ESTUDO DAS VARIÁVEIS NUTRICIONAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. cerevisiae</i> | 39 |
| 3.12.1 Planejamento 3^{3-1} para as Variáveis Sacarose, Na_2SeO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 40 |
| 3.12.2 Planejamento 3^{3-1} para as Variáveis Sacarose, Na_2SeO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 41 |
| 3.13 ESTUDO DAS VARIÁVEIS RELAÇÃO C:N E Na_2SeO_3 NA PRODUÇÃO DE Se_{org} . E Se_T NA BIOMASSA DE LEVEDURA | 41 |
| 3.13.1 Planejamento Fatorial Completo 3^{2-0} para Produção de Se_{org} | 42 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 43 |
| 4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 43 |
| 4.2 ESTUDO DAS VARIÁVEIS NUTRICIONAIS DO PROCESSO..... | 47 |
| 4.2.1 Resultado do Planejamento 3^{3-1} para as Variáveis Sacarose, Na_2SeO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 47 |
| 4.2.2 Resultado do Planejamento 3^{3-1} para as Variáveis Sacarose, Na_2SeO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 50 |
| 4.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS RELAÇÃO C:N E Na_2SeO_3 NA PRODUÇÃO DE Se_{org} . E Se_T NA BIOMASSA DE LEVEDURA | 53 |
| 4.3.1 Resultado do planejamento 3^{2-0} para a produção de selênio orgânico..... | 53 |
| 4.3.1.1 Variável dependente: biomassa produzida..... | 54 |
| 4.3.1.2 Variável dependente: selênio orgânico intracelular | 56 |
| 4.3.1.3 Variável dependente: selênio total incorporado na biomassa | 57 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 60 |
| 6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS..... | 61 |
| REFERÊNCIAS..... | 62 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICAS DO ENXOFRE E SELÊNIO..... | 3 |
| TABELA 2 - CONFIGURAÇÃO ELETRÔNICA, ESTADOS DE OXIDAÇÃO E A ABUNDÂNCIA DO S E Se NA CROSTA TERRESTRE, EM PESO | 4 |
| TABELA 3 - QUANTIDADE DE SELÊNIO NOS ALIMENTOS MAIS CONSUMIDOS PELOS BRASILEIROS (EXCETO CASTANHA-DO-PARÁ) | 8 |
| TABELA 4 - QUANTIDADE DE SELÊNIO EM ALGUNS ALIMENTOS DE ORIGEM MARINHA COMERCIALIZADOS NO BRASIL..... | 8 |
| TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE SELÊNIO NA DIETA DE DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS..... | 9 |
| TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO NA DIETA DE DIFERENTES PAÍSES DE ACORDO COM ESTUDOS DA FAO E DA IAEA..... | 9 |
| TABELA 7 - AI DE Se PARA CRIANÇAS DE 0 A 1 ANO DE IDADE..... | 10 |
| TABELA 8 - EAR E RDA DE SELÊNIO PARA OS ESTÁGIOS DA VIDA | 10 |
| TABELA 9 - DRI'S RELATIVAS AO SELÊNIO A PARTIR DE 1 ANO DE IDADE ... | 11 |
| TABELA 10 - COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE LEVEDURA SECA | 23 |
| TABELA 11 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM 1kg DE AÇÚCAR MASCADO | 29 |
| TABELA 12 - MEIO COMERCIAL E MEIO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO | 36 |
| TABELA 13 - VALORES (REAL E CODIFICADO) DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS USADAS NO PLANEJAMENTO 1 | 41 |
| TABELA 14 - VALORES (REAL E CODIFICADO) DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS USADAS NO PLANEJAMENTO 2..... | 41 |
| TABELA 15 - VALORES (REAL E CODIFICADO) DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS USADAS NO PLANEJAMENTO 3..... | 42 |
| TABELA 16 - DADOS OBTIDOS NA CINÉTICA DA <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 43 |
| TABELA 17 - PLANEJAMENTO 3 ³⁻¹ PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA | 48 |
| TABELA 18 - PLANEJAMENTO 3 ³⁻¹ PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA | 50 |
| TABELA 19 - PLANEJAMENTO 3 ²⁻⁰ PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE <i>S. cerevisiae</i> COM Se _{org} | 53 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1 - INFLUÊNCIA DOS FATORES GEOQUÍMICOS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE SE NOS SOLOS E NOS ALIMENTOS..... | 5 |
| FIGURA 2 - METABOLISMO DO SELÊNIO EM ANIMAIS | 14 |
| FIGURA 3 - DIAGRAMA DE FLUXO PARA A PREPARAÇÃO DA LEVEDURA ENRIQUECIDA DE SELÊNIO ORGÂNICO | 31 |
| FIGURA 4 - DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE LEVEDURAS COM AZUL DE METILENO. | 32 |
| FIGURA 5 - CINÉTICA DA <i>S.cerevisiae</i> EM FRASCO DE ERLLENMEYER..... | 44 |
| FIGURA 6 - CURVA LN DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS VIVAS/ml DE MEIO DE FERMENTAÇÃO | 45 |
| FIGURA 7 - CURVA LN DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS TOTAIS/ml DE MEIO DE FERMENTAÇÃO..... | 45 |
| FIGURA 8 - CINÉTICA DA VIABILIDADE CELULAR PARA A <i>S.cerevisiae</i> | 46 |
| FIGURA 9 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE, Na_2SeO_3 E $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 48 |
| FIGURA 10 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA OBTIDA VERSUS Na_2SeO_3 | 49 |
| FIGURA 11 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE E $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | 49 |
| FIGURA 12 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE, Na_2SeO_3 E $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ | 51 |
| FIGURA 13 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES Na_2SeO_3 E $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ | 52 |
| FIGURA 14 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE E $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ | 52 |
| FIGURA 15 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA BIOMASSA..... | 55 |
| FIGURA 16 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA BIOMASSA..... | 55 |
| FIGURA 17 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA Se_{org} . NA BIOMASSA..... | 56 |
| FIGURA 18 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA Se_{org} | 57 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 19 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA Se_T NA BIOMASSA..... | 58 |
| FIGURA 20 - Se_T NA BIOMASSA VERSUS Na_2SeO_3 , LC (95%)..... | 59 |

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------|--|
| AI | Ingestão Adequada |
| aq. | Aquoso |
| Brix | Escala Brix (gramas de sólidos solúveis por 100 ml de solução) |
| DRI | Consumo dietético de referência |
| EAR | Necessidade média estimada |
| FAO | Organização das Nações Unidas para agricultura e alimentação |
| GSHPx | Proteína glutatona peroxidase |
| IAEA | Agência Internacional de Energia Atômica |
| LOAEL | Nível mais baixo de efeito observado |
| LC | Limite de confiança |
| NOAEL | Nível de efeito adverso não observado |
| QM | Quadrado médio |
| RDA | EAR mais dois desvios-padrão |
| Se_T | Concentração de selênio total |
| Se_{org.} | Concentração de selênio orgânico |
| Se-Cis | Selenocisteína |
| Se-Met | Selenometionina |
| UF | Fator de incerteza, $UF = NOAEL/UL$ |
| UL | limite superior tolerável de ingestão |
| VD | Variável dependente |

RESUMO

Propôs-se desenvolver um bioprocesso para a obtenção de biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), tendo alto teor de selênio intracelular. Os experimentos foram realizados em frascos de erlenmeyer de 250 ml, cultivados a 30 °C em incubador “shaker” com agitação de 120 rpm e tempo de fermentação de 23 horas. Foram aplicados dois delineamentos fatoriais fracionários com três níveis (3^{3-1}) com três pontos centrais para a otimização do meio de crescimento, tendo como variável dependente a biomassa celular produzida. Com a definição da composição nutricional do meio, foi realizada uma cinética de crescimento para se conhecer a fase de crescimento exponencial. A seguir foi realizado um delineamento fatorial completo 3^{2-0} para avaliar a influência da concentração do selenito de sódio (10, 25 e 40 mg/l) e a relação C:N (20:1, 60:1 e 100:1) em relação às variáveis dependentes, selênio orgânico intracelular e selênio orgânico total incorporado na biomassa de levedura. A determinação do teor de selênio contido na biomassa celular foi realizada através da espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidreto. Para a determinação da quantidade de Se que estava na forma inorgânica, isto é, Se^{4+} e Se^{6+} , fez-se uma oxidação destrutiva da biomassa com HNO_3 e seguida de uma redução por HCl. Foi possível determinar o teor de selênio orgânico, Se^{-2} , por diferença, após oxidação destrutiva da biomassa por $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ 30% (para destruição de compostos orgânicos) e em seguida uma redução por HCl. O melhor resultado foi obtido com um meio de cultura contendo 25 mg/l de selenito de sódio e relação C:N igual a 100:1, resultando na produção de uma biomassa contendo 360,62 ppm de selênio orgânico. O resultado da superfície de resposta do delineamento para a variável dependente selênio total incorporado na biomassa, forneceu um modelo linear como uma relação diretamente proporcional à quantidade de selenito de sódio adicionado no meio de crescimento.

Palavras-chave: Levedura, selenito de sódio, selênio, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentação.

ABSTRACT

The development of a bioprocess for the production of yeast biomass (*Saccharomyces cerevisiae*), which has a high intracellular, organically bound, assimilable selenium content, was proposed. The experiments were performed in 250 ml erlenmeyer flasks, cultivated at 30 °C in incubators ("shakers") with 120 rpm agitation. Two fractional factorial designs at 3 levels (3^{3-1} designs) with three center points for optimization of the growth medium had been applied, having as dependent variable the biomass production. After the nutrients for the growth medium were defined, a growth kinetic was carried out to determine the exponential growth phase. After that, a complete factorial design at 3 levels (3^{2-0} designs) was conducted in order to evaluate the influence of the sodium selenite concentration (10, 25 and 40 mg/l) and C:N relation (20:1, 60:1 and 100:1) in relation to the dependent variables intracellular organic selenium and incorporated total organic selenium in the yeast biomass. The determination of selenium content in the cellular biomass was accomplished through the utilization of an Atomic absorption spectrometry system with hydride-generation. For the determination of the amount of Se that was in the inorganic form, that is, Se^{4+} and Se^{6+} , it was done a destructive oxidation of the biomass with HNO_3 followed by a reduction with HCl. The content of the organic selenium, Se^{-2} , was determined by difference, after destructive oxidation of the biomass with $\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$ 30% (for destruction of organic compounds) followed by a reduction with HCl. The best result was obtained with a culture medium containing 25 mg/l of sodium selenite and C:N ratio of 100:1, resulting in the production of biomass with 360,62 ppm of organic selenium. The response surface model, obtained from the design for the total incorporated selenium in the biomass, showed a linear response with a proportional direct relation to the amount of sodium selenite added to the growth medium.

Keywords: Yeast, sodium selenite, selenium, *Saccharomyces cerevisiae*, fermentation.

1 INTRODUÇÃO

Muitos processos têm sido estudados visando à produção de biomassa microbiana de alto valor protéico a partir de uma fonte de carbono orgânica e nitrogênio inorgânico. Essa biomassa pode ser usada em gêneros alimentícios humanos ou ração animal para substituir fontes tradicionais de plantas e animais (REHM et al., 1995).

Dentre esses microorganismos destacam-se as leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, que é usada tradicionalmente na fabricação de pão e bebida há milhares de anos. O uso de biomassa de levedura, devido ao seu valor nutricional, foi iniciado pelos alemães no fim da Primeira Guerra Mundial (REHM et al., 1995).

A biomassa de levedura tem sido utilizada também como fonte de micronutrientes, em especial de selênio. Suplementação de selênio orgânico tem se tornado popular, sobretudo nos últimos anos. Em comparação com as plantas, como fontes de selênio, a biomassa de levedura apresenta maior teor de proteína, conseqüentemente, mais selênio pode ser incorporado, devido à substituição do enxofre participante na formação da proteína (DE LEON et al., 2002).

O selênio orgânico é um microelemento essencial para animais e humanos. O papel essencial do selênio como um nutriente é devido à sua associação com o sítio ativo da enzima glutathiona peroxidase. Esta enzima e a vitamina E são co-participantes em um processo natural de detoxificação celular. A vitamina E atua como uma armadilha de radicais livres e previne a formação de hidroperóxidos de lipídios nas membranas celulares. O selênio na forma de glutathiona peroxidase, reage com os hidroperóxidos de lipídios tóxicos formados devido aos radicais livres que escapam da armadilha da vitamina E, e produzem álcoois de lipídios não tóxicos (VINSON, 1998).

Enfermidades associadas com deficiência em Se têm sido um sério problema em animais de criação em muitas partes do mundo. O elemento é necessário para o crescimento e fertilidade dos animais e para a prevenção de várias condições mórbidas características, algumas das quais respondem também, em certa medida, à terapia com a vitamina E, quais sejam: necrose hepática dos ratos e suínos, fibrose pancreática das aves, hepatose dietética e microangiopatia

dos suínos, e distrofia muscular (doença do músculo branco) em cordeiros, bezerros, potros e outras espécies de animais (TINGGI, 2003).

A Administração de Substâncias Medicinais e Alimentos dos Estados Unidos (FDA) aprovou o selenito de sódio e selenato de sódio para suplementação em 0,3 ppm de Se em alimentação animal. Entretanto, foi descoberto que selênio inorgânico pode não ser tão biodisponível quanto o selênio orgânico e, além disso, a retenção de selênio orgânico é maior que a do selênio inorgânico (DEMIRCI et al., 1999).

Para a produção de biomassa de levedura comestível, contendo selênio, apropriada para consumo animal, desenvolveu-se um processo visando à produção de biomassa de levedura rica em selênio intracelular, na forma de selênio orgânico.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SELÊNIO

O Se foi descoberto em 1817 pelo químico sueco Jons Jacob Berzelius, quando este analisava um depósito vermelho na parede de câmaras de chumbo, usadas na produção de ácido sulfúrico. Berzelius deu-lhe um nome derivado do grego $\sigma\epsilon\lambda\eta\eta\eta$ (selene), a lua, devido a sua semelhança com o telúrio, descoberto poucos anos antes, e cujo nome deriva da palavra terra (MELLOR, 1955). O Se é classificado como um metalóide que se situa entre o enxofre e o telúrio no grupo VI A e entre o arsênio e bromo no 4º Período da tabela periódica (TINGGI, 2003).

O Se assemelha-se muito ao enxofre nas propriedades químicas com respeito ao tamanho atômico, energia de ligação, potencial de ionização e afinidade eletrônica (Tabela 1). A principal diferença entre estes dois elementos é que o Se existe na forma tetravalente reduzida, enquanto que o enxofre ocorre na forma tetravalente oxidada (TINGGI, 2003).

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICAS DO ENXOFRE E SELÊNIO

| Elemento | Raio covalente (Å) | Raio iônico M^{2-} (Å) | 1ª energia de ionização ($KJmol^{-1}$) | Eletronegatividade de Pauling | P.F. (°C) | P.E. (°C) |
|----------|--------------------|--------------------------|--|-------------------------------|-----------|-----------|
| S | 1,04 | 1,84 | 999 | 2,5 | 114 | 445 |
| Se | 1,14 | 1,98 | 941 | 2,4 | 121 | 685 |

Os valores para os raios covalentes se referem à coordenação dois.

FONTE: LEE, 1999.

Enquanto que o oxigênio e o enxofre possuem somente elétrons s e p, o selênio segue logo após a primeira série de transição e também possui elétrons d. O preenchimento do nível 3d influencia as propriedades do Se. Os átomos são maiores e os elétrons estão mais firmemente ligados ao núcleo. Por isso o Se é oxidado com maior dificuldade ao estado de oxidação mais elevado (+VI) em contraste com o enxofre. O HNO_3 consegue oxidar o Se até o estado +IV, formando o H_2SeO_3 (LEE, 1999). Na Tabela 2 pode ser vista a configuração eletrônica e os estados de oxidação do selênio e enxofre, como também a abundância dos elementos na crosta terrestre em peso, e a posição que os elementos ocupam em ordem de abundância.

O Se é moderadamente reativo e queima ao ar formando dióxidos. Ele se combina diretamente com a maioria dos elementos, tanto metais como não-metais, embora com menor facilidade que o oxigênio. Como esperado no caso de elementos não-metálicos, o Se não é atacado por ácidos, exceto por aqueles que são também agentes oxidantes (LEE, 1999).

TABELA 2 - CONFIGURAÇÃO ELETRÔNICA, ESTADOS DE OXIDAÇÃO E A ABUNDÂNCIA DO S E Se NA CROSTA TERRESTRE, EM PESO

| Elemento | Configuração eletrônica | Estados de oxidação* | ppm | Abundância relativa |
|----------|-------------------------|-----------------------|------|---------------------|
| S | $3s^2 3p^4$ | -II (II) IV VI | 340 | 16 ^º |
| Se | $3d^{10} 4s^2 4p^4$ | -II (II) IV VI | 0,05 | 68 ^º |

* Os estados de oxidação mais importante (geralmente os mais abundantes e estáveis) são mostrados em negrito. Outros estados bem caracterizados, mas menos importantes são mostrados em tipos normais. Estados de oxidação instáveis, ou de existência duvidosa, são mostrados entre parênteses.

FONTE: LEE, 1999.

O selênio forma dois oxiácidos: o ácido selenioso, H_2SeO_3 , e o ácido selênico, H_2SeO_4 . Quando o ácido selenioso é refluxado com H_2O_2 , ele é convertido em ácido selênico. O H_2SeO_4 é tão forte quanto o H_2SO_4 , e os selenatos são isomorfos como os sulfatos. Tanto o H_2SeO_3 como o H_2SeO_4 são agentes oxidantes moderadamente fortes (LEE, 1999).

2.1.1 Distribuição Geográfica do Selênio

O selênio ocupa o 68^º lugar em abundância na natureza, dentre os 98 elementos na crosta terrestre (Tabela 2). O Se está presente em todos os compartimentos do meio ambiente e ele ocorre principalmente sob estados de oxidação: (-II), (0), (IV) e (VI) (GILON et al., 1996).

No processo evolutivo da Terra, incorporou-se ao solo vindo dos magmas e gases vulcânicos, porém, após o degelo da Era Glacial, este semimetal e o iodo foram carregados de algumas áreas do globo terrestre. Portanto, a distribuição do selênio na natureza é heterogênea, de acordo com o registro de vários autores. O selênio aparece em todos os solos, em pequenas ou grandes concentrações, que variam de menos de $0,1\mu g/g$ em algumas áreas até $1 mg/g$ em outras. Com exceção de solos muito pobres em selênio e os seleníferos, em geral os solos contêm entre

1,0 e 1,5 $\mu\text{g/g}$ deste nutriente. Solos com menos de 0,05 $\mu\text{g/g}$ de selênio propiciam dietas com concentrações menores que 0,1 $\mu\text{g/g}$, e em geral provocam deficiência neste elemento. Por outro lado, solos com mais de 5 $\mu\text{g/g}$ de selênio contribuem com dietas que promovem a intoxicação por este elemento. A concentração de selênio encontrada nos solos é dependente de fatores geoquímicos, especialmente o pH e a natureza da rocha originária dos solos (Figura 1) (COZZOLINO, 2005).

FIGURA 1 - INFLUÊNCIA DOS FATORES GEOQUÍMICOS SOBRE A CONCENTRAÇÃO DE SE NOS SOLOS E NOS ALIMENTOS

Enquanto rochas ricas em granito e basalto são pobres em selênio, rochas vulcânicas incandescentes, calcárias, de carvão e de pirita são ricas neste

semimetal. Presume-se que cerca de 45 a 77% do selênio existente na superfície da terra provêm dos oceanos e deposita-se na terra por via úmida ou seca, através dos gases dimetilseleneto e dimetilselenilsulfito produzidos sazonalmente por alguns fitoplânctons, em especial os das bactérias *Coccolithophorid*; por isso áreas próximas de oceanos possuem solos com maior concentração de selênio. Além da quantidade deste, é importante também considerar as características físico-químicas do solo que influenciam na biodisponibilidade do selênio para plantas e animais. Em geral nos solos ácidos, o selênio está como selênio elementar (0), seleneto (-2), e selenito (+4), que são menos solúveis e assimiláveis; ao passo que terras alcalinas têm mais selenato (+6), mais solúvel e assimilável pelas plantas (COZZOLINO, 2005).

Em torno do mundo, existem as regiões que são tão pobres de Se, que as síndromes de deficiência são endêmicas, estas regiões incluem: as regiões áridas da Austrália, nordeste da China, norte da Coreia do Norte, centro sul da China, Nepal e Tibete. A África central, particularmente a república democrática do Congo, tem sobreposição de deficiências similares, pois a sua dieta é derivada quase que inteiramente dos alimentos locais, com pouca ou nenhuma importação de alimentos de outras áreas (TAPIERO et al., 2003).

2.1.2 Fontes de Selênio

O homem obtém selênio por meio de alimentos, suplementos, água e ar. Porém, a principal fonte é a alimentação. A quantidade de selênio contida em alimentos, água e ar refletem a concentração de selênio no solo, portanto pode ser muito heterogênea em um mesmo tipo de alimento se este for proveniente de áreas diferentes (COZZOLINO, 2005). Em algumas regiões da China foi mostrado que o consumo de Se por pessoas que vivem em áreas de solo pobre em Se é significativamente menor que o daquelas que vivem em áreas de solo rico em selênio. Consumos elevados de Se foram reportados na Venezuela e Dakota do Sul, EUA, os quais refletem os altos níveis de Se no solos e produtos agrícolas das regiões (TINGGI, 2003). Além da distribuição geográfica do selênio no solo e, em consequência, no alimento, a quantidade normalmente ingerida por um indivíduo

ainda dependerá dos hábitos alimentares e da associação entre o fator econômico e a concentração de selênio na dieta (Tabela 3) (COZZOLINO, 2005).

O selênio entra geralmente na cadeia alimentar através das plantas que o absorvem, na forma de selenito e selenato inorgânico. O selênio entra na planta sendo assimilado pela via do enxofre (S). O enxofre, que é comum em solos, é absorvido nas plantas e incorporado nos aminoácidos L-metionina, L-cisteína, e L-cistina. Estes aminoácidos são então, utilizados pelas plantas como componentes normais de proteínas. Nos *alliums* e *brassicas*, estes aminoácidos contendo enxofre são convertidos também em fitoquímicos altamente ativos. Quando quantidades adequadas de selênio estão disponíveis no solo, especialmente em solos alcalinos, o selênio é então consumido e incorporado principalmente em selenometionina (Se-Met), selenocistationa, Se-metilselenocisteína, e pequenas quantidades de selenocisteína (IRION, 1998). A Se-Met pode ser considerada mais que 50% do total de selênio contido nas plantas, enquanto a selenocistina (Se-Cis), metil-Se-Cis e γ -glutamil-Se-metil-cis não são significativamente incorporadas nas proteínas das plantas, e estão presentes em níveis relativamente baixos, independente do conteúdo de selênio no solo (TAPIERO et al., 2003).

Para a maioria das plantas, o selênio pode verdadeiramente ser tóxico, visto que plantas não acumuladoras de selênio tendem a incorporar aminoácidos contendo selênio em suas proteínas. Estas proteínas contêm diferentes formas geométricas em relação aos formatos das proteínas normais, que tipicamente contêm aminoácidos de enxofre. Plantas seleníferas tais como as *alliums* e *brassicas* mostram poucos sinais de toxicidade de selênio, visto que elas convertem poucos aminoácidos de selênio em proteína. Ao invés disso, esses aminoácidos permanecem no citoplasma onde eles podem ser utilizados na produção de vários fitoquímicos (IRION, 1998).

2.1.2.1 Selênio nos alimentos e nas dietas

A Tabela 3 apresenta o teor de selênio em um grupo de alimentos que compõe a cesta básica da população brasileira. A inclusão da castanha-do-pará nessa tabela deveu-se ao fato deste alimento ser o mais rico em selênio (COZZOLINO, 2005).

TABELA 3 - QUANTIDADE DE SELÊNIO NOS ALIMENTOS MAIS CONSUMIDOS PELOS BRASILEIROS (EXCETO CASTANHA-DO-PARÁ)

| Alimentos | Se ($\mu\text{g/g}$) | Alimentos | Se ($\mu\text{g/g}$) |
|----------------------------|------------------------|----------------------|------------------------|
| Abóbora | n* | Frango cozido s/pele | 0,07 |
| Açúcar | tr* | Fubá | n* |
| Alface | 0,01 | Laranja | 0,01 |
| Alho | 0,02 | Leite integral | 0,01 |
| Arroz | 0,04 | Leite em pó | 0,03 |
| Banana | 0,01 | Lingüiça | 0,07 |
| Batata | 0,01 | Macarrão | 0,01 |
| Bolacha doce | 0,04 | Margarina | tr** |
| Café | tr** | Massa de tomate | tr** |
| Carne bovina de primeira | 0,02 | Óleo | tr** |
| Carne bovina s/osso cozida | 0,03 | Ovo (clara) | 0,06 |
| Carne suína cozida | n* | Ovo (gema) | 0,20 |
| Castanha-do-pará | 40 | Pão de forma | 0,25 |
| Cebola | 0,01 | Pão francês | 0,25 |
| Cenoura | 0,01 | Queijo | 0,06 |
| Farinha de mandioca | n* | Repolho | 0,02 |
| Farinha de trigo | 0,42 | Sal | n** |
| Feijão | 0,03 | Tomate | tr** |

* n – não analisado ** tr – traços
 FONTE: COZZOLINO, 2005.

A Tabela 4 mostra o teor de Se em espécies marinhas do litoral brasileiro.

TABELA 4 - QUANTIDADE DE SELÊNIO EM ALGUNS ALIMENTOS DE ORIGEM MARINHA COMERCIALIZADOS NO BRASIL

| Alimento | Se ($\mu\text{g/g}$) |
|-------------------|------------------------|
| Truta (crua) | 1,2425 |
| Sashimi de atum | 0,8000 |
| Sashimi de salmão | 0,4500 |
| Salmão defumado | 0,5410 |
| Polvo (cru) | 0,7500 |
| Ostra (cozida) | 0,7160 |
| Ostra (crua) | 0,6370 |
| Lagosta | 0,7900 |
| Caviar | 1,4000 |
| Bacalhau seco | 1,3100 |
| Atum cru | 0,8000 |

FONTE: PHILIPPI, 2002.

Em um estudo que comparou as concentrações de selênio de uma dieta em Manaus, Mato Grosso e Santa Catarina, encontrou-se neste último estado, em dietas de um grupo de menor poder aquisitivo, ingestão média de 52 $\mu\text{g/dia}$ de selênio, ao passo que no grupo de maior poder aquisitivo a ingestão média deste mineral foi de 139 $\mu\text{g/dia}$. Poucos dados foram publicados sobre ingestão de selênio

nos diversos estados brasileiros, os existentes foram listados na Tabela 5 (COZZOLINO, 2005).

TABELA 5 - CONCENTRAÇÃO MÉDIA DE SELÊNIO NA DIETA DE DIFERENTES ESTADOS BRASILEIROS

| Estado | Concentração média de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) |
|-------------------------|---|
| Manaus | 94,5 |
| Mato Grosso | 19 |
| *Santa Catarina, I e II | 52 a 139 |
| São Paulo | 18 |

* I e II – grupo de menor e maior poder aquisitivo.

FONTE: (COZZOLINO, 2005)

Em um projeto de 1985 até 1991 da FAO, aos cuidados da Agência Internacional de Energia Atômica (IAEA), foi proposto um levantamento de dados sobre o consumo de nutrientes nos diversos países, para a obtenção de informações comparativas sobre a média de ingestão dos mais importantes elementos-traço para a nutrição humana. Nesse levantamento incluiu-se o selênio. Foram coletados dados referentes a diferentes países: Austrália, Brasil, Canadá, Irã, China, Itália, Japão, Holanda, Noruega, Portugal, Espanha, Sudão, Suécia, Suíça, Tailândia, Turquia e Estados Unidos. Todos estes países foram estudados e 13 resultaram em valores publicados sobre a ingestão diária de selênio, conforme mostra a Tabela 6 (COZZOLINO, 2005).

TABELA 6 - CONCENTRAÇÃO DE SELÊNIO NA DIETA DE DIFERENTES PAÍSES DE ACORDO COM ESTUDOS DA FAO E DA IAEA

| País | Concentração de Se ($\mu\text{g}/\text{dia}$) |
|----------------|---|
| Brasil | 60 |
| Finlândia | 113 |
| Holanda | 67 |
| Irã | 60 |
| Itália | 49 |
| Japão | 133 |
| Espanha | 60 |
| Sudão | 112 |
| Suécia | 38 |
| Suíça | 70 |
| Tailândia | 49 |
| Turquia | 32 |
| Estados Unidos | 98 |

FONTE: (COZZOLINO, 2005)

2.1.3 Recomendações de Selênio

A Tabela 7 e 8 juntas, trazem as recomendações de selênio para todos os estágios da vida. A necessidade de selênio para crianças de 0 a 12 meses de idade é baseada na ingestão adequada ou AI (*Adequate Intake*), que reflete a média da ingestão desse nutriente observada durante o aleitamento materno exclusivo. Para todos os demais estágios da vida, a necessidade de selênio é baseada na necessidade média estimada (*estimated average requirement* – EAR) e a RDA; esta última definida como a EAR mais dois desvios-padrão. A partir dessas informações foi estabelecido as DRIs (*dietary reference intakes*) de selênio. O critério que fundamenta o estabelecimento para EAR é a saturação esperada para a atividade da enzima glutathione peroxidase. E, em segundo plano, a recomendação para evitar deficiência em selênio e prevenir a doença de Keshan (COZZOLINO, 2005).

TABELA 7 - AI DE Se PARA CRIANÇAS DE 0 A 1 ANO DE IDADE

| Idade (meses) | AI Se $\mu\text{g}/\text{dia}$ |
|------------------|-----------------------------------|
| 0 – 6 meses | 15 |
| 7 – 12 meses | 20 |

FONTE: IOM, 2001, citado por COZZOLINO, 2005.

TABELA 8 - EAR E RDA DE SELÊNIO PARA OS ESTÁGIOS DA VIDA

| Idade (anos) | EAR Se $\mu\text{g}/\text{dia}$ | RDA Se $\mu\text{g}/\text{dia}$ |
|-----------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 – 3 | 17 | 20 |
| 4 – 8 | 23 | 30 |
| 9 – 13 | 35 | 40 |
| > 14 | 45 | 55 |
| Gestantes | | |
| 14 – 50 | 49 | 60 |
| Lactantes | | |
| 14 – 50 | 59 | 70 |

FONTE: IOM, 2001, citado por COZZOLINO, 2005.

O Conselho de Pesquisa Nacional Americano estabeleceu uma recomendação nutricional (RDA) de Se para humanos, 55 e 70 $\mu\text{g}/\text{dia}$ para homem e mulher, respectivamente (CARVALHO et al., 2003).

2.1.4 Limite Superior Tolerável de Ingestão Relativo ao Selênio

O limite superior tolerável de ingestão (*tolerable upper intake level* – UL) é definido como o valor mais alto de ingestão diária continuada de um nutriente que aparentemente não oferece nenhum efeito adverso à saúde, em quase todos os indivíduos de um estágio de vida ou gênero. O UL não deve ser entendido como recomendação, mas sim como informação para o risco da ingestão excessiva de nutrientes oriunda de suplementação, fortificação de alimentos e outros. As informações para o selênio sobre os valores do UL nos vários estágios de vida e gênero estão citados na Tabela 9. A avaliação da dose-resposta que definiu o UL baseou-se em conceitos da toxicologia referentes aos NOAEL (*no observed adverse effect level*), LOAEL (*lowest observed effect level*) e UF (*uncertainty factor*). Quando o UF é igual a 1, significa que o UL é igual ao NOAEL, afirmação que advém da equação $UL = NOAEL/UF$ (COZZOLINO, 2005).

TABELA 9 - DRI'S RELATIVAS AO SELÊNIO A PARTIR DE 1 ANO DE IDADE

| Idade (anos) | EAR Se µg/dia | RDA Se µg/dia | UL Se µg/dia | NOAEL Se µg/dia | LOAEL Se µg/dia |
|-----------------|------------------|------------------|-----------------|--------------------|--------------------|
| 1 – 3 | 17 | 20 | 90 | 90 | – |
| 4 – 8 | 23 | 30 | 150 | 150 | – |
| 9 – 13 | 35 | 40 | 280 | 280 | – |
| > 14 | 45 | 55 | 400 | 800 | 900 |

FONTE: COZZOLINO, 2005.

2.1.5 A Essencialidade do Selênio

O selênio é essencial e pode ser tóxico, dependendo de sua forma química e concentração, e tem a banda de tolerância mais estreita de todos os elementos (CHASSAIGNE et al., 2002).

Desde que o Se foi descoberto em 1957 como um elemento traço essencial na prevenção de necrose do fígado em animais deficientes de vitamina E, o interesse na pesquisa do Se tem aumentado consideravelmente, principalmente na indústria pecuária. Em 1973 o Se foi identificado como sendo um importante componente da glutathiona peroxidase (GSHPx), a qual é caracterizada como uma proteína tetramérica com quatro átomos de Se por molécula. Esta GSHPx ajuda no

mecanismo de defesa intracelular contra danos oxidativos ao evitar a produção de espécies de oxigênio ativo. Nos anos 80 descobriram-se outras selenoproteínas que indicaram que o Se não é meramente restrito ao seu papel na atividade antioxidante, mas ele está também envolvido em outros múltiplos aspectos no metabolismo dos mamíferos. Mais recentemente, o Se mostrou ser um importante componente da iodotironina desiodinase, uma enzima que é uma selenoproteína, e igualmente como uma selenoproteína funcional em tioredoxina redutase (TINGGI, 2003). As desiodinases tipo, I, II e III são selenoproteínas envolvidas no crescimento e no desenvolvimento humano. A deficiência em selênio causa um decréscimo de 15 a 20% em T_3 e T_4 . A tipo 1-iodotironina 5-desiodinase (IDI) é uma selenoproteína encontrada principalmente no fígado e nos rins, responsável pela conversão da forma inativa do pró-hormônio tiroxina (T_4) que é secretado pela tireóide, na forma metabolicamente ativa 3,3-5 triiodotironina (T_3). Nos casos de deficiência em Se, o T_4 está aumentado no plasma, enquanto o T_3 está reduzido (COZZOLINO, 2005). Outras funções atribuídas ao selênio são: proteção contra ação nociva de metais pesados e xenobióticos (COZZOLINO, 2005), prevenção de doenças crônicas não-transmissíveis, como o câncer, e aumento da resistência no sistema imunológico (TAPIERO, 2003).

2.1.6 Aspectos Fisiológicos Relativo ao Selênio

2.1.6.1 Absorção

Compostos de selênio são geralmente muito bem absorvidos pelo ser humano, todavia essa absorção não parece estar sob controle homeostático. A absorção de Se na forma inorgânica de selenato é maior que 90% e depende de um gradiente de Na^+K^+ e ATPase. É comumente absorvido junto com sulfato, entretanto, uma significativa fração do selenato é perdida na urina antes de ser incorporada nos tecidos. Na forma inorgânica de selenito sua absorção é maior que 80%, o selenito é absorvido principalmente no duodeno por difusão simples e, uma vez absorvido, é mais bem retido pelo organismo que o selenato. A forma orgânica, Se-Met, é absorvida em torno de 95-98% no intestino delgado mediada por um transporte duplo ativo de sódio e aminoácidos neutros. Pouco se sabe acerca da absorção da

Se-Cis, mas há evidências de que é bem absorvida por um transporte ativo com aminoácidos básicos. Os nutrientes que facilitam a absorção de selênio são: presença de metionina/proteína, vitamina E, A, e C em altas doses e também outros antioxidantes. Já os fatores que inibem sua absorção são: altas doses de enxofre e metais pesados (COZZOLINO, 2005).

2.1.6.2 Armazenamento

O armazenamento de Se no corpo humano é feito em dois compartimentos. O primeiro é o Se estocado na forma de Se-Met sobretudo em músculos, eritrócitos, pâncreas, fígado, rins, estômago, cérebro, pele e mucosa gastrintestinal. Essa reserva depende da ingestão de Se na forma de Se-Met, e ela está disponível para ser metabolizada primeiro de acordo com o *turnover* protéico da metionina e independe da necessidade do organismo para o selênio. O segundo é o estoque de selênio no fígado, na forma de glutathiona peroxidase (GSHPx). Quando a dieta torna-se deficiente em Se e limita a síntese de outras selenoproteínas, esse compartimento fica sob regulação, reduzindo a concentração de mRNA e, conseqüentemente, a síntese da glutathiona peroxidase (COZZOLINO, 2005).

2.1.6.3 Metabolismo

Os animais superiores são incapazes de sintetizar Se-Met e somente a Se-Cis foi detectado em ratos suplementados com o Se na forma de selenito. (TAPIERO et al., 2003). Somente a Se-Met pode ser incorporada às proteínas corporais, pois segue a rota metabólica das proteínas até ser catabolizada pela transulfuração. Entretanto, essa rota metabólica depende do estado nutricional relativo à metionina e à vitamina B₆ para ativar enzimas que desdobrarão a Se-Met em outros compostos orgânicos biologicamente ativos. Isso sugere que a Se-Met não é a melhor forma para a suplementação de selênio, uma vez que sua conversão em formas biologicamente ativas será prejudicada toda vez que a dieta for inadequada em metionina, por aumento de síntese ou catabolismo protéico, como ocorre nos indivíduos queimados, em que o selênio que estava ligado à metionina continua armazenado no músculo, associado a outras proteínas e indispensável para formas

biologicamente ativas do selênio. A ingestão dos compostos selenito, selenato e Se-Cis seguem outra via, sendo aparentemente catabolizados até a forma de seleneto. Este, por sua vez, pode ser novamente metabolizado para selenofosfato, que é o precursor de Se-Cis e de outras selenoproteínas (COZZOLINO, 2005).

As vias do metabolismo do Se em animais são apresentadas na Figura 2 (TINGGI, 2003).

FIGURA 2 - METABOLISMO DO SELÊNIO EM ANIMAIS

FONTE: TINGGI, 2003.

2.1.6.4 Excreção

O mecanismo de excreção do selênio ainda não foi completamente elucidado. O que se sabe até hoje é que os metabólitos excretados são uma forma do organismo manter a homeostase do selênio corporal. Alguns estudos demonstraram que a urina é a principal via de excreção dele, nas formas trimetilselenônio, selenito e selenato. Pela respiração são eliminadas formas voláteis, como monometil e dimetilseleneto. O Se armazenado em cabelos e unhas também é perdido pelo organismo humano. Lactantes também perdem selênio pelo leite materno. Finalmente, pelas fezes, é excretado o seleneto, a forma inerte de selênio, que será convertida em selenito pelas bactérias do solo, para reintegrar-se novamente à cadeia alimentar (COZZOLINO, 2005).

2.1.6.5 Biodisponibilidade

A biodisponibilidade é definida como a proporção de um nutriente ingerido que é utilizado para funções fisiológicas normais ou para armazenagem (TAPIERO et al., 2003). Os fatores que influenciam na biodisponibilidade do selênio são: quantidade de selênio consumida; origem alimentar do selênio consumido; interação de outros componentes da dieta e de metais pesados com o selênio; eficiência da digestão; formação de compostos absorvíveis de selênio; tempo de trânsito intestinal; ingestão prévia de outros nutrientes; estado nutricional do organismo em relação ao selênio; e doenças do trato gastrintestinal. A etapa limitante na determinação da biodisponibilidade do Se alimentar não parece ser a absorção, mas, sim, a conversão para a forma biologicamente ativa (sua incorporação à glutathione peroxidase ou à 5-desiodinase) nos tecidos (COZZOLINO, 2005). Complexos de selênio orgânico e aminoácidos contendo selênio são considerados os mais biodisponíveis (SUHAJDA, 2000).

2.1.7 Toxicidade do Selênio

O envenenamento por selênio pode ser agudo ou crônico. O agudo acontece por ingestão acidental ou por tentativa de suicídio com altas doses acima de 1 g de selênio, ou 22 mg/kg de peso corporal, associado a seus compostos químicos. Sintomas de intoxicação aguda são: graves distúrbios gastrintestinais, gosto metálico na boca, odor de alho exalado pelas vias respiratórias devido ao dimetilseleneto, distúrbios neurológicos, síndrome de estresse respiratório, enfarto do miocárdio, e falência renal. Algumas necrópsias também revelaram edema pulmonar grave, necrose do trato gastrointestinal e dos rins, bem como cardiomiopatia. A intoxicação crônica por Se em indivíduos adultos acontece com ingestão maior que 800 µg/dia. Até o momento não há nenhum marcador sensível e específico para indicar superexposição ao selênio (COZZOLINO, 2005). Os fatores que influenciam na gravidade e no tempo de aparecimento dos sinais clínicos à intoxicação por selênio são: forma química e quantidade do elemento consumido, gênero, idade, estado de nutrição e saúde do indivíduo, recidivas de alta ingestão de selênio e a rota de administração (TINGGI, 2003).

2.1.8 Patologias Associadas com a Deficiência de Se

A deficiência em Se afeta o metabolismo da glutathione (GSH) pelo aumento de sua síntese e liberação no fígado, com concomitante aumento de GSH plasmática, o qual pode conduzir a um esgotamento de cisteína e danificar as sínteses de proteínas. A deficiência em Se é acompanhada também por uma diminuição na atividade da glutathione peroxidase e resulta em um aumento na atividade hepática da glutathione-S-transferase (GST). A deficiência de Se pode contribuir para desenvolvimento de enfermidade cardiovascular. A deficiência do Se pode também ter um papel na disfunção imunológica, e foi associada com a defesa debilitada contra infecção por enterovirus. A deficiência do Se é associada também, com uma diminuição de algumas das isoenzimas do citocromo, P-450. A deficiência de Se afeta a habilidade de um indivíduo de metabolizar drogas, e pode ser associada com a toxicidade aumentada de algumas drogas e à eficiência diminuída de outras (TAPIERO et al., 2003).

2.1.8.1 Doenças de Keshan e de Kashin-Beck

A doença de Keshan ocorre nas áreas onde as concentrações de iodo e de Se no solo, nas fontes de alimentos e no plasma humano são todas baixas. O consumo médio de Se, em áreas endêmicas da doença de Keshan, foi estimado em 10 µg/d. A doença é uma cardiomiopatia endêmica que aparece em bebês do sexo feminino, e nas crianças de idade pré-escolar. A doença de Keshan ocorre com sintomas de deficiência cardíaca congestiva ou menos frequentemente, com a morte repentina ou ataque de trombose cardíaca difusa. Um vírus Coxsackie miocardite foi associado com a patogênese doença de Keshan (TAPIERO et al., 2003).

A doença de Kashin-Beck é uma osteoartropatia endêmica e limitada a áreas de deficiência combinada dos minerais iodo e Se. Pacientes afetados têm muito menos soro tiroxina e triiodotironina. Taxas elevadas de tirotropina (TSH) e menor iodo na urina são prognosticadores de ocorrência da doença. A doença é caracterizada por alargamento de ossos e deformidade de juntas, aparecendo durante a infância ou a puberdade, e progredindo até cessar o crescimento.

Epidemiologicamente, a doença de Kashin-Beck tem características similares às da de Keshan, mas sua distribuição é menos estável (TAPIERO et al., 2003).

2.1.8.2 Patologias em animais associadas com a deficiência do Se

Enfermidades associadas com deficiência de Se tem sido um sério problema na criação de animais em muitas partes do mundo. Por exemplo, hepatose dietética, uma necrose do fígado, pode causar a morte de porcos em poucas horas, após os sintomas aparecerem, e a diátese exudativa pode causar a morte de aves dentro de uns poucos dias como resultado de edema do tecido corpóreo. A mais comum enfermidade de deficiência de Se é a enfermidade do músculo branco, que é uma distrofia muscular nutricional. Uma incidência alta da enfermidade do músculo branco em ovelhas e bovinos foi reportado na Nova Zelândia e oeste de Oregon, USA. Esta desordem ocorre particularmente na fase de crescimento do animal afetando principalmente cordeiros de um a três meses de idade. Os cordeiros tornam-se fracos e com dificuldade para se alimentar, e se ocorrer implicação cardíaca, freqüentemente o resultado é a morte apressada (TINGGI, 2003). Dentre as alterações produzidas pela deficiência dietética de selênio, incluem-se aquelas que afetam a esfera reprodutiva. Em aves os efeitos principais são sobre a postura e eclodibilidade dos ovos (SECHINATO, 2003).

2.2 FERMENTAÇÃO

Segundo Ferreira e Sousa (1998), durante centenas de anos, alimentos fermentados foram produzidos por microorganismos desconhecidos. Só no século passado é que os princípios da microbiologia começaram a ser desvendados, permitindo o isolamento e a cultura individual das espécies. Essas primeiras aplicações de microorganismos selecionados deram origem à biotecnologia das fermentações, possibilitando o desenvolvimento de processos de produção em escala comercial.

O meio de fermentação é preparado convenientemente para fornecer ao microorganismo utilizado no processo fermentativo, os nutrientes de que necessita no seu metabolismo. Normalmente o meio deve ser esterilizado com o objetivo de

eliminar organismos contaminantes indesejáveis. No fermentador, o meio recebe o inóculo, ou seja, a suspensão do microorganismo desejado, ou de seus esporos, capazes de garantir a fermentação do meio com eficiência. O processo fermentativo é então controlado com base nos vários parâmetros fermentativos, tais como temperatura, pH, agitação, concentração de nutrientes, aeração, de maneira a manter no reator as condições ideais ao trabalho do microorganismo (BORZANI et al., 1988).

Quatro principais classes de compostos produzidos industrialmente por fermentação, a partir de linhagens selecionadas de microorganismos, sob condições otimizadas podem ser diferenciadas: metabólitos primários, metabólitos secundários, enzimas e microorganismos.

2.2.1 Fermentação Submersa

A fermentação submersa é aquela onde o substrato está dissolvido em fase líquida, e o desenvolvimento do microorganismo se dá em presença de água livre. Nesse tipo de fermentação o meio de cultura está qualitativamente e quantitativamente mais equilibrado e homogêneo quando comparado com o substrato de fermentação no estado sólido (WOICIECHOWSKI, 1997).

2.3 LEVEDURAS

As leveduras foram os primeiros microorganismos conhecidos, são os mais estudados e usualmente os microorganismos de maior aceitabilidade pelos consumidores. Constitui na atualidade o grupo de microorganismos mais importante a ser explorado comercialmente e a ser consumido pela Humanidade (FERREIRA, 1995). Segundo RIJ (1984), as leveduras são fungos unicelulares, incluindo Ascomicetos, Basidiomicetos e Deuteromicetos. As chamadas leveduras imperfeitas ou anascosporadas possuem afinidades com ambos os grupos (LACAZ et al., 1998).

As leveduras são raramente tóxicas ou patogênicas e podem ser usadas em dietas humanas. Elas são maiores que as bactérias, facilitando a separação. Elas podem ser usadas em um estado bruto. Entretanto sua taxa de crescimento específico é relativamente baixa (tempo de geração de 2 a 5 horas) (REHM, 1995).

As leveduras são seres heterotróficos, quimiotróficos e organotróficos. São aeróbios e facultativos, raramente anaeróbios, eucarióticos, não sintetizam clorofila, portanto não fazem fotossíntese, não armazenam amido como material de reserva e sim glicogênio e não tem celulose na parede celular; são ubíquos, podendo ser encontrados no ar, solos, água, vegetais e animais (LIMA et al., 2001).

As colônias das leveduras são glabras, sendo suas texturas cremosas, membranosas e úmidas, não formando hifas aéreas, que caracterizam as colônias dos fungos filamentosos, cujas texturas variam de cotonosas, velutinas, feltradas e lanosas (LACAZ et al., 1998).

2.3.1 Estrutura Somática

Segundo Kwon-Chung & Bennett (1992), citado por (LACAZ et al., 1998), as leveduras englobam estruturas somáticas globosas, ovais ou alongadas. Algumas vezes, as gêmulas formam cadeias de células alongadas, denominadas pseudo-hifas, com constrições no local dos septos.

A célula de levedura tem membrana citoplasmática lipoprotéica cuja função principal é regular as trocas com o meio ambiente. Possui uma parede celular rígida que confere resistência às pressões osmóticas e mecânicas. Sua natureza é polissacarídica em maior proporção, contendo também proteínas e lipídeos. No citoplasma encontram-se, além dos componentes usuais em solução, vacúolos, mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomas, material de reserva (gorduras e carboidratos). O núcleo, tipicamente eucariótico, contém nucléolo, vários cromossomas e histonas envolvidas por uma membrana nuclear (LIMA et al., 2001).

2.3.2 Estrutura de Reprodução

As leveduras reproduzem-se por brotamento único, fissão binária ou cissiparidade e por brotamento-fissão. O brotamento pode ser unipolar, bipolar e multilateral (LACAZ et al., 1998). Alguns micologistas restringem o termo levedura a fungos de brotamento unicelular, com a possibilidade de reprodução sexuada, e a palavra leveduriforme, a fungos semelhantes ou afins, que se reproduzem assexuadamente (LACAZ et al., 1998).

2.3.3 Metabolismo das Leveduras

O crescimento das leveduras, como organismos heterotróficos que são, depende de uma variedade de compostos orgânicos e de alguns nutrientes minerais. Estes compostos são degradados por um conjunto de reações bioquímicas que ocorrem no interior da célula – o **metabolismo**. Durante o crescimento, as células utilizam os substratos de forma a satisfazer os seguintes requisitos: síntese do material celular, energia (através do ATP) e poder redutor (na forma de nucleotídeos de piridina – NADH) expresso no potencial de oxidação-redução. O **catabolismo** é o conjunto de reações metabólicas que permite executar os dois últimos requisitos. Ao conjunto de reações metabólicas envolvidas na síntese de material celular dá-se o nome de **anabolismo**. Num meio aeróbio, o poder redutor é convertido em energia adicional através de um processo chamado fosforilação oxidativa (FERREIRA, 1995).

As leveduras são seres aeróbios (utilizam o oxigênio durante o metabolismo como aceitador final de elétrons) e podem ser também anaeróbios facultativos, dado que conseguem crescer na presença ou ausência de ar. Os açúcares normalmente utilizados pelas leveduras como fonte de carbono incluem a sacarose, a glicose e frutose. Há ainda a galactose e a maltose como carboidratos passíveis de serem metabolizados. Industrialmente, a produção de fermento de panificação é efetuada usando melaço como substrato carbonatado. Os melaços incluem normalmente sacarose, glicose e frutose, apresentando uma composição variada conforme a fonte utilizada para a sua obtenção (FERREIRA, 1995).

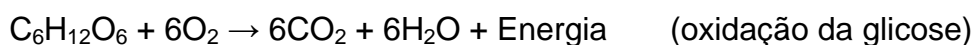
A sacarose é hidrolisada no exterior da célula, em glicose e em frutose, pela enzima invertase presente na parede celular. Estas hexoses são em seguida degradadas no interior da célula (FERREIRA, 1995).

A levedura *S. cerevisiae* cresce em glicose segundo três vias metabólicas, podendo, contudo ocorrer outras vias dependendo das condições do meio de cultura. Na presença de altas concentrações de glicose (ou na ausência de oxigênio) ocorre a chamada fermentação da glicose ou crescimento fermentativo (via redutiva) com produção de etanol e dióxido de carbono. Esta etapa é relativamente pouco eficiente, apresentando um rendimento energético de aproximadamente 2 mols de

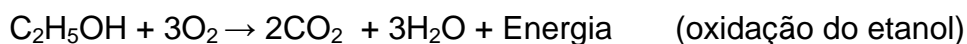
ATP por mol de glicose. A conversão estequiométrica da glicose em etanol é traduzida pela seguinte equação (FERREIRA, 1995):



A oxidação da glicose é a via predominante em culturas aeróbias para concentrações de glicose inferiores a 90 – 100 mg.l⁻¹. É uma via mais eficiente que a anterior, apresentando um rendimento energético de 16 a 28 mols de ATP por mol de glicose oxidada. Esta via oxidativa, também conhecida como crescimento respirativo, apresenta a seguinte estequiometria (FERREIRA, 1995):



O etanol formado pela via fermentativa pode ser consumido por via oxidativa na presença de baixas concentrações de glicose. Esta via apresenta um rendimento energético de 6 a 11 moles de ATP por mol de etanol oxidado e tem a seguinte estequiometria (FERREIRA, 1995):



Para concentrações de glicose superiores ao valor crítico (50 – 100 mg.l⁻¹) as vias respiratória e fermentativa da glicose podem ocorrer em paralelo, falando-se nesse caso de um regime respiro-fermentativo ou óxido-redutivo. Em cultura contínua ou descontínua não é normalmente observado a respiração conjunta de glicose e etanol. Estas etapas respiratórias poderão ocorrer em fermentações semi-contínuas e fala-se neste caso de regime respirativo ou oxidativo. Em reatores em que seja difícil manter condições de homogeneidade poderá acontecer a produção de etanol por algumas células e a utilização deste por outras células, implicando uma correspondente diminuição do rendimento (FERREIRA, 1995).

2.3.4 Parâmetros Físicos e Químicos

2.3.4.1 pH

A faixa de pH para o crescimento de levedura é 2,5 a 7 com crescimento ótimo de 4 a 5 (REHM, 1995).

2.3.4.2 Temperatura

A temperatura afeta a taxa de crescimento, requerimentos nutricionais, composição celular e permeabilidade celular. Ela também afeta a estrutura das proteínas e dos lipídios e os coeficientes das taxas de reações os quais por sua vez dependem das energias de ativação das reações. As leveduras são essencialmente mesofílicas e são psicrófilas facultativas. O crescimento máximo é em torno de 20 a 30 °C (REHM, 1995).

2.3.5 Requerimentos Nutricionais

A composição do meio de cultura desempenha um papel fundamental nos processos de produção de biomassa ou metabólitos. A disponibilidade de substâncias de crescimento é decisiva para o desempenho ótimo. Dois aspectos da composição do meio são examinados:

- 1) o aspecto qualitativo, para identificar as substâncias requeridas para o crescimento;
- 2) o aspecto quantitativo, para estabelecer as concentrações que são suficientes mas não inibitórias para o crescimento ou tipo de metabólito requerido.

As principais substâncias podem ser dispostas em quatro categorias; substrato, macro elementos, elementos-traço e fatores de crescimento (REHM, 1995).

2.3.5.1 Substrato

O carbono forma aproximadamente 50% (m/m) da matéria seca, Tabela 10. O Carbono é geralmente um substrato limitante. Tanto o nitrogênio ou o fósforo pode servir como substrato limitante em alguns casos (REHM, 1995).

TABELA 10 - COMPOSIÇÃO ELEMENTAR DE LEVEDURA SECA

| Elementos | <i>Saccharomyces</i> (mg g ⁻¹) |
|-----------|--|
| C | 470 |
| H | 60 |
| N | 85 |
| O | 325 |
| P | 14,3 |
| K | 17,2 |
| S* | 0,3 - 0,4 |
| Mg | 2,3 |
| Na | 0,7 |
| Fe | 0,1 |
| Zn | 0,0387 |
| Se** | 0,0028 |
| Mn | 0,0057 |
| Ca | 1,3 |
| Co | 0,0002 |
| Cu | 0,033 |

FONTE: REHM, 1995; * PEIXOTO, 1996; **FURCO, 1996.

2.3.5.2 Macroelementos

Estes são N, O, H, C, S, P, K, Ca e Mg. Eles são usados em larga quantidade (g l⁻¹ ou mg l⁻¹) (REHM, 1995).

2.3.5.2.1 Nitrogênio e suas fontes

O nitrogênio é responsável por 8 a 12% do peso seco celular, Tabela 10. Ele pode ser usado em várias formas: orgânica (uréia, peptídeos, aminoácidos, purinas, pirimidinas) e inorgânica (amônia, sais de amônio e nitrato) (REHM, 1995). O nitrato não pode ser utilizado por muitas leveduras. O NH₄⁺ é o íon utilizado mais facilmente entre as formas inorgânicas de nitrogênio, já que seu uso não requer reações de óxido-redução porque o átomo de nitrogênio está no mesmo grau de oxidação (-3)

que no átomo de nitrogênio nas moléculas biológicas (aminoácidos, purinas e pirimidinas) (ESPOSITO, 2004).

Das fontes de N nas formas de aminoácidos, aminas e amidas, somente a alanina, a arginina, a asparagina, o aspartato, o glutamato, a leucina e a valina mostraram-se boas fontes para o crescimento de *Saccharomyces*. Em relação aos peptídeos e proteínas, os pequenos peptídeos podem ser absorvidos pelas células (os hidrolisados enzimáticos de proteínas como a peptona e a caseína hidrolisada são boas fontes de N). Os peptídeos maiores e as proteínas devem ser primeiro hidrolisados extracelularmente por enzimas para que possam ser assimilados (ESPOSITO, 2004).

A uréia é utilizada como fonte de nitrogênio (e C) pelas leveduras. A presença de urease que hidrolisa a uréia em CO₂ e amônio é comum nelas. Em *S.cerevisiae* dependendo de sua concentração no meio, a absorção se produz por transporte ativo (menos que 0,5 mM) ou por difusão facilitada (mais que 0,5 mM). Nessa espécie, a utilização de uréia requer a presença de biotina, dado que uma das enzimas de seu metabolismo, a uréia carboxilase, tem essa vitamina como co-fator (ESPOSITO, 2004).

2.3.5.2.2 Relação C:N

Ainda que o N seja requerido para a síntese de proteínas (16% N), e outros componentes celulares (ácidos nucleicos, quitina, etc.), o C é imprescindível como fonte de energia. Um meio balanceado, portanto, deve conter dez vezes mais C do que N. Uma relação C:N maior ou igual a 10 garantirá um alto conteúdo protéico. Por outro lado, uma relação C:N em excesso (ex: 50:1) favorecerá a acumulação de álcool, metabólitos secundários derivados do AcO⁻, lipídios ou polissacarídeos extracelulares. Portanto, uma relação C:N adequada tem muita importância na tecnologia das fermentações (ESPOSITO, 2004).

2.3.5.2.3 Fósforo

O fósforo representa aproximadamente 1,5% da matéria seca da levedura, Tabela 10. Ele é fornecido como ácido fosfórico ou sais de fosfato (REHM, 1995). O

PO_4^{3-} entra na célula ativamente. Os componentes celulares que contêm fósforo são compostos de alta energia como ATP e ADP, nucleotídeos como nicotinamida e NAD e FAD, ácidos nucleicos, fosfolipídeos e polímeros formando as paredes celulares (ESPOSITO, 2004).

2.3.5.2.4 Outros macroelementos (K, Mg, S)

O potássio desempenha um papel principal na regulação do transporte de cátions divalentes. A presença de potássio é indispensável para a penetração do H_2PO_4^- . Os íons potássio também servem como coenzimas.

O magnésio é um ativador para numerosas enzimas em glicólise e membrana ATP-ases. Ele aumenta a síntese de ácidos graxos e regula o nível de íons intracelular (REHM, 1995).

O enxofre (aproximadamente 0,4% a 0,8% da matéria seca) é essencial para a síntese de proteínas (os aminoácidos cisteína e metionina contêm enxofre) e também está presente em certas vitaminas. O S aparece quase exclusivamente na célula sob a forma reduzida como -SH ou como grupo -S-S. Os sulfatos, sulfitos e tiosulfatos podem prover o enxofre para as leveduras, após sua redução dentro da célula ao mesmo estado de oxidação do sulfeto (SH^-) para poder ser incorporado ao material celular como metionina. A absorção de SO_4^{2-} é por transporte ativo (ESPOSITO, 2004).

2.3.5.3 Microelementos

Enquanto os macroelementos são necessários para a síntese de macromoléculas celulares, são requeridos outros nutrientes, principalmente elementos minerais, às vezes chamados *elementos-traço* para cumprir três funções básicas: 1) como coenzima ou co-fatores enzimáticos; 2) para transferir elétrons em reações óxido-redução; 3) como reguladores osmóticos (ESPOSITO, 2004).

Rose (1976) agrupou os minerais requeridos para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* em duas categorias, segundo a quantidade em que são requeridos, e um no terceiro grupo onde estão aqueles que em determinada concentração pode ser inibitória para o crescimento: Grupo I (0,1-1,0 mM): potássio,

magnésio, cálcio, zinco, ferro, manganês, cloro, níquel e vanádio; Grupo II (0,1-100 μM): cobalto, boro, cádmio, cromo, cobre, iodo, molibdênio, chumbo, selênio (muitos desses elementos do grupo também são inibidores em concentrações maiores que 100 μM); Grupo III (inibitórios a concentrações maiores que 100 μM): prata, arsênio, bário, mercúrio, lítio, níquel, e ósmio.

2.3.5.4 Fatores de crescimento: vitaminas

As vitaminas constituem-se em fatores termossensíveis-chave na biossíntese de diferentes compostos celulares. São moléculas orgânicas que: 1) apresentam uma grande variação na estrutura química; 2) são utilizadas em quantidades muito pequenas; e 3) têm uma ação catalítica específica ao atuar como co-enzimas de reações enzimáticas (carboxilações, transaminações, desidrogenações, transferência de átomos de carbono e de metila) (ESPOSITO, 2004).

2.4 LEVEDURA ENRIQUECIDA DE SELÊNIO

Doses reforçadas de selênio são tratamentos potenciais para uma variedade de desordens na saúde, contanto que as concentrações de selênio não alcance níveis tóxicos. Por esta razão, várias formas diferentes de selênio têm sido investigadas para determinar a forma ótima para administração em humanos, ou como um suplemento dietético, ou como um produto terapêutico para o tratamento de enfermidade (HSIA et al., 2001).

Selênio derivado de levedura tem mostrado ser uma forma menos tóxica de selênio, e assim, uma fonte preferida de uma composição de selênio para consumo humano. Selênio produzido por culturas de levedura sofre um tipo de biossíntese por meio da qual sais de selênio inorgânico são convertidos para uma forma orgânica via incorporação intracelular na levedura. Estes derivados orgânicos de selênio biossintetizados pelas leveduras são melhores fontes nutritivas de selênio porque são menos tóxicos e mais facilmente metabolizados pelo sistema dos mamíferos que seus correlativos inorgânicos (HSIA et al., 2001).

Um experimento clínico realizado por Clark et al. (1996), citados por (DE LEÓN et al., 2002), sugeriu que a ingestão de 250-300 µg/dia de selênio como um suplemento alimentar de levedura enriquecida de selênio teve um significativo efeito quimiopreventivo do câncer.

Por via de regra, concentrações extracelulares altas de selênio devem ser evitadas, enquanto que concentrações intracelular elevadas são preferidas porque estas tendem a indicar uma concentração relativa aumentada de selênio na forma orgânica o qual é preferido para administração em humanos (HSIA, et al., 2001).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem sido com êxito, enriquecida de diferentes elementos traços (DE LEÓN et al., 2002).

Korhola et al. (1986), citados por (DEMIRCI & POMETTO, 1999), relatou o desenvolvimento de levedura com 500 µg de Se/g de biomassa seca. NAGODAWITHANA et al. (1985), obteve em fermentação fed-batch, a produção de levedura com selênio ligado organicamente com no mínimo 1000 µg de Se/g de biomassa seca usando selenito de sódio como fonte de selênio. Calomme et al. (1995), citados por (DEMIRCI & POMETTO, 1999), relataram a produção de selênio ligado organicamente em concentrações de 253 µg de Se/g de biomassa seca para *Lactobacillus delbrueckii*, 375 µg de Se/g de biomassa seca para *L. plantarum*, e 407 µg de Se/g de biomassa seca para *L. casei*. SUHAJDA et al. (2000), relatou o desenvolvimento de levedura com 1200-1400 µg de Se/g de biomassa seca de levedura de panificação (*Saccharomyces cerevisiae*) usando um meio de cultura suplementado com 30 µg/ml de selenito de sódio adicionado durante a fase de crescimento exponencial. DE LEON et al. (2002), mostrou em estudos de incorporação de selênio total, em biomassa de *Saccharomyces cerevisiae*, que o método de semeadura, no qual a levedura usada para inoculação é cultivada em meio com sal de selênio, permite maior acúmulo de selênio, e estudos de especiação da levedura enriquecida mostrou que a adição de selênio no início da fase de crescimento aumenta a formação de L-Se-metionina.

Tuite & Oliver (1991), citados por (DE LEON et al., 2002), realizaram estudos com *Saccharomyces cerevisiae* e mostraram que elementos tais como Se, Ag, As e Pb podem desfavoravelmente afetar o crescimento da levedura quando presentes em concentrações maiores que 100 µmol/l, ou 7,9 mg de Se por litro,

provavelmente devido à perda da eficiência de divisão celular. Por outro lado, quando mais selênio é adicionado, mais selênio é incorporado na levedura.

Em relação a etapa de secagem e/ou pasteurização para a obtenção de um produto de levedura seca com selênio, HSIA et al. (2001), descreve que a etapa de pasteurização pode ocorrer entre cerca de 30 °C e 110 °C, preferivelmente em torno de 60 °C.

2.5 MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE ABSORÇÃO ATÔMICA - GERAÇÃO DE HIDRETO PARA DETERMINAÇÃO DE Se^{4+} , Se^{6+} E Se^{-2}

É possível determinar o Se que se encontra na forma inorgânica, isto é, Se^{4+} e Se^{6+} e compostos de selênio orgânicos, isto é, Se^{-2} , por sistema de espectrofotometria de absorção atômica e geração de hidreto, onde Se^{4+} é diretamente determinado após derivatização, Se^{6+} por diferença após redução por HCl, e teor de selênio orgânico por diferença após oxidação destrutiva de compostos orgânicos (ARIKAN et al., 1996). Alguns compostos de selênio orgânico são ácido-resistentes, tais como selenometionina, selenocisteína e o íon trimetilselenônio, que não são completamente decompostos, por esta razão causando resultados deficientes. A digestão com ácido nítrico somente é aparentemente insuficiente, e é responsável por valores deficientes de selênio encontrados em alguns trabalhos (WELZ et al., 1984).

A Espectrometria de absorção atômica com geração de hidreto oferece a vantagem de excelente sensibilidade e instrumentação relativamente simples. Antes da geração de hidreto, todas as espécies de selênio devem ser convertidas para selenito, visto que esta é a única espécie que reage com tetrahidroborato formando realmente SeH_2 volátil (GÓMEZ-ARIZA et al., 2004). Neste método, a técnica de decomposição da amostra aplicada é de grande importância para a exatidão dos valores de selênio obtido em materiais biológicos. Na técnica de geração de hidreto, tetrahidroborato de sódio é adicionado à solução da amostra acidificada, seleneto de hidrogênio é formado, tirado da solução e atomizado em uma célula de quartzo aquecida. Por esta razão, é essencial que o selênio esteja presente como seleneto. Compostos de selênio orgânico devem ser decompostos completamente para a aplicação bem sucedida desta técnica (WELZ et al., 1984). Na análise por

espectrometria por geração de hidreto de amostras, numerosos fatores influenciam a precisão. Os métodos de digestão de amostra e procedimentos de preparação são de importância crítica. A digestão deve adequadamente solubilizar os elementos de interesse sem perda por volatilização. É necessário um procedimento de preparação que garanta o apropriado estado de oxidação do analito e elimine o ácido nítrico e interferências de inter-elementos (BEACH, 1992).

2.6 AÇÚCAR MASCAVO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de proliferar sob condição aeróbia ou anaeróbia, e pode usar uma ampla variedade de compostos como fonte de carbono, mas glicose é a fonte preferida para o metabolismo fermentativo (DE LEON et al. 2002). O açúcar mascavo fornece não somente substrato, mas também vitaminas e minerais importantes para o crescimento de levedura. O açúcar mascavo é fabricado a partir do melado da cana de açúcar. Este açúcar é também chamado de bruto, (não é completamente refinado, daí o termo bruto). Ele também sofre processo de refinamento, porém em menor grau (OLIVEIRA, 2005). A Tabela 11 traz a composição química em 1kg de açúcar mascavo.

TABELA 11 - COMPOSIÇÃO QUÍMICA EM 1kg DE AÇÚCAR MASCAVO

| | <u>Açúcar Mascavo (1kg)</u> |
|-------------------|-----------------------------|
| Energia | 3760 kcal |
| Carboidratos | 973,0 g |
| Vitamina B1 | 0,100 mg |
| Vitamina B2 | 0,100 mg |
| Vitamina B6 | 0,300 mg |
| Niacina ou B3 | 0,800 mg |
| Folato | 0,010 mg |
| Ácido Pantotênico | 1,10 mg |
| Potássio | 3460 mg |
| Cálcio | 850 mg |
| Sódio | 390 mg |
| Magnésio | 290 mg |
| Fósforo | 220 mg |
| Ferro | 19,2 mg |
| Manganês | 3,20 mg |
| Cobre | 3,00 mg |
| Zinco | 1,80 mg |
| Selênio | 7,5 µg |
| Proteína | n/d |

FONTE: PHILIPPI, 2002.

2.7 PLANIFICAÇÃO EXPERIMENTAL

Planificação experimental é usada para determinar a influência de várias substâncias e suas interações e para otimizar uma ou mais respostas experimentais. Estes objetivos são conseguidos em sucessivos estágios, cada estágio sendo uma etapa homogênea de experimentos formando um corpo de resultados. O propósito é coletar o maior número de observações válidas, com tão poucos testes quanto possível.

Em alguns métodos de planificação experimental, o nível de todos os fatores é variado ao mesmo tempo em cada experimento. As vantagens são as seguintes (REHM, 1995):

- menos testes;
- maior número de fatores testados;
- detecção de interações entre fatores;
- resultados mais acurados;
- otimização e modelagem dos resultados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 FLUXOGRAMA DO PROCESSO

O processo e suas etapas para a preparação do produto de levedura rica em selênio orgânico são ilustrados no diagrama de fluxo, Figura 3.

FIGURA 3 - DIAGRAMA DE FLUXO PARA A PREPARAÇÃO DA LEVEDURA ENRIQUECIDA DE SELÊNIO ORGÂNICO

3.2 MICROORGANISMO

O microorganismo utilizado para estudo da produção de organoselênio foi a levedura *Saccharomyces cerevisiae* pertencente ao banco de culturas da Divisão de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Federal do Paraná.

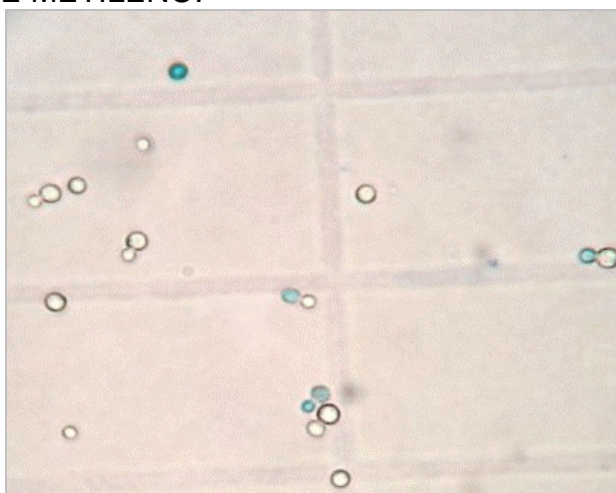
3.3 PREPARO DO INÓCULO

Para cada experimento, foi preparado um inóculo. Pesaram-se três gramas da levedura seca que foram adicionadas em frasco de Erlenmeyer de boca larga de 250 ml com 150 ml de meio de fermentação, incubando-os respectivamente em “shaker” a 30 °C e 120 rpm de agitação por três dias. Da suspensão final obtida, foram transferidas alíquotas de 10 ml de inóculo para Erlenmeyers de 250 ml com 90 ml de meio de cultivo.

3.4 VIABILIDADE CELULAR

No controle da viabilidade celular dos processos de produção de levedura (fermento prensado), a coloração das células da levedura com azul de metileno ou eritrosina e cultivo por plaqueamento são os mais empregados. A técnica de coloração com azul de metileno consiste em se misturar partes iguais da suspensão de levedura (amostra), adequadamente diluída, e da solução corante (azul de metileno). As células com alta atividade fisiológica não se colorem, enquanto as células inativas (mortas) apresentar-se-ão coloridas de azul (Figura 4). A porcentagem ou o número de células viáveis é determinado transferindo-se com uma pipeta de Pasteur a amostra para a câmara de Neubauer (ANTONINI, 2004).

FIGURA 4 - DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DE LEVEDURAS COM AZUL DE METILENO.



FONTE: ANTONINI, 2004.

3.4.1 Procedimento para Determinação da Viabilidade Celular

1. Fazer a diluição conveniente em um tubo de ensaio.
2. Após a diluição, transferir 0,3 ml para um tubo de ensaio e adicionar 0,3 ml da solução de azul de metileno-citrato de sódio.
3. Homogeneizar a mistura em agitador de tubos.
4. Colocar a lamínula na câmara de Neubauer e com auxílio da pipeta de Pasteur, transferir um pequeno volume da amostra preparada.
5. Levá-lo ao microscópio óptico e com a objetiva de 40X, fazer a contagem das células nos campos. Contar aproximadamente 40 células por campo ou três células por retículo, escolhendo dois limites em cada quadrado nos quais serão desprezadas as células que estão nos limites superior e lateral esquerdo do quadrado e desprezar as do limite inferior e lateral direito.
6. Com o contador, marcar o número de células viáveis (células que não se colorem com azul de metileno) e células não viáveis (células coloridas com azul de intenso) (ANTONINI, 2004).

$$\text{Viabilidade (\%)} = (\text{Número de células vivas} / \text{Número total de células}) \times 100$$
$$\text{Número total de células/ml} = n^\circ \text{ células nos 25 campos} \times \text{diluição} \times 10^4$$

3.4.2 Solução de azul de metileno-citrato de sódio

- azul de metileno: 0,01 g
- citrato de sódio: 2 g
- água destilada q.s.q.: 100 ml

Dissolver o corante numa pequena porção de água, adicionar os outros ingredientes e completar o volume (ANTONINI, 2004).

3.5 AJUSTE E DETERMINAÇÃO DO pH

Para o ajuste do pH na preparação dos meios de crescimento, e para as medidas de pH dos meios fermentados, utilizou-se um potenciômetro devidamente calibrado, modelo HI 9321 – HANNA.

3.6 AJUSTE E DETERMINAÇÃO DO AÇÚCAR

A escala Brix foi utilizada para expressar a concentração de açúcares no meio de fermentação, onde o °Brix expressa a quantidade, em gramas, de sólidos solúveis ou açúcares em 100 ml de solução. Aplicou-se o método de refratometria na escala Brix, com o uso de um refratômetro de bancada modelo RL3 – OPTYCZNE, para as leituras e determinações das concentrações de açúcares que se fez necessário durante o trabalho.

A refratometria na escala Brix constitui um método físico para medir a quantidade de sólidos solúvel presentes em uma amostra. Baseia-se em um sistema de graduação de aparelhos para ser utilizado especialmente na indústria açucareira, mais precisamente na análise de açúcares em geral que estejam em solução (SILVA et al, 2003).

Nos preparos dos meios de cultivo com valores de °Brix desejados, foram utilizadas soluções de açúcar mascavo. De posse dos valores dos °Brix dessas soluções, foram feitas as diluições necessárias para a obtenção final do meio de fermentação com o °Brix desejado.

A porcentagem do °Brix de uma solução de açúcar mascavo referente aos açúcares redutores e não redutores foi determinado pelo método de Somogyi-Nelson (NELSON, 1944). Neste método os glicídios redutores aquecidos em meio alcalino, transformam-se em enedióis que reduzem o íon cúprico presente a cuproso. O óxido cuproso assim formado reduz o molibdato de arsênio a óxido de molibdênio de coloração azul cuja intensidade de cor é proporcional à quantidade de açúcares redutores existentes na amostra (SILVA et al, 2003). O teor de açúcares redutores foi calculado por espectrofotometria a 535 nm, utilizando-se uma curva padrão construída a partir de uma solução de glicose (100 mg/ml) com um intervalo de 0 a 180 µg/l.

3.6.1 Procedimento para Determinação de Açúcares Redutores Solúveis

A quantidade utilizada para a técnica foi de 0,200 ml de solução de açúcar mascavo de Brix conhecido. Este volume foi transferido para um frasco volumétrico de 100 ml e aquecido em banho-maria por 10 minutos. O volume do frasco foi

completado com água destilada e filtrado. O sistema de análise compreendeu 1 ml de amostra e 1 ml de reativo de Somogyi em um tubo de ensaio, que foi fervido durante 10 minutos. O tubo foi resfriado a temperatura ambiente, adicionado de 1 ml de reativo de Nelson e completado o volume para 10 ml. Em seguida, foi feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro no comprimento de onda de 535 nm.

A curva de calibração dos açúcares redutores pode ser feita tomando-se volumes das soluções de trabalho que contenham 10 a 100 µg/ml. Faz-se nas mesmas condições uma prova em branco para o zero do aparelho. Com estas soluções obter as leituras no espectrofotômetro com as quais é traçado a curva.

3.6.2 Procedimento para Determinação de Açúcares Totais

A inversão da sacarose pode ser feita por hidrólise ácida, utilizando-se 0,200 ml da amostra. Foram transferidos 0,200 ml de solução para um frasco volumétrico e adicionado 50 ml de água destilada e 2 ml de ácido clorídrico. A solução diluída foi aquecida a 90 °C por 20 minutos, após o que o sistema foi resfriado à temperatura ambiente e recebeu a adição de hidróxido de sódio 30% até sua neutralização. A solução foi transferida para um balão volumétrico de 100 ml, completou-se o volume com água destilada e filtrou-a, e a partir daí foi feita a diluição necessária para determinação, conforme descrito anteriormente.

Para o cálculo dos açúcares não-redutores, o resultado final deve ser multiplicado pelo fator 0,95 depois de subtraído o teor de açúcares redutores anteriormente determinados.

A porcentagem encontrada de açúcares redutores e não-redutores em relação ao Brix, nas soluções de açúcar mascavo utilizadas neste trabalho, foi de 84,77% para os açúcares não-redutores e 4,03% para os açúcares redutores. Assim, para uma solução com 10 Brix de sólidos solúveis, tem-se 8,477 g de açúcares não-redutores e 0,403 g de açúcares redutores em 100 ml desta solução.

3.7 DETERMINAÇÃO DA BIOMASSA

A determinação da biomassa foi feita pelo método do peso seco, que sendo corretamente executada, constitui o processo básico de medida de massa, servindo

como referência na padronização de outros métodos. Uma amostra da suspensão microbiana é centrifugada, o sobrenadante desprezado e o sedimento celular lavado algumas vezes com água destilada ou salina. Após a última centrifugação, o sedimento é colocado em um vidro relógio previamente tarado e, em seguida, secado em estufa até peso constante (LIMA, 2001).

Para a determinação do peso seco, a biomassa de levedura foi colhida por centrifugação a 2100 g em tubos previamente tarados, a biomassa foi então lavada 4 vezes para remoção parcial do selênio inorgânico adsorvido nela, onde em cada lavagem, a biomassa foi ressuspensa no próprio tubo com água destilada com auxílio de um bastão de vidro. Após a lavagem a biomassa foi novamente centrifugada a 2100 g, descartando-se o sobrenadante. Após a quarta lavagem, os tubos com biomassa foram colocados em estufa de secagem a aproximadamente 60 °C por 24 horas. Os tubos foram transferidos para um dessecador, onde permaneceram até esfriarem e foram então pesados.

3.8 COMPOSIÇÃO DO MEIO DE CRESCIMENTO

A composição da solução de crescimento de levedura utilizada inicialmente foi baseada em um meio comercial encontrado em literatura para produção de levedura de panificação, com algumas alterações. A Tabela 12 apresenta o meio comercial da literatura e a solução de sais utilizados neste trabalho.

TABELA 12 - MEIO COMERCIAL E MEIO EXPERIMENTAL PARA PRODUÇÃO DE LEVEDURA DE PANIFICAÇÃO

| Meio comercial | (g.l ⁻¹) | Meio experimental | (g.l ⁻¹) |
|--------------------------------------|----------------------|---|----------------------|
| Melaço (total alimentado) | 340 | Açúcar mascavo | 40 |
| NH ₃ aq. | 0,3 | (NH ₄) ₂ SO ₄ | 4 |
| H ₃ PO ₄ (85%) | 2 | KH ₂ PO ₄ | 3 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 1,5 | MgSO ₄ .7H ₂ O | 4 |

FONTE: RATLEDGE & KRISTIANSEN, 2001.

3.9 PREPARO DO MEIO DE CRESCIMENTO

Todos os meios foram preparados seguindo o mesmo procedimento. Foram transferidas alíquotas de uma solução previamente preparada de açúcar mascavo,

item 3.6, para frascos de erlenmeyer de 250 ml, sendo em seguida, adicionados em cada frasco água e os nutrientes necessários para se obter um volume líquido final de 90 ml de meio com o Brix desejado. Em seguida, ajustou-se o pH do meio para 6,0 com a utilização de uma solução de NaOH 3,0 N. O meio, sem selênio, foi então pasteurizado em autoclave a 105 °C por 15 minutos. O meio a ser pasteurizado não deve conter selenito de sódio porque a sua presença acarretaria na formação de compostos de selênio voláteis e outros compostos de selênio insolúveis. A etapa seguinte foi adicionar no meio de cultivo pasteurizado, trabalhando-se no fluxo laminar, alíquotas de inóculo e de solução de selenito de sódio previamente preparada. Por último, os erlenmeyers foram colocados em um incubador “shaker”, dando início à fermentação.

3.10 DIGESTÃO DA BIOMASSA PARA ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA-GERAÇÃO DE HIDRETO

A digestão da biomassa foi feita de acordo com o manual SW-846 da Agência Americana de Proteção Ambiental (USEPA), Método 3050, para amostras sólidas.

3.10.1 Método de Digestão Sólida para Determinação de Se^{4+} e Se^{6+}

Cada digestão sólida requereu a adição de 0,200 g de amostra mais 10 ml de ácido nítrico 70% 1:1 em um becker de 250 ml. O becker foi coberto com um vidro-relógio e o conteúdo aquecido e refluxado sem fervura a 95 °C por 15 minutos. O conteúdo foi deixado a resfriar. Foi adicionado mais 5 ml de ácido nítrico 70% e a mistura foi refluxada sob a proteção do vidro-relógio por 30 minutos. Esta etapa foi repetida uma vez, após a qual o volume foi reduzido a aproximadamente 5 ml. A mistura foi deixada a resfriar. Foram adicionados 5 ml de ácido clorídrico 37% mais 0,04 g de uréia e colocado em banho de água quente (fervura) por 30 minutos para reduzir o Se^{6+} para Se^{4+} . A adição da uréia na amostra foi para degaseificá-la. Se o gás não for retirado, ele pode causar deficiência na precisão de medições sucessivas de um mesmo mensurando nas análises de hidreto. A precisão é melhorada se houver a possibilidade de degaseificar as amostras antes das análises (BEACH, 1992).

3.10.2 Método de Digestão Sólida para Determinação de Se Total

Esta metodologia difere da metodologia acima devido à utilização de um oxidante extra para a destruição dos compostos orgânicos de selênio. Este oxidante é o peróxido de hidrogênio 30%.

Cada digestão sólida requereu a adição de 0,200 g de amostra mais 10 ml de ácido nítrico 70% 1:1 em um becker de 250 ml. O becker foi coberto com um vidro-relógio e o conteúdo aquecido e refluxado sem fervura a 95 °C por 15 minutos. O conteúdo foi deixado a resfriar. Foi adicionado mais 5 ml de ácido nítrico 70% e a mistura foi refluxada sob a proteção do vidro-relógio por 30 minutos. Esta etapa foi repetida uma vez, após o qual o volume foi reduzido a aproximadamente 5 ml. A mistura foi deixada a resfriar. 2 ml de água milli-Q e 3 ml de H₂O₂ 30% foram adicionados e a mistura aquecida até a efervescência cessar. Foi adicionado mais peróxido de hidrogênio em porções de 1 ml até clarear a amostra. O conteúdo foi deixado a resfriar. Foi adicionado 5 ml de ácido clorídrico 37% mais 0,04 g de uréia e colocado em banho maria (fervura) por 30 minutos para reduzir o Se⁺⁶ para Se⁺⁴. A adição da uréia na amostra foi para degaseificá-la (BEACH, 1992).

3.11 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*

De Leon et al. (2002) concluiu em estudo de especiação de selênio em levedura *Saccharomyces cerevisiae* enriquecida com selênio, que quando o objetivo de enriquecimento de levedura com selênio é a formação de L-Se-metionina, o melhor procedimento de enriquecimento é usando a fase de crescimento exponencial.

Baseado no estudo de De Leon, o procedimento de enriquecimento de levedura com selênio foi realizado utilizando-se a fase de crescimento exponencial. Portanto, fez-se necessário um estudo cinético de crescimento da levedura *S. cerevisiae* para se conhecer a fase exponencial da sua cinética de crescimento. Primeiramente fez-se uma cinética de crescimento prévia de 47 horas de fermentação com 7 pontos coletados, sendo determinado a biomassa produzida versus o tempo. Foram utilizados 7 frascos de erlenmeyer de 250 ml à temperatura de 30 °C e 120 rpm de agitação em “shaker”.

A segunda cinética foi realizada em frascos de erlenmeyer de 250 ml à temperatura de 30 °C e 120 rpm de agitação em “shaker”, num total de 12 frascos. Foi preparado um mesmo meio de crescimento e um mesmo inóculo, que foram repartidos em partes iguais em todos os frascos. No primeiro frasco coletado, tempo zero, até o último frasco coletado, tempo de 35 horas (obtido da primeira cinética), foi determinado: número de células viáveis, número de células totais, pH e Brix.

3.12 ESTUDO DAS VARIÁVEIS NUTRICIONAIS PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. cerevisiae*

Como descrito no item 2.3.5, a composição do meio de cultura desempenha um papel fundamental nos processos de produção de biomassa ou metabólitos. A disponibilidade de substâncias de crescimento é decisiva para o desempenho ótimo.

Dois aspectos da composição do meio são examinados: O aspecto qualitativo, para identificar as substâncias requeridas para o crescimento; e o aspecto quantitativo, para estabelecer as concentrações que são suficientes, mas não inibitórias para o crescimento ou tipo de metabólito requerido.

Como uma das etapas deste trabalho, seguindo esse raciocínio, foi feita a investigação qualitativa das substâncias requeridas para o crescimento da *S. cerevisiae*, por meio de pesquisa bibliográfica. As substâncias encontradas por meio dessa pesquisa, utilizadas na composição do meio, estão registradas na tabela 12, item 3.8.

O açúcar mascavo foi o substrato escolhido e utilizado como fonte de carbono, de elementos traços e de fatores de crescimento necessários para o crescimento da biomassa de levedura. A composição do açúcar pode ser visto no item 2.6, Tabela 11.

Na categoria dos macroatmentos, item 2.3.5.2, as substâncias utilizadas como fontes desses elementos, para a levedura, de acordo com a tabela 12, foram:

- O $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ como fonte de N e S, pois o NH_4^+ é o íon utilizado mais facilmente entre as formas inorgânicas de nitrogênio, já que seu uso não requer reações de óxido-redução porque o átomo de nitrogênio está no mesmo grau de oxidação (-3) que no átomo de nitrogênio nas moléculas biológicas (aminoácidos, purinas e pirimidinas) (ESPOSITO, 2004).

- O $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ serve como fonte de Mg e também de S. Destaque é dado ao Mg devido a sua função de regular o nível de íons intracelular, o que é de grande importância neste trabalho em que se propõe o enriquecimento de selênio intracelular utilizando íons selenito.

- O KH_2PO_4 como fonte de P e de K.

Após o término desta etapa, o passo seguinte foi examinar o aspecto quantitativo das substâncias escolhidas.

No exame do aspecto quantitativo, onde se busca conhecer as concentrações necessárias das substâncias escolhidas para o crescimento e otimização da biomassa, foram realizados dois delineamentos fatoriais fracionários 3^{3-1} , os quais permitiram verificar a ocorrência de efeitos lineares e quadráticos dos fatores (nutrientes) na variável de resposta, biomassa celular. O planejamento com 9 ensaios, 3^{3-1} , é uma fração terça parte do fatorial completo 3^3 , pois 3^{3-1} é um terço de 3^3 . A base 3 representa o número de níveis no delineamento e o expoente 3 refere-se ao número de variáveis controlado pelo experimentador. Os resultados obtidos foram analisados usando o programa Statistica 7.0 através de modelagem de Superfície de Resposta.

Nos estudos das variáveis nutricionais, todos os experimentos foram realizados em frascos de erlenmeyers de 250 ml à temperatura de 30 °C e 120 rpm de agitação em “shaker”.

Para as análises e planejamento dos experimentos, o valor em °Brix foi substituído pelo seu valor correspondente em concentração de sacarose.

3.12.1 Planejamento 3^{3-1} para as Variáveis Sacarose, Na_2SeO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Neste planejamento os fatores estudados foram a concentração de sacarose, de selenito de sódio e de sulfato de amônio distribuídos em três níveis. O experimento foi feito uma única vez com 3 repetições do ponto central, resultando num total de 12 ensaios. Algumas condições de cultivo foram mantidas fixas como a temperatura, pH, agitação, concentração de KH_2PO_4 e concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Os valores reais e codificados estão mostrados na Tabela 13.

TABELA 13 - VALORES (REAL E CODIFICADO) DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS USADAS NO PLANEJAMENTO 1

| Termos codificados | -1 | 0 | +1 |
|---|----|----|----|
| Fatores | | | |
| Sacarose (g/l) | 20 | 50 | 80 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l) | 2 | 5 | 8 |
| Na ₂ SeO ₃ (mg/l) | 10 | 25 | 40 |

3.12.2 Planejamento 3³⁻¹ para as Variáveis Sacarose, Na₂SeO₃ e MgSO₄.7H₂O

Foi empregado novamente um planejamento fatorial fracionário 3³⁻¹, utilizando-se concentrações maiores de sacarose. Os outros dois fatores avaliados foram o selenito de sódio e sulfato de magnésio, distribuídos em três níveis. O experimento foi feito uma única vez com 3 repetições do ponto central, resultando num total de 12 ensaios. Os parâmetros de cultivo mantidos fixos foram a temperatura, pH, agitação, concentração de KH₂PO₄ e concentração de (NH₄)₂SO₄ em. Os valores reais e codificados das variáveis independentes estão mostrados na Tabela 14.

TABELA 14 - VALORES (REAL E CODIFICADO) DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS USADAS NO PLANEJAMENTO 2

| Termos codificados | -1 | 0 | +1 |
|--|-----|-----|-----|
| Fatores | | | |
| Sacarose (g/l) | 80 | 100 | 120 |
| MgSO ₄ .7H ₂ O (g/l) | 0,4 | 1,2 | 2,0 |
| Na ₂ SeO ₃ (mg/l) | 10 | 25 | 40 |

3.13 ESTUDO DAS VARIÁVEIS RELAÇÃO C:N E Na₂SeO₃ NA PRODUÇÃO DE Se_{org.} E Se_T NA BIOMASSA DE LEVEDURA

Neste experimento foi realizado um planejamento fatorial completo 3²⁻⁰ onde se buscou otimizar as variáveis respostas e verificar a ocorrência de efeitos lineares e quadráticos dos fatores relação C:N e concentração de selenito de sódio nas variáveis respostas de interesse: teor de selênio orgânico (Se_{org.}) e teor de selênio total (Se_T) na biomassa de levedura. Os resultados obtidos para as variáveis

respostas foram analisados usando o programa Statistica 7.0 através de modelagem de Superfície de Resposta.

3.13.1 Planejamento Fatorial Completo 3^{2-0} para Produção de Se_{org} .

Os fatores estudados foram a concentração de Na_2SeO_3 e a relação C:N. Para se obter os valores dos três níveis da relação C:N, manteve-se fixo o valor do fator concentração de sacarose em 120 g/l e utilizou-se as seguintes concentrações para o $(NH_4)_2SO_4$: 2,4, 4,0 e 12,0 g/l. Para as concentrações acima, os três níveis da relação C:N assumem os valores: 20:1, 60:1 e 100:1. O experimento foi feito uma única vez com 3 repetições do ponto central, resultando num total de 12 ensaios. Os parâmetros de cultivo mantidos fixos foram a temperatura, pH, agitação e concentração de KH_2PO_4 . Os valores reais e codificados das variáveis independentes estão mostrados na Tabela 15.

TABELA 15 - VALORES (REAL E CODIFICADO) DAS VARIÁVEIS EXPERIMENTAIS USADAS NO PLANEJAMENTO 3

| Termos codificados | -1 | 0 | +1 |
|--------------------|------|------|-------|
| Fatores | | | |
| C:N | 20:1 | 60:1 | 100:1 |
| Na_2SeO_3 (mg/l) | 10 | 25 | 40 |

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CINÉTICA DE CRESCIMENTO DE *Saccharomyces cerevisiae*

Como detalhado no item 3.11, foi realizado um estudo cinético do crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* para se conhecer a fase de crescimento exponencial. Na Tabela 16 estão registrados os valores cinéticos obtidos das variáveis: tempo de fermentação em horas, n° de células por ml, n° de células vivas por ml, viabilidade, pH e Brix, assim como o respectivo frasco do qual se obteve os dados cinéticos.

TABELA 16 - DADOS OBTIDOS NA CINÉTICA DA *Saccharomyces cerevisiae*

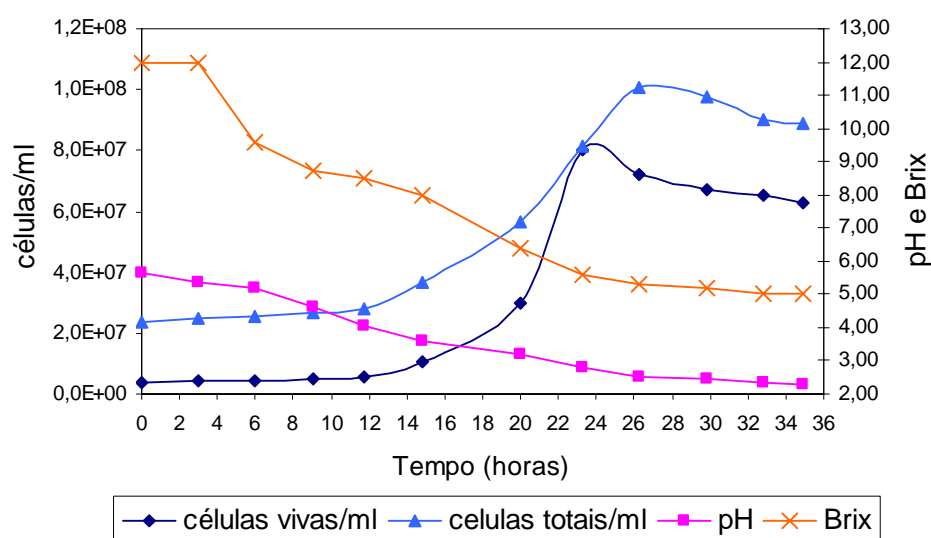
| Frasco | Tempo (h) | N° células/ml | N° células vivas/ml | viabilidade | pH | Brix |
|--------|-----------|---------------|---------------------|-------------|------|------|
| 1 | 0,00 | 2,39E+07 | 4,00E+06 | 0,17 | 5,62 | 12,0 |
| 2 | 3,00 | 2,48E+07 | 4,50E+06 | 0,18 | 5,38 | 12,0 |
| 3 | 6,00 | 2,54E+07 | 4,60E+06 | 0,18 | 5,20 | 9,6 |
| 4 | 9,00 | 2,66E+07 | 5,00E+06 | 0,19 | 4,63 | 8,8 |
| 5 | 11,78 | 2,81E+07 | 5,70E+06 | 0,20 | 4,08 | 8,5 |
| 6 | 14,78 | 3,68E+07 | 1,03E+07 | 0,28 | 3,60 | 8,0 |
| 7 | 20,00 | 5,66E+07 | 2,96E+07 | 0,52 | 3,19 | 6,4 |
| 8 | 23,28 | 8,13E+07 | 7,99E+07 | 0,98 | 2,80 | 5,6 |
| 9 | 26,28 | 1,01E+08 | 7,24E+07 | 0,72 | 2,53 | 5,3 |
| 10 | 29,83 | 9,76E+07 | 6,71E+07 | 0,69 | 2,45 | 5,2 |
| 11 | 32,83 | 9,02E+07 | 6,53E+07 | 0,72 | 2,33 | 5,0 |
| 12 | 34,88 | 8,89E+07 | 6,26E+07 | 0,70 | 2,28 | 5,0 |

Os dados da Tabela 16 foram plotados em um gráfico, Figura 5, onde foi possível visualizar o comportamento cinético das variáveis determinadas. O gráfico foi traçado tendo na abscissa o tempo em horas, e na ordenada os demais parâmetros cinéticos.

Da análise da curva do Brix na Figura 5, observou-se um baixo consumo de açúcar durante a fermentação, visto que o brix final foi igual a 5, ou seja, somente 58,3% do açúcar foram consumidos. Este comportamento ocorre quando a levedura cresce em glicose segundo a via metabólica chamada fermentação da glicose ou crescimento fermentativo (via reductiva), com produção de etanol e dióxido de carbono. Esta via é predominante quando se tem altas concentrações de glicose, superiores a 100 mg/l, ou na ausência de oxigênio. Ela é relativamente pouco eficiente, apresentando um rendimento energético de aproximadamente 2 mols de

ATP por mol de glicose. Esta via foi a predominante durante esta cinética, visto que o açúcar do meio de fermentação foi muito superior a 100 mg/l, e também porque a fermentação foi realizada em frascos de erlenmeyer tampados com chumaço de algodão, acarretando uma obstrução a entrada de oxigênio no meio de cultivo. STEHLIK-TOMAS et al. (2004), chamaram de semi-aeróbias as fermentações realizadas em frascos de erlenmeyer em incubador “shaker”.

FIGURA 5 - CINÉTICA DA *S.cerevisiae* EM FRASCO DE ERLLENMEYER



Com relação à curva do pH, observou-se que este teve uma queda durante a fermentação, apresentando um valor próximo de 2,3 no final da fermentação. Este comportamento pode ser atribuído a quatro fatores, segundo descrito por MOO-YOUNG (1985): à formação de produtos, ao consumo de nutrientes, às reações de oxidação/redução e às mudanças na capacidade do tampão. Nessa fermentação em particular, em relação à formação de produtos, tem-se a extrusão de prótons e de CO₂, os quais tendem a abaixar o pH, durante o metabolismo aeróbico de carboidrato em meio simples, e aos produtos de fermentação de caráter ácido como o etanol. Em relação ao consumo de nutriente, tem-se o sal de amônio, que foi fornecido à cultura como única fonte de nitrogênio, levando então o consumo de amônia a uma queda do pH, devido à liberação do próton H⁺. Em relação à mudança na capacidade do tampão, tem-se a depleção da capacidade tamponante do KH₂PO₄ que atua como substrato.

Outros dois gráficos foram plotados (Figuras 6 e 7) para mostrar as fases da cinética de crescimento celular e os seus respectivos tempos. Com eles, foram obtidos os valores das taxas de crescimento específico, $\mu_{\text{máx}}$, para as curvas do número de células totais e viáveis da *Saccharomyces cerevisiae*. Ambos os gráficos, Figura 6 e 7, foram construídos plotando-se o logaritmo natural da (concentração celular/ml) versus o tempo de fermentação.

FIGURA 6 - CURVA LN DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS VIVAS/ml DE MEIO DE FERMENTAÇÃO

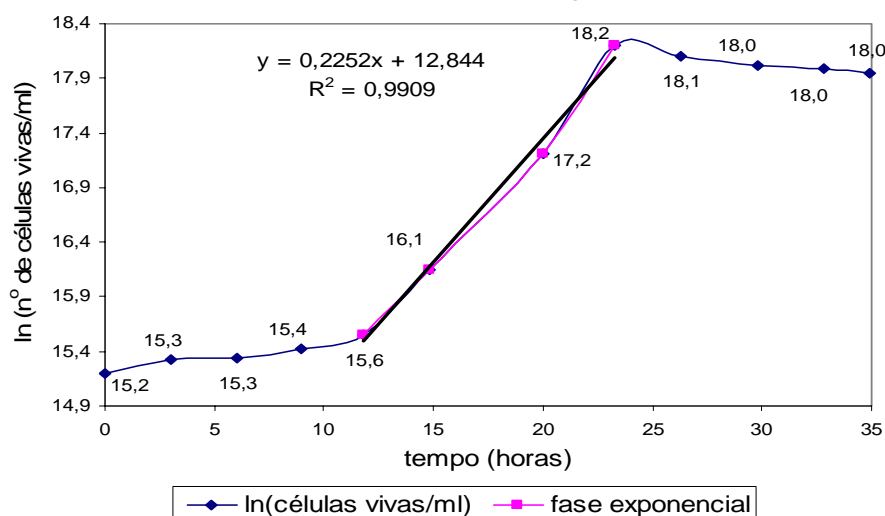
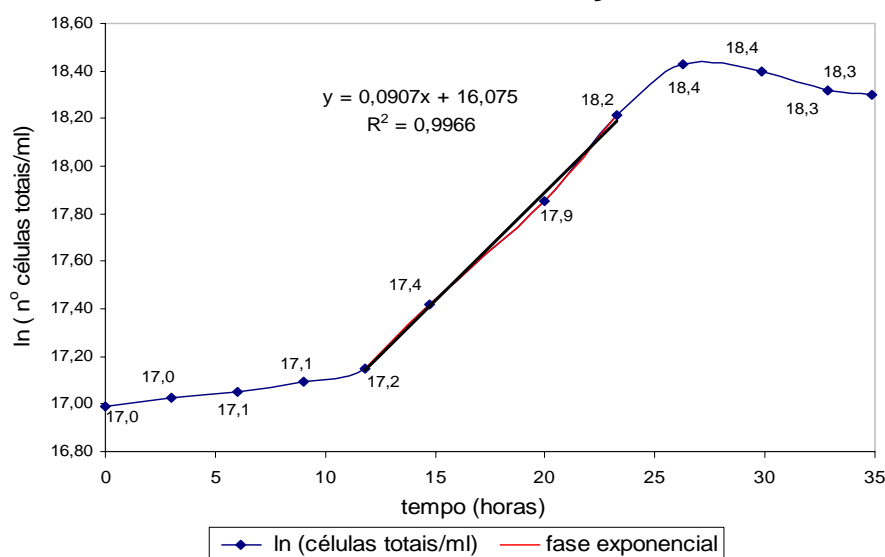


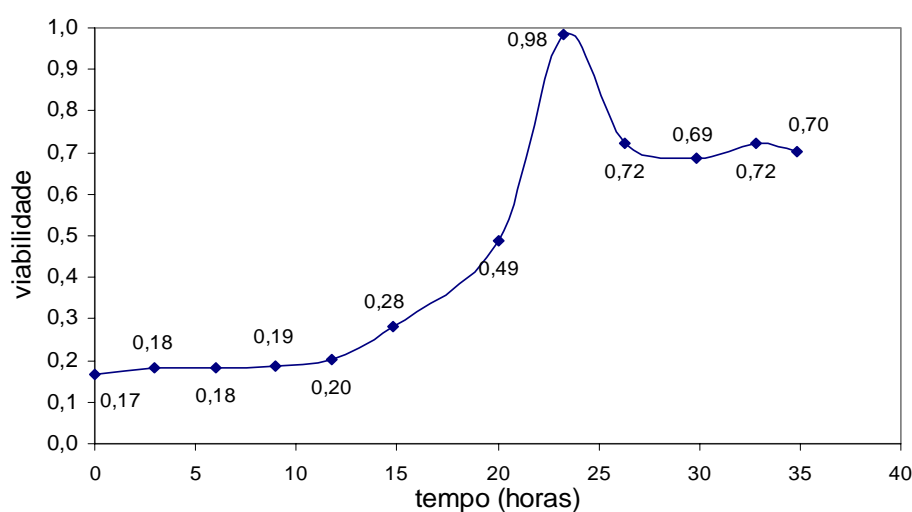
FIGURA 7 - CURVA LN DA CINÉTICA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS TOTAIS/ml DE MEIO DE FERMENTAÇÃO



A fase exponencial obtida na curva das células viáveis durou 11,5 horas, tendo seu fim 23 horas após o início da fermentação. A taxa de crescimento específico μ , foi igual a $0,226 \text{ h}^{-1}$. O tempo de 23 horas, correspondente ao tempo aproximado de término da fase de crescimento exponencial, foi o tempo utilizado nos experimentos realizados durante todo o trabalho. Para a curva de crescimento das células totais foi encontrado um tempo decorrido do início da fermentação até o fim da fase de crescimento exponencial, igual a 25 horas e uma taxa de crescimento específico, μ , igual a $0,092 \text{ h}^{-1}$.

A Figura 8 traz o gráfico da viabilidade celular versus o tempo de fermentação, nele pôde-se observar que a viabilidade atingiu o seu máximo próximo de 23 horas de cinética, sendo o pH neste ponto em torno de 3, e teve um decréscimo para 0,72 em 26 horas de fermentação, onde se observou em microscópio na contagem em câmara de Neubauer, lise das células. O pH neste ponto foi igual a 2,53, mantendo-se constante até o final da cinética. Esta queda da viabilidade pode ser atribuída à toxicidade do etanol e a falta de oxigênio no meio. É conhecido o efeito inibitório dos álcoois no crescimento das leveduras (Van Uden, 1989) citado por (FERREIRA, 1995). Crueger & Crueger (1989), citados por (FERREIRA, 1995) relatam que um aumento da concentração de etanol até 35 g/l provoca uma diminuição na síntese celular.

FIGURA 8 - CINÉTICA DA VIABILIDADE CELULAR PARA A *S.cerevisiae*



4.2 ESTUDO DAS VARIÁVEIS NUTRICIONAIS DO PROCESSO

Conforme descrito no item 3.12, realizaram-se dois planejamentos fatoriais fracionários 3^{3-1} para o estudo das variáveis nutricionais do processo: concentração de sacarose (proveniente da solução de açúcar mascavo de Brix conhecido), de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e de MgSO_4 , com o objetivo de aumentar a produção da variável resposta de interesse, biomassa celular, e verificar a ocorrência de efeitos lineares e quadráticos dos fatores sobre ela.

Os resultados obtidos nos planejamentos fatoriais foram submetidos à análise por superfície de resposta e à análise estatística. Por meio do Diagrama de Pareto foram determinados quais nutrientes têm influência estatisticamente significativa sobre a variável resposta (produção de biomassa), e através do modelo desenvolvido, as quantidades de nutrientes foram otimizadas.

4.2.1 Resultado do Planejamento 3^{3-1} para as Variáveis Sacarose, Na_2SeO_3 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

O meio de cultivo do inóculo para este experimento foi de 4 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 40 g/l de sacarose, 3 g/l de KH_2PO_4 e 4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

O meio de enriquecimento com selênio teve fixo os valores das concentrações dos nutrientes KH_2PO_4 em 3 g/l e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ em 4 g/l.

Na Figura 9, tem-se o Diagrama de Pareto para as variáveis: concentração de sacarose, de selenito de sódio e de sulfato de amônio. Os resultados obtidos para a variável de resposta, biomassa produzida, assim como os valores reais dos fatores em cada ensaio deste experimento estão na Tabela 17.

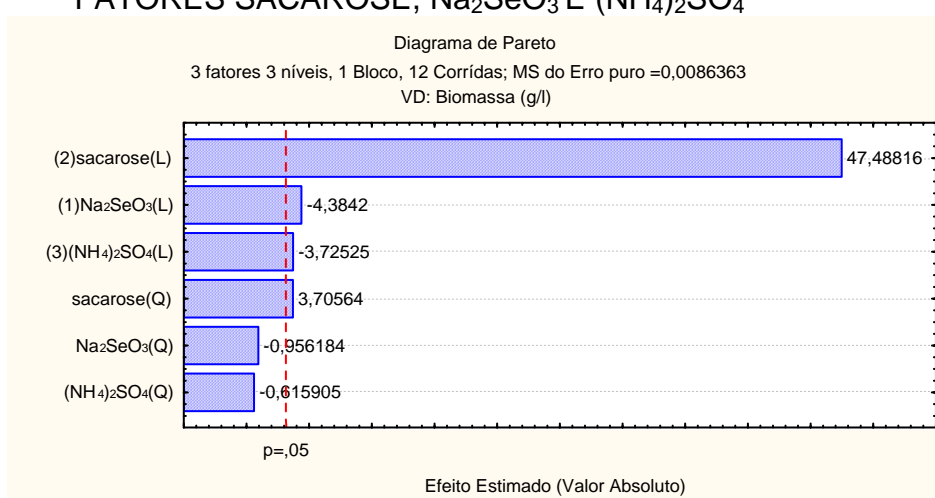
Conforme o Diagrama de Pareto mostrado na Figura 9, a relação dos três fatores estudados com a produção de biomassa foi em uma forma linear, estatisticamente significativa ao nível de 5%, tendo o fator concentração de sacarose o maior efeito na produção de biomassa. O efeito linear do fator concentração de sacarose apresentou um valor positivo, já os efeitos lineares dos fatores concentração de selenito e de sulfato de amônio mostraram-se negativos. Portanto, se consegue a produção máxima de biomassa com o fator sacarose ajustado no seu

nível superior e os fatores selenito e sulfato de amônio ajustados em seus níveis inferiores.

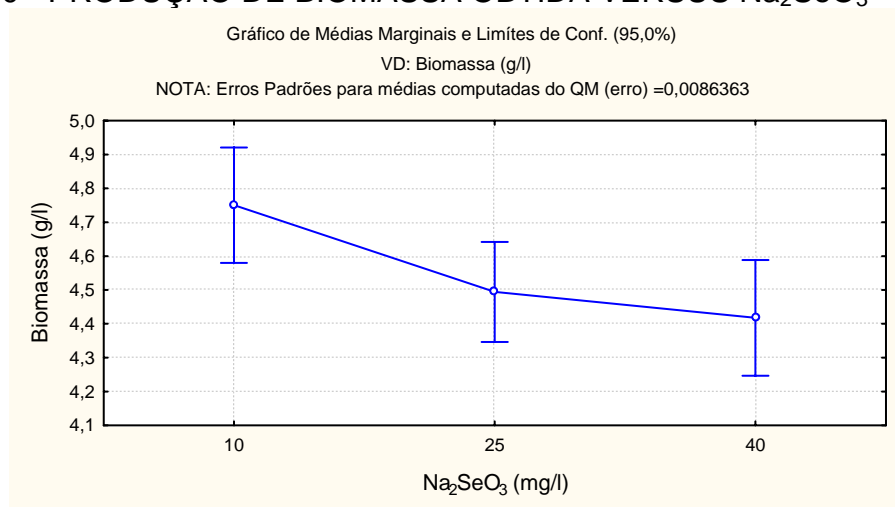
TABELA 17 - PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

| Ensaio | Fatores experimentais | | | Variável de resposta |
|--------|--|-------------------|--|----------------------|
| | Na ₂ SeO ₃ (mg/l) | Sacarose (g/l) | (NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l) | Biomassa (g/l) |
| 1 | 10 | 20 | 2 | 3,164 |
| 2 | 10 | 50 | 8 | 4,667 |
| 3 | 10 | 80 | 5 | 6,420 |
| 4 | 25 | 20 | 8 | 2,489 |
| 5 | 25 | 50 | 5 | 4,776 |
| 6 | 25 | 80 | 2 | 6,311 |
| 7 | 40 | 20 | 5 | 2,420 |
| 8 | 40 | 50 | 2 | 4,681 |
| 9 | 40 | 80 | 8 | 6,152 |
| 10 | 25 | 50 | 5 | 4,637 |
| 11 | 25 | 50 | 5 | 4,575 |
| 12 | 25 | 50 | 5 | 4,742 |

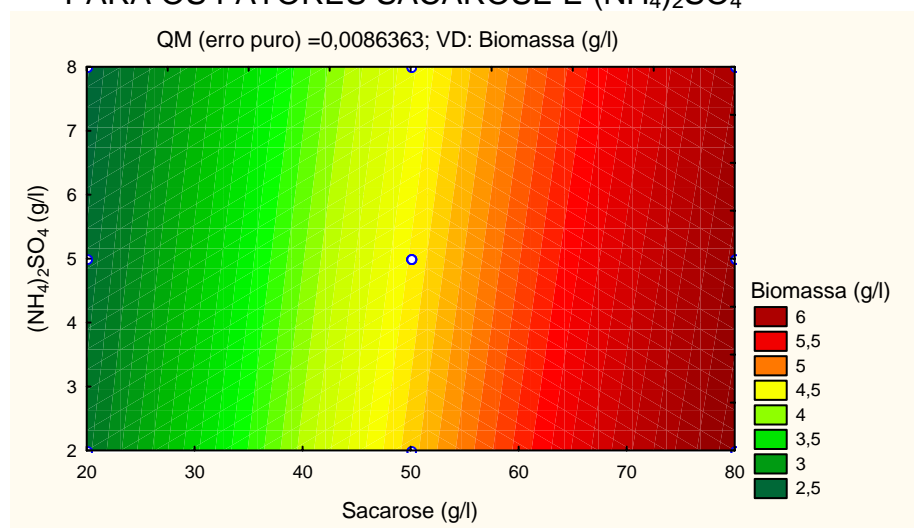
FIGURA 9 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE, Na₂SeO₃ E (NH₄)₂SO₄



O valor negativo do efeito relevante do fator concentração de selenito de sódio era esperado, baseado no trabalho de Tuite & Oliver (1991), citado por (De Leon et al., 2002), que fizeram estudos com *Saccharomyces cerevisiae* e mostraram que elementos tais como Se, Ag, As e Pb podem desfavoravelmente afetar o crescimento da levedura quando presente em concentrações maiores que 100 $\mu\text{mol/l}$ (7,9 mg/l para o Se), provavelmente devido à perda da eficiência de divisão celular. Este efeito pode ser observado na Figura 10.

FIGURA 10 - PRODUÇÃO DE BIOMASSA OBTIDA VERSUS Na_2SeO_3 

A Figura 11 traz o gráfico de Curvas de Contorno da variável de resposta Biomassa em função dos fatores sacarose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Este gráfico foi gerado pelo programa Statistica, mantendo fixo um dentro os 3 fatores. O valor da variável Na_2SeO_3 foi fixado no seu nível inferior de maior produção de biomassa, 10 mg/l.

FIGURA 11 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO FATORIAL 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE E $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 

A maior produção de biomassa na região estudada foi obtida com a variável sacarose em seu nível superior e a variável $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em seu nível inferior.

As Curvas de Contorno obtidas são curvas locais, isto é, curvas aplicáveis apenas para a determinada região investigada, fazendo-se necessário estudar a influência da variável concentração de sacarose em níveis maiores.

O modelo matemático dos efeitos relevantes para este planejamento ficou:

$$\text{Biomassa (g/l)} = 2,0962 - 0,0111[\text{Na}_2\text{SeO}_3] + 0,0601[\text{sacarose}] - 0,0471[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$$

onde $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$ em mg/l; [sacarose] e $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ em g/l.

4.2.2 Resultado do Planejamento 3^{3-1} para as Variáveis Sacarose, Na_2SeO_3 e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Neste segundo delineamento, fez-se um estudo da influência do fator concentração de sacarose em níveis maiores que aqueles utilizados no primeiro delineamento, juntamente com os fatores concentração de Na_2SeO_3 e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na produção de biomassa.

A concentração dos nutrientes no meio de cultivo para o preparo do inóculo neste experimento foram iguais a 1,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 80 g/l de sacarose, 3 g/l de KH_2PO_4 e 2 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

No meio de enriquecimento com selênio mantiveram-se constantes os valores das concentrações dos nutrientes KH_2PO_4 em 3 g/l e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 3 g/l.

Os resultados obtidos para a biomassa, assim como os valores reais dos fatores em cada ensaio deste experimento estão na Tabela 18.

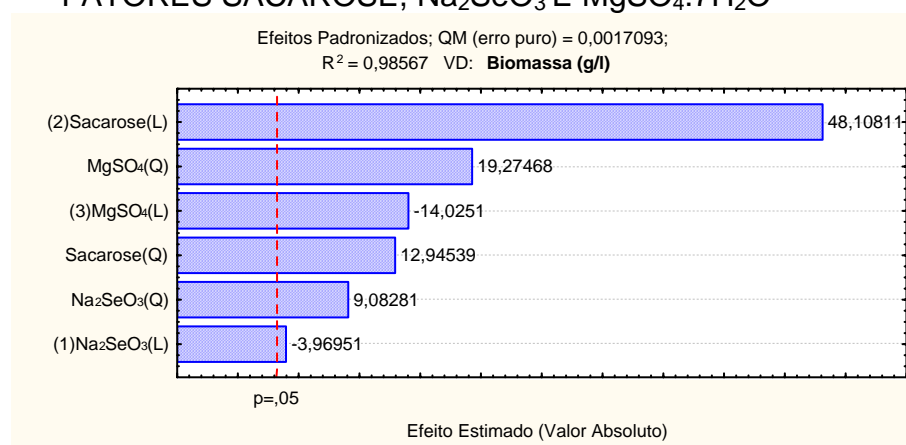
TABELA 18 - PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA

| Ensaio | Fatores experimentais | | | Variável de resposta |
|--------|-------------------------------------|-------------------|--|----------------------|
| | Na_2SeO_3 (mg/l) | Sacarose (g/l) | $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/l) | Biomassa (g/l) |
| 1 | 10 | 80 | 0,4 | 5,436 |
| 2 | 10 | 100 | 2,0 | 6,470 |
| 3 | 10 | 120 | 1,2 | 7,489 |
| 4 | 25 | 80 | 2,0 | 5,599 |
| 5 | 25 | 100 | 1,2 | 7,168 |
| 6 | 25 | 120 | 0,4 | 6,979 |
| 7 | 40 | 80 | 1,2 | 5,622 |
| 8 | 40 | 100 | 0,4 | 6,310 |
| 9 | 40 | 120 | 2,0 | 7,061 |
| 10 | 25 | 100 | 1,2 | 7,250 |
| 11 | 25 | 100 | 1,2 | 7,252 |
| 12 | 25 | 100 | 1,2 | 7,250 |

No Diagrama de Pareto, Figura 12, observou-se que os três fatores estudados tiveram uma influência estatisticamente significativa para um $p \leq 0,05$,

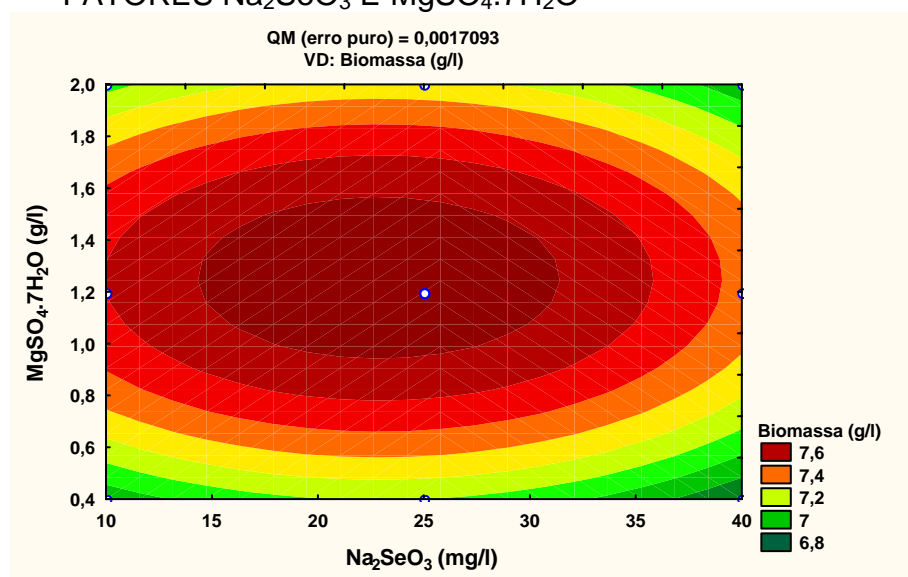
tanto para seus efeitos linear quanto quadrático sobre a variável resposta. O termo linear e quadrático do fator concentração de sacarose foi de sinal positivo, sendo o seu termo linear o que teve maior efeito na produção de biomassa, significando que quando se aumenta a concentração de sacarose no meio de cultivo, aumenta-se a produção biomassa.

FIGURA 12 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE, Na_2SeO_3 E $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



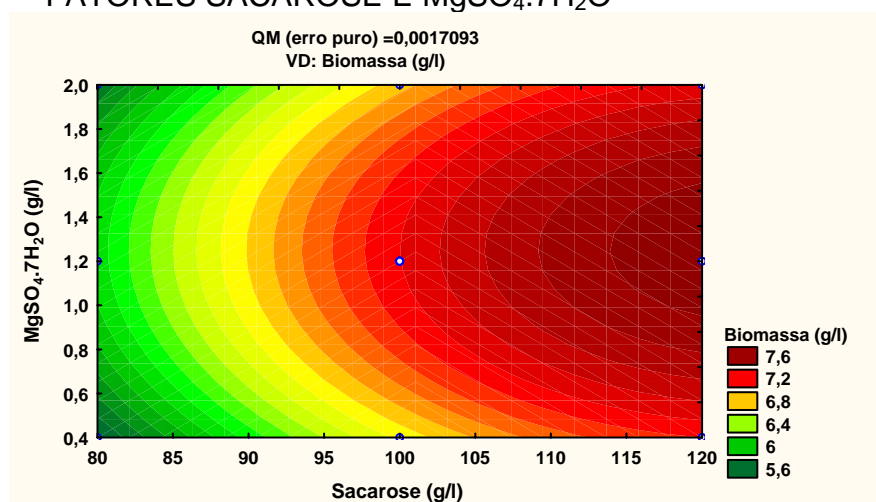
De acordo com o gráfico de Curvas de contorno da variável Biomassa em função das variáveis concentração de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e de Na_2SeO_3 , Figura 13, a maior produção de biomassa foi obtida no nível médio dos dois fatores, 25 mg/l de Na_2SeO_3 e 1,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Diferente do delineamento 1, neste delineamento conseguiu-se uma produção de biomassa maior com o fator Na_2SeO_3 estando no seu nível central, 25 mg/l, do que estando no seu nível inferior, 10 mg/l, o que significa uma menor toxidez por parte do Se. Este comportamento deve ser atribuído ao $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Convém ressaltar que o magnésio pertence ao grupo dos macroelementos, que são usados em quantidades de g/l ou mg/l, e que uma de suas funções é a de regular o nível de íons intracelular, como citado por REHM, (1995). A concentração do $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ no seu nível central igual a 1,2 g/l é equivalente a 117 mg/l de Mg no meio de cultivo.

FIGURA 13 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES Na_2SeO_3 E $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



Na Figura 14, tem-se o gráfico de Curvas de Contorno da variável Biomassa em função das variáveis concentração de sacarose e de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Para a obtenção destas Curvas pelo programa Statistica, o valor da variável concentração de Na_2SeO_3 foi fixado no seu nível central de maior produção de biomassa, 25 mg/l.

FIGURA 14 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{3-1} PARA OS FATORES SACAROSE E $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$



O modelo matemático dos efeitos relevantes para este planejamento ficou:

$$\text{Biomassa (g/l)} = - 7,1086 + 0,2098 [\text{sacarose}] - 0,0008 [\text{sacarose}]^2 + 0,0483 [\text{Na}_2\text{SeO}_3] - 0,0011 [\text{Na}_2\text{SeO}_3]^2 + 1,9744 [\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}] - 0,7875 [\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]^2$$

onde [sacarose] e $[\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$ são as concentrações em g/l e $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$ em mg/l.

As melhores concentrações dos nutrientes, obtidas ao final destes delineamentos, para a produção de biomassa ficaram em: 120 g/l de sacarose, 1,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 2,0 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 mg/l de Na_2SeO_3 e 3 g/l de KH_2PO_4 .

4.3 ESTUDO DAS VARIÁVEIS RELAÇÃO C:N E Na_2SeO_3 NA PRODUÇÃO DE Se_{org} . E Se_T NA BIOMASSA DE LEVEDURA

4.3.1 Resultado do Planejamento 3^{2-0} para a Produção de Se_{org} .

O presente planejamento fatorial completo teve por objetivo estudar a influência da relação C:N e da concentração de selenito de sódio na produção de selênio orgânico pela levedura, como também a influência deles na quantidade total de selênio inter-celular na levedura e na produção de biomassa. Os valores decodificados dos fatores utilizados em cada ensaio deste experimento, assim como os resultados obtidos para as variáveis respostas estão na Tabela 19.

TABELA 19 - PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *S. cerevisiae* COM Se_{org} .

| Ensaio | Fatores experimentais | | Variáveis de resposta | | | | |
|--------|-------------------------------------|----------------|-----------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|
| | Na_2SeO_3 (mg/l) | Relação C/N | Biomassa (g/l) | Se inorgânico ppm | Se total ppm | Se orgânico ppm | % de Se orgânico |
| 1 | 10 | 20 | 8,207 | 483,76 | 513,00 | 29,24 | 5,70 |
| 2 | 10 | 60 | 9,382 | 417,31 | 497,85 | 80,54 | 16,18 |
| 3 | 10 | 100 | 9,104 | 370,05 | 478,12 | 108,07 | 22,60 |
| 4 | 25 | 20 | 7,931 | 642,10 | 731,99 | 89,89 | 12,28 |
| 5 | 25 | 60 | 9,030 | 652,86 | 777,05 | 124,19 | 15,98 |
| 6 | 25 | 100 | 9,004 | 385,28 | 745,90 | 360,62 | 48,35 |
| 7 | 40 | 20 | 7,866 | 786,64 | 1119,36 | 332,72 | 29,72 |
| 8 | 40 | 60 | 8,765 | 993,60 | 1041,49 | 47,89 | 4,60 |
| 9 | 40 | 100 | 8,941 | 1035,90 | 1146,74 | 110,84 | 9,67 |
| 10 | 25 | 60 | 8,918 | 928,58 | 1082,60 | 154,01 | 14,23 |
| 11 | 25 | 60 | 8,906 | 862,80 | 999,39 | 136,60 | 13,67 |
| 12 | 25 | 60 | 8,921 | 867,55 | 1022,66 | 155,11 | 15,17 |

Neste terceiro planejamento experimental, foram utilizadas as concentrações dos nutrientes encontradas nos experimentos anteriores, tanto no preparo do meio

de cultivo do inóculo como no preparo do meio de cultivo de enriquecimento com selênio, sendo estas concentrações iguais a: 1,2 g/l de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 120 g/l de sacarose, 3 g/l de KH_2PO_4 ; e 3 g/l de $(NH_4)_2SO_4$ no meio de cultivo do inóculo. Os valores dos três níveis da relação C:N de 100, 60 e 20 no meio de cultivo de enriquecimento com selênio foram obtidos respectivamente nesta ordem mantendo-se fixo a concentração de sacarose em 120 g/l e utilizando concentrações de $(NH_4)_2SO_4$ de 2,4, 4,0 e 12,0 g/l.

Os valores das colunas referentes às variáveis de resposta Se inorgânico e Se total na Tabela 19, diz respeito aos teores de Se determinados na biomassa pelo sistema de espectrofotometria de absorção atômica e geração de hidreto, sendo que para a determinação do Se inorgânico foi feita uma digestão sólida de 0,200 g de amostra com ácido nítrico 70% e ácido clorídrico 37%, e para a determinação do Se total foi feita uma digestão sólida de 0,200 g de amostra com ácido nítrico 70% + peróxido de hidrogênio 30% e ácido clorídrico 37%. A variável de resposta teor de Se orgânico foi obtida por diferença entre o teor de Se inorgânico e teor de Se total determinados na amostra. Foi feito um branco também, onde o selênio não foi detectado.

4.3.1.1 Variável dependente: biomassa produzida

Conforme o Diagrama de Pareto mostrado na Figura 15, tiveram efeito significativo para um $p \leq 0,05$, na produção da biomassa, o termo linear e quadrático do fator relação C:N, ambos de valor positivo, o termo linear do fator selenito de sódio, de valor negativo, e o termo da interação do selenito de sódio linear com a relação C:N quadrática, também negativo. Assim, a biomassa produzida mostrou estar relacionada em uma forma não linear com o fator C:N e tendo o seu máximo quando o fator C:N é ajustado no seu nível superior e o fator selenito de sódio no seu valor inferior.

Através das curvas de contorno, Figura 16, é observado que a região de maior produção de biomassa é a região vermelho escuro, onde se obtém aproximadamente 9,2 g/l de biomassa. Ela está compreendida entre valores de 60:1 a 95:1 para a relação C:N e de 10 a aproximadamente 17 mg/l para a concentração de Na_2SeO_3 .

FIGURA 15 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA BIOMASSA

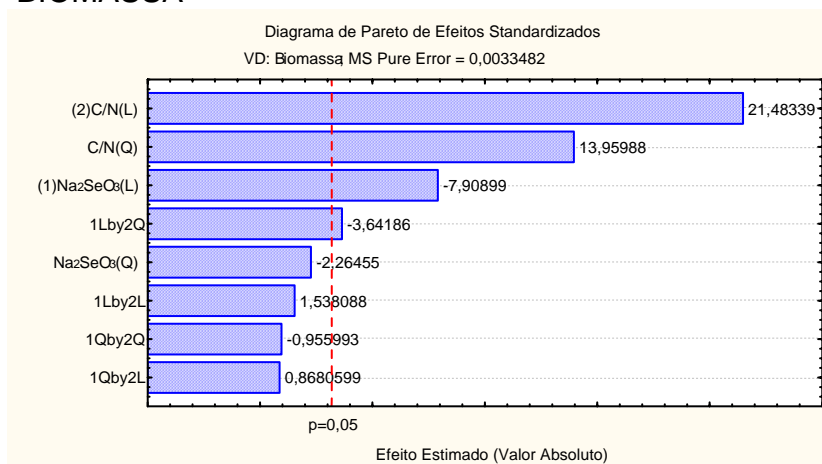
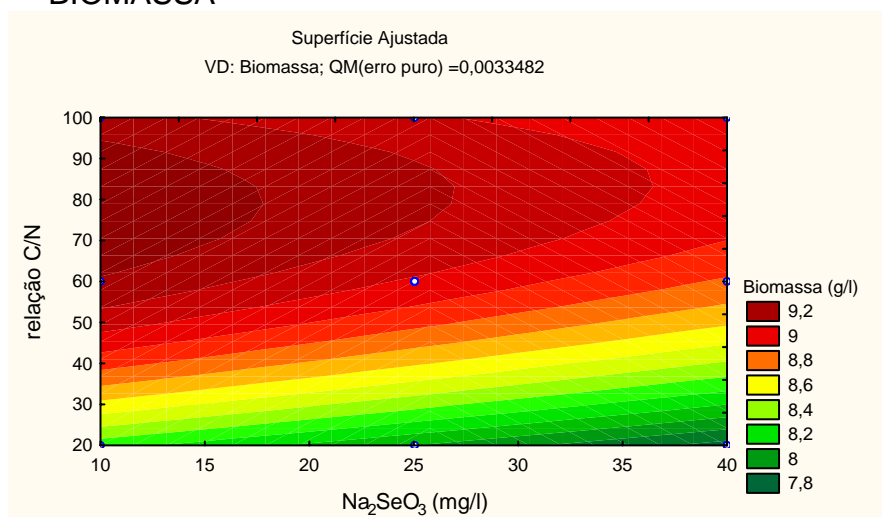


FIGURA 16 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA BIOMASSA



Observa-se também que com a concentração de Na_2SeO_3 no seu nível inferior e no seu nível superior a variação na resposta biomassa é de 8,7% e de 13,33%. E ao variar a relação C:N da faixa laranja à faixa vermelho escuro resulta em uma variação na resposta biomassa de 5% e de 11,36% para a concentração de Na_2SeO_3 no seu nível inferior e superior nesta ordem.

Devido ao fato que para regular a relação C:N, a concentração de açúcar foi mantida constante e variou-se a relação de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pode-se afirmar que o melhor resultado obtido para a resposta biomassa foi utilizando-se a menor concentração de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

O modelo matemático dos efeitos relevantes para este planejamento ficou:

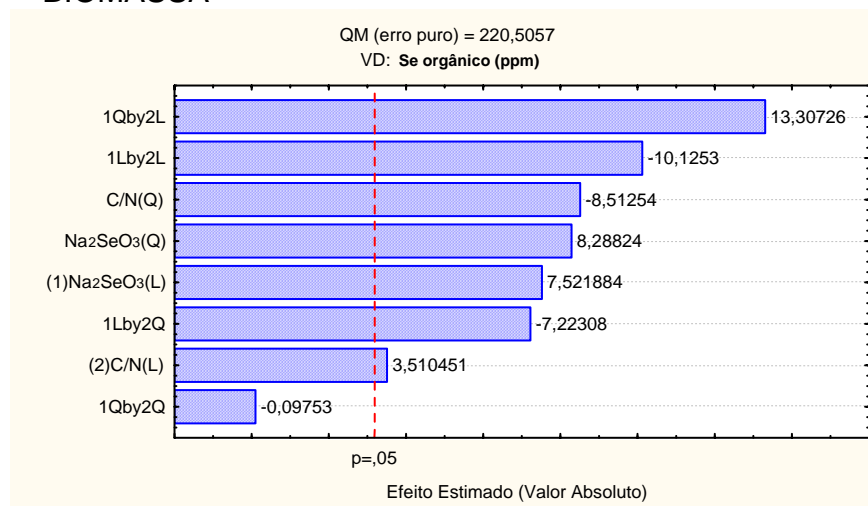
$$\text{Biomassa (g/l)} = 7,562479 - 0,016504[\text{Na}_2\text{SeO}_3] + 0,048550[\text{C:N}] - 0,000321[\text{C:N}]^2 + 0,000001[\text{Na}_2\text{SeO}_3][\text{C:N}]^2$$

onde $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$ é a concentração de selenito em mg/l e $[\text{C:N}]$ relação C:N.

4.3.1.2 Variável dependente: selênio orgânico intracelular

Conforme o Diagrama de Pareto mostrado na Figura 17, tiveram influência significativa para um $p \leq 0,05$, na produção de selênio orgânico, os efeitos linear e quadrático dos dois fatores, a interação entre o efeitos lineares e as interações entre os efeitos quadráticos e lineares dos dois fatores. Apenas a interação entre os efeitos quadráticos dos dois fatores não apresentaram significância estatística a um $p \leq 0,05$. O maior efeito significativo apresentado foi a interação do efeito quadrático do fator Na_2SeO_3 com o efeito linear do fator C:N, seguido pela interação entre os efeitos lineares dos dois fatores.

FIGURA 17 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA Se_{org} . NA BIOMASSA



Através das curvas de contorno para a produção de selênio orgânico, Figura 18, é possível visualizar as regiões de maior produção de selênio orgânico na biomassa de levedura. A maior produção de selênio orgânico foi obtida com o fator selenito ajustado no seu nível médio, 25 mg/l e o fator relação C:N ajustado no seu nível superior, 100:1, e também quando o fator selenito esteve no seu nível superior

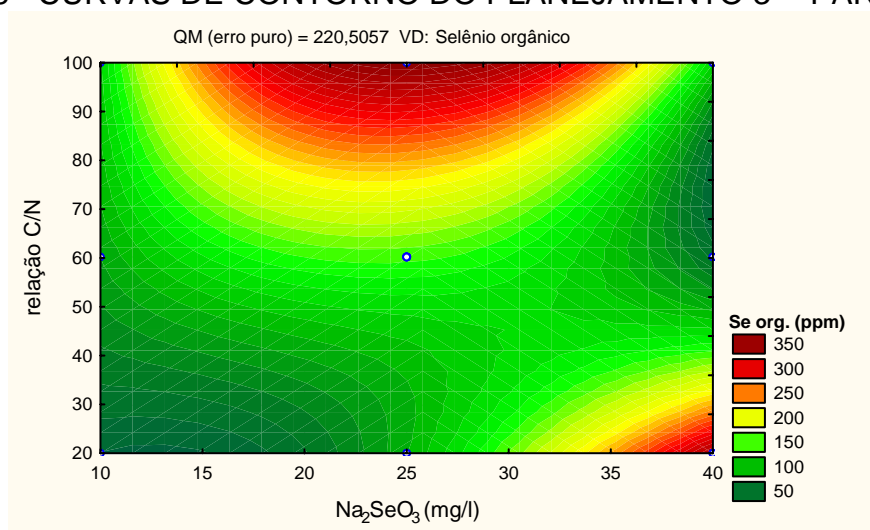
igual a 40, e o fator relação C:N no seu nível inferior igual a 20:1, conforme as regiões vermelhas escuras na Figura 18. Entretanto, esse segundo maior valor obtido para o $Se_{org.}$ foi duvidoso se levado em consideração um comportamento observado nos três níveis do fator selenito de sódio, onde houve um aumento de $Se_{org.}$ com o aumento da relação C:N. A única exceção a este comportamento foi o ensaio 7 da Tabela 19, o qual corresponde ao segundo maior valor obtido de $Se_{org.}$. Esse valor obtido pode ser atribuído a um erro experimental durante a análise, vindo a resultar num valor superestimado de $Se_{org.}$.

O modelo matemático ($R^2 = 0,99423$) dos efeitos relevantes para este planejamento ficou:

$$Se_{org.} \text{ (ppm)} = 108,094010 - 19,092354[Na_2SeO_3] + 0,789100[Na_2SeO_3]^2 + 0,101797[C:N] - 0,045577[C:N]^2 + 0,360990[Na_2SeO_3][C:N] + 0,003870[Na_2SeO_3][C:N]^2 - 0,019015[Na_2SeO_3]^2[C:N]$$

onde $[Na_2SeO_3]$ é a conc. de selenito em mg/l e $[C:N]$ é o valor da relação C:N.

FIGURA 18 - CURVAS DE CONTORNO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA $Se_{org.}$



4.3.1.3 Variável dependente: selênio total incorporado na biomassa

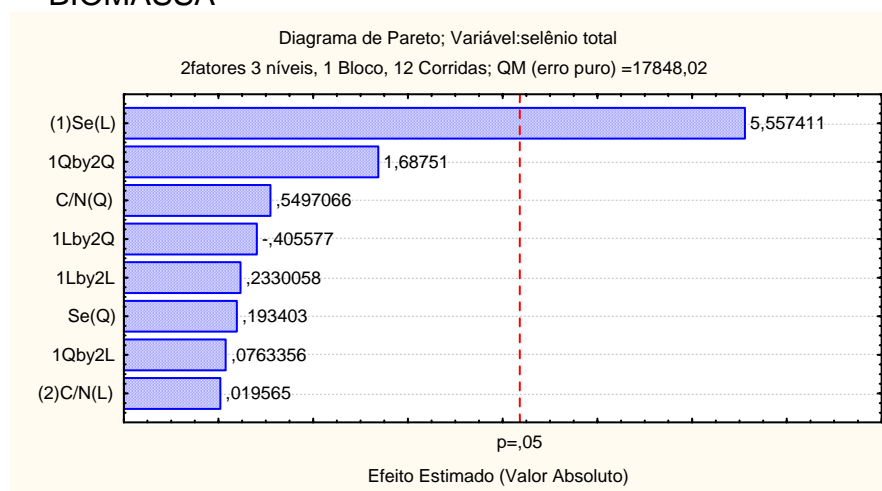
O Diagrama de Pareto obtido para a variável dependente selênio total incorporado na biomassa, Figura 19, mostra que a quantidade de selênio total incorporado na biomassa está relacionado em uma forma linear positiva com o fator concentração de selenito de sódio adicionado no meio de cultivo, sendo seu efeito

significativo para um $p \leq 0,05$, enquanto que os demais efeitos não apresentaram significância em um $p \leq 0,05$. Isso significa que quando mais selenito de sódio adicionado no meio de cultivo, maior o teor de selênio total incorporado na biomassa. DE LEON et al. (2002), observou o mesmo comportamento em seus estudos, de enriquecimento de selênio em *Saccharomyces cerevisiae*, em quatro diferentes concentrações, e declarou que quando mais selênio é adicionado ao meio de cultivo, mais selênio é incorporado na levedura. Este efeito pode ser melhor observado através da Figura 20. O modelo matemático ($R^2 = 0,77713$) do efeito relevante na incorporação do selênio total na biomassa ficou:

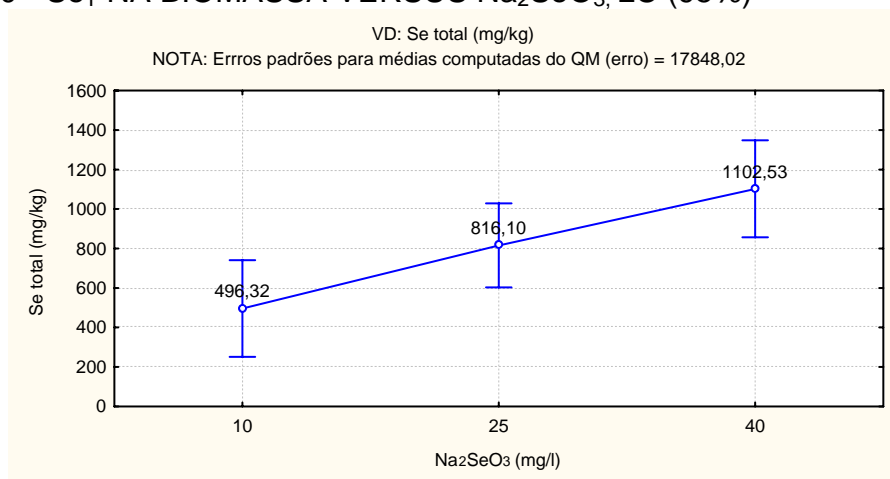
$$\text{Selênio total (ppm)} = 341,165764 + 20,206944[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$$

onde $[\text{Na}_2\text{SeO}_3]$ é a concentração de selenito de sódio em mg/l.

FIGURA 19 - DIAGRAMA DE PARETO DO PLANEJAMENTO 3^{2-0} PARA Se_T NA BIOMASSA



De acordo com a Figura 20, o meio de cultivo com 10 mg/l de selenito, resultou em uma biomassa contendo 496,32 mg de selênio total/kg de biomassa seca. Já, quando a concentração no meio foi de 25 mg/l de selenito, o teor de selênio total foi de 816,10 mg/kg de biomassa seca, e para uma concentração de 40 mg/l de selenito no meio de cultivo, obteve-se 1102,53 mg de selênio total/kg de biomassa seca.

FIGURA 20 - Se_T NA BIOMASSA VERSUS Na_2SeO_3 , LC (95%)

Estes valores são da mesma magnitude que os obtidos por Korhola et al. (1986), citados por (DEMIRCI & POMETTO, 1999), que relatou o desenvolvimento de levedura com 500 mg de Se/kg de biomassa seca, que os obtidos por NAGODAWITHANA et al. (1985), em fermentação fed-batch, com uma produção de levedura com selênio ligado organicamente com no mínimo 1000 mg de Se/kg de biomassa seca, também aos valores obtidos por SUHAJDA et al. (2000), que relatou o desenvolvimento de levedura com 1200-1400 mg de Se/kg de biomassa seca, e por último, os valores obtidos por DE LEÓN et al. (2002), que conseguiu uma produção de levedura com 1500-2124 mg de Se/kg de biomassa seca. Contudo, é importante destacar o fato de que cada autor utilizou-se de procedimentos diferentes para o enriquecimento, desde o uso de frascos de erlenmeyer até o uso de biorreatores de volume variado, como também desde o número diferente de lavagens das células para remoção parcial de selênio inorgânico adsorvido na biomassa até o uso de diferentes instrumentos para a dosagem de selênio. Neste trabalho foram repetidas 4 vezes a etapa de lavagem enquanto que DE LEÓN et al. (2002) repetiu 2 vezes a etapa de lavagem.

Cabe ainda ressaltar que se chegou a valores de 745 ppm de Se_T com quase 50% na forma de $Se_{org.}$ (Tabela 18), enquanto que altas concentrações de Se_T não garantiram necessariamente alto teor de $Se_{org.}$.

5 CONCLUSÃO

A melhor composição do meio de cultivo para o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em frascos de erlenmeyer de 250 ml foi igual a 1,2 g/l de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 120 g/l de sacarose, 3 g/l de KH_2PO_4 e 3 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Para a produção de biomassa de levedura selenizada (*Saccharomyces cerevisiae*) comestível, tendo alto teor de selênio intracelular, os dois fatores estudados, concentração de selenito de sódio e a relação C:N no meio de cultivo mostraram efeito significativo no nível de 5%.

O melhor resultado de biomassa enriquecida com selênio orgânico foi obtido em um meio de crescimento contendo 25 mg/l de selenito de sódio e uma relação C:N igual a 100 (12 Brix ou 120 g/l de sacarose, proveniente do açúcar mascavo, e 2,4 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), resultando em uma biomassa contendo 360,62 ppm de selênio orgânico. O segundo melhor resultado foi obtido em um meio preparado com 40 mg/l de selenito de sódio e uma relação C:N igual a 20 (12 Brix ou 120 g/l de sacarose e 12 g/l de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), resultando em 332,72 mg de selênio orgânico por quilograma de biomassa seca.

De acordo com os modelos obtidos pelo planejamento fatorial completo 3^{2-0} , 2 fatores e 3 níveis, trabalhando-se com uma relação C:N compreendida entre 90:1 a 100:1 e com Na_2SeO_3 em uma concentração de 20 e 30 mg/l, consegue-se obter torno de 9 gramas de biomassa por litro de meio de cultivo com 300 a 350 ppm de teor de selênio orgânico .

O modelo obtido para descrever a quantidade de selênio total incorporado na biomassa celular mostrou ser uma função linear positiva da concentração de selenito de sódio no meio de cultivo, ou seja, quanto maior a concentração de selenito de sódio no meio de cultivo, maior a quantidade de selênio total incorporado na biomassa celular. No experimento foram obtidos nesta ordem, 496,32, 816,10 e 1102,53 ppm de selênio total dosado na biomassa para 10, 25 e 40 mg/l de selenito de sódio adicionados no meio de cultivo.

6 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

- Fazer um “scale up” do bioprocesso em biorreator batelada nas condições otimizadas anteriormente.
- Testar com relação C:N superiores para ver o limite de produção de biomassa.
- Buscar outras metodologias menos dispendiosas, para dosagem de selênio orgânico.
- Fazer análise de especiação de selênio para verificar a presença de L-selenometionina.
- Testar outros microorganismos assimiladores de selênio, como algas, bactérias e cogumelos.
- Obtenção de leveduras mutantes assimiladoras de selênio;
- Estudar a influência da quantidade de enxofre no meio de cultivo na produção de selênio orgânico.
- Estudar a assimilação de selênio a partir de levedura já enriquecida com selênio.

REFERÊNCIAS

- ANTONINI, S. R. C. Métodos de análises e monitoramento microbiológico em laboratório de destilaria. Depto. Tecnologia Agroindustrial e Sócio-Economia Rural Centro de Ciências Agrárias – Campus de Araras, 2004.
- ARIKAN BETÜL; TUNÇAY M.; APAK R. Sensitivity enhancement of methylene blue catalytic-spectrophotometric method of selenium (IV) determination by CTAB. *Analytica Chimica Acta*, 335, p. 155-167, 1996.
- BEACH, M. L. Determination of As, Sb and Se in difficult environmental samples by hydride generation. *Varian Instruments at Work*. AA-105. February 1992
- BORZANI, W.; AQUARONE, E.; LIMA, U. A. Engenharia bioquímica. Série Biotecnologia. São Paulo: Edgard Blücher, 3. Reimpressão, 1988. 300p. V.3.
- CARVALHO, M. K.; WILLIAMNS, G. T. M.; BENSON, F.R.; MARTIN, F. D. Effects of selenium supplementation on four agricultural crops. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 704-709, 2003.
- CHASSAIGNE, H; CHÉRY C.C; BORDIN, G.; RODRIGUEZ, A. R. Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material. *Journal of Chromatography A*, 976, p. 409-422, 2002.
- COZZOLINO, S. M.F. biodisponibilidade de nutrientes. Barueri, SP: Manole, 2005.
- DE LEON, C. A. P.; BAYON, M.M. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: A study of different incorporation methods. *Journal of Applied Microbiology*, 92 (4), p. 602-610, 2002.
- DEMIRCI, Ali; POMETTO III, ANTONY. Production of Organically Bound Selenium Yeast by Continuous Fermentation. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 47, p. 2491-2495, 1999.
- DEMIRCI, Ali; POMETTO III, ANTONY. Production of Organically Bound Selenium Yeast by Fed -Batch Fermentation. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 47, p. 2496-2500, 1999.
- ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J. L. Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul: EducS, 2004.
- FERREIRA, E. M.F.C. Identificação e controlo adaptativo de processos biotecnológicos. Porto, 1995. 299f. Tese (Doutoramento em Engenharia

- Química), Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto.
- FERREIRA, W.F.C.; SOUSA, J.C.F. de. (Coord.). Microbiologia. Lisboa: Lidel, 1998. V.1.
- FURCO, M. A. Produção de biomassa de levedura em destilarias de álcool. "Workshop" - Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal. ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, 28 de Agosto de 1996.
- GILON, N.; POTIN-GAUTIER, M.; ASTRUC, M. Optimization of the determination of inorganic and organic selenium species using high-performance liquid chromatography-electrothermal atomic absorption spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 750, p:327-334, 1996.
- GÓMEZ-ARIZA, J.L.; CARO DE LA TORRE, M.A.; GIRÁLDEZ I.; MORALES.E. Speciation analysis of selenium compounds in yeasts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-microwave-assisted digestion-hidride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 524, p:305-314, 2004.
- HSIA, H.S.; YANG, P.; ARNOLD, M. Dietary supplementation with, and methods for administration of yeast-derived selenium product. US. Patent 6,197,295 B1, 2001.
- IRION, C. W. Growing alliums and brassicas in selenium-enriched soils increases their anticarcinogenic potentials. *Medical Hypotheses*, 53(3), p:232-235, 1999.
- LACAZ, C. da S. Guia para identificação: fungos actinomicetos algas de interesse médico. São Paulo: Sarvier, 1998. 445 p.
- LEE, J.D. Química Inorgânica não tão Concisa. Edgard Blücher, 5^a edição, 1999, 527p.
- LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W; SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial. Fundamentos. v.1 São Paulo: Edgard Blücher, 1^a edição, 2001, 254p.
- MELLOR, J.W. Química Inorgânica Moderna. Editora Globo, 3^a edição, 1955, p.919, 920.
- MOO-YOUNG, M. Comprehensive biotechnology: the principles, applications and regulations of biotechnology in industry, agriculture and medicine. Pergamon Press Ltd. v.1, 1985.

- NAGODAWITHANA, T.; GUTMANIS, F. Method for the production of selenium yeast. US. Patent 4,530,846, 1985.
- NELSON, N. A fotometric adaptation of Somogyi method for determination of glucose. J. Biol. Chem., v. 153, p. 375-80, 1944.
- OLIVEIRA, C. S. et al. Bioquímica na Cozinha. Curso de verão. Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Pró-Reitoria de Cultura e Extensão. Universidade de São Paulo, Janeiro de 2005.
- PEIXOTO, N. Processamento de produtos de biomassa de levedura para alimentação humana: potencial, mercado interno e externo. "Workshop" - Produção de biomassa de levedura: Utilização em alimentação humana e animal. ITAL, Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, SP, 28 de Agosto de 1996.
- PHILIPPI, S.T. Tabela de Composição de Alimentos: Suporte para decisão nutricional. Editora Coronário, 2ª ed - São Paulo, 2002.
- RATLEDGE, C.; KRISTIANSEN, B. Basic Biotechnology. United Kingdom: Cambridge University Press, second edition, 2001.
- REHM, H.J., REED, G., PÜHLER, A. & STADLER, P. *Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise*, 2ª ed. Vol.9, Enzymes, biomass, food and feed, ed. By G. Reed and T.W. Nagodawithana. 1995. Cap. 5. Production of Microbial Biomass.
- RIJ, N.J.W. KREGER-VAN. The Yeast: a taxonomic study. 3th ed. Amsterdam: Elsevier Science, 1984.
- ROSE, A. Chemical microbiology. 3ª ed., Plenum Press, New York, 1976.
- SECHINATO, A.S. Efeito da suplementação dietética com micro-minerais orgânicos na produção e qualidade de ovos de galinhas poedeiras. 2003. 68f. Dissertação (Mestrado em Nutrição Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2003.
- SILVA, R. N.; MONTEIRO, V. N.; ALCANFOR, J. D.X.; ASSIS, E.M.; ASQUIERI E.R. Comparação de métodos para a determinação de açúcares redutores e totais em mel. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, 23(3):337-341, set-dez. 2003.
- STEHLIK-TOMAS, V; ZETIC V. G.; STANZER D.;GRBA S.; VAHCIC N. Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Food Technol. Biotechnol. 42(2):115-120, 2004.

- SUHAJDA, A.; HEGÓCZKI, J.; JANZSÓ, B.; PAIS, I.; VERECZKEY G. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 14, p.43-47, April 2000.
- TAPIERO, H. et all. The antioxidant role of selenium and seleno-compounds, *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 57, p. 134-144, 2003.
- TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review, *Toxicology Letters*, 137, p. 103-110, 2003.
- VINSON, J. A.; STELLA, J. M.; FLANAGAN, T. J. Selenium yeast is an effective *in vitro and in vivo* antioxidant and hypolipemic agent in normal hamsters. *Nutrition Research*. Vol. 18, No. 4. pp. 735-742,1998.
- WELZ, B.; MELCHER, M. Determination of selenium in human body fluids by hydride-generation atomic absorption spectrometry. Optimization of sample decomposition. *Analytica Chimica Acta*, 165, p. 131-140, 1984.
- WOICIECHOWSKI, A. L. Bioconversão de hidrolisado hemicelulósico de *Pinus taeda* obtido pelo processo de explosão a vapor, na produção de ácido L(+) láctico pelo fungo *Rhizopus oryzae*. Curitiba, 1997. 101 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Química) – Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná.