**EFEITO DO SELENITO NO CULTIVO DESCONTÍNUO
DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*,
PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS DE H₂S**

FABIO PATRIK PEREIRA DE FREITAS
Engenheiro Agrônomo

Orientador: Prof. **LUIZ CARLOS BASSO**

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Agronomia, Área de Concentração: Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Julho - 2002

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP

Freitas, Fabio Patrik Pereira de

Efeito do selenito no cultivo descontínuo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, produtoras e não produtoras de H₂S / Fabio Patrik Pereira de Freitas. - - Piracicaba, 2002.

82 p.

Dissertação (mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2002.
Bibliografia.

1. Levedura 2. Meio de cultura 3. Microbiologia agrícola 4. Nutrição 5. Selênio I.
Título

CDD 589.23

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

Ao meu pai Antonio, e em especial à minha mãe Ivone, agradeço pelo apoio, incentivo e dedicação, em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Basso, pela oportunidade e orientação

Ao prof. Dr. Virgílio F. do Nascimento, pela realização da determinação do teor de selênio em leveduras;

Ao prof. Andreas Karoly Gombert, do Departamento de Engenharia Química da Escola Politécnica da USP, pelas sugestões e auxílio;

A CAPES, pela concessão da bolsa de estudos.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE QUADROS.....	ix
RESUMO.....	x
SUMMARY.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	3
2.1 Selênio.....	3
2.1.1 Selênio na nutrição humana e animal.....	7
2.2 Leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	11
2.2.1 Composição química de leveduras sob o ponto de vista nutricional.....	11
2.2.2 Enxofre em leveduras <i>S. cerevisiae</i>	13
2.2.3 Selênio em leveduras <i>S. cerevisiae</i>	20
2.3 Cultivo de microrganismos.....	27
2.4 Curva de crescimento de microrganismos.....	29
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1 Microrganismos.....	33
3.1.1 Caracterização de linhagens produtoras e não produtoras de H ₂ S.....	33
3.1.2 Preparo do inóculo.....	34
3.2 Meios de Cultura.....	35
3.2.1 Preparo do meio bismuto sulfito agar (BSA).....	35
3.2.2 Preparo do meio de extrato de levedura, peptona e dextrose (YEPD).....	35
3.2.3 Preparo do meio de melaço para produção do inóculo e para os	

ensaios de cultivo descontínuo.....	36
3.3 Ensaio de cultivo celular descontínuo.....	36
3.3.1 Condução dos ensaios de cultivo celular descontínuo.....	37
3.3.2 Encerramento dos ensaios de cultivo descontínuo.....	38
3.4 Metodologia analítica.....	38
3.4.1 Determinação da concentração celular (X).....	38
3.4.1.1 Reta padrão.....	38
3.4.2 Análises na biomassa produzida.....	40
3.4.2.1 Determinação da viabilidade e da taxa de brotamento celular..	40
3.4.2.2 Determinação da biomassa produzida.....	41
3.4.2.3 Determinação da concentração de selênio na matéria seca.....	41
3.4.3 Análises no meio fermentado delevurado.....	42
3.4.3.1 Determinação da concentração de etanol no meio fermentado..	42
3.4.3.2 Determinação do pH.....	42
3.5 Tratamento dos resultados.....	43
3.5.1 Cálculo das velocidades específicas de crescimento celular (μ)....	43
4 RESULTADOS.....	44
4.1 Curvas de crescimento, e de velocidades específicas de crescimento celular (μ), no decorrer do cultivo descontínuo.....	44
4.1.1 Cultivo descontínuo da linhagem Fleischmann.....	44
4.1.2 Cultivo descontínuo da linhagem PE-2.....	46
4.1.3 Cultivo descontínuo da linhagem KD1-88.....	48
4.1.4 Cultivo descontínuo da linhagem KI.....	50
4.2 Resultados das análises na biomassa produzida e no meio fermentado.....	52
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÕES.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
APÊNDICE.....	79

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Reações de óxido redução do selênio. Valores de potencial de óxido redução (E^0) em eletron-volts (eV).....	4
2 Seqüência de reações envolvidas na redução do sulfato a sulfeto em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
3 Via de transulfuração, com a incorporação do sulfeto em esqueleto de 3 e 4 carbonos.....	17
4 Via de transulfuração em <i>S. cerevisiae</i> , que envolve a incorporação do sulfeto apenas em esqueleto de 4 carbonos.....	18
5 Exemplo típico de curva de crescimento de microrganismos, cultivados em sistema descontínuo.....	30
6 Representação esquemática da preparação do inóculo para os ensaios de cultivo celular descontínuo.....	35
7 Representação esquemática do procedimento de elaboração da reta-padrão.....	39
8 Reta padrão, equação da reta, e coeficiente r^2 , utilizados na determinação da concentração celular, durante o ensaio de cultivo da linhagem Fleischmann.....	40
9 Curvas de crescimento da linhagem Fleischmann, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	45
10 Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ) da linhagem Fleischmann, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	46
11 Curvas de crescimento da linhagem PE-2, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	47

12	Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ) da linhagem PE-2, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	48
13	Curva de crescimento da linhagem KD1-88, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	49
14	Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ) da linhagem KD1-88, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	50
15	Curva de crescimento da linhagem KI, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	51
16	Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ), da linhagem KI, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.....	52
17	Biomassa úmida (g), ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.....	53
18	Concentração de selênio na matéria seca (mg.Kg^{-1}), ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.....	53
19	Viabilidade celular (%), ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.....	54
20	Taxa de brotamento celular (%), ao final do cultivo descontínuo da linhagem KD1-88 a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.....	55
21	Teor alcoólico no meio fermentado (% v/v), ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.....	55
22	pH no meio fermentado delevurado, ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.....	56

LISTA DE QUADROS

	Página
1 Tratamentos avaliados nos ensaios de cultivo celular.....	37
2 Resultados gerais das análises realizadas na biomassa produzida e no fermento delevurado, ao término do cultivo celular.....	81
3 Recomendação de ingestão diária de selênio, de acordo com idade e faixa etária.....	82

EFEITO DO SELENITO NO CULTIVO DESCONTÍNUO DE LEVEDURAS *Saccharomyces cerevisiae*, PRODUTORAS E NÃO PRODUTORAS DE H₂S

Autor: FABIO PATRIK PEREIRA DE FREITAS

Orientador: LUIZ CARLOS BASSO

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos avaliar o crescimento de linhagens comerciais de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, produtoras e não produtoras de H₂S, cultivadas em meio contendo diferentes teores de selenito de sódio. O trabalho consistiu em 4 ensaios de cultivo descontínuo independentes, nos quais avaliou-se os efeitos de teores de 40 e 80 mg de selenito de sódio por litro de meio. Inoculou-se 5 mL de suspensão celular 1% em erlenmeyer contendo 200 mL de meio de melaço com 6% de ART e suplementado com sais (pH inicial 4,0), que foram incubados em agitador a 120 rpm e 30° C por 18 ou 21 h. Retirou-se amostras nos tempos 0; 3; 6; 9; 12; 15; 18 e 21 h para leitura de absorbância em espectrofotômetro a 660 nm. Ao final de cada ensaio, quantificou-se a concentração de selênio na matéria seca, a viabilidade celular e a taxa de brotamento da levedura. No meio delevurado, determinou-se o pH e o teor alcoólico. Os

resultados obtidos revelaram que as linhagens produtoras de H_2S não foram afetadas pelos teores de selenito de sódio avaliados, e apresentaram maior produção de biomassa, etanol, crescimento celular mais rápido, demonstrando maior tolerância ao selenito. As linhagens não produtoras de H_2S tiveram o crescimento celular, a produção de biomassa final e de etanol reduzidos pelo selenito. A taxa de brotamento celular apresentou redução, tanto nas linhagens produtoras, quanto nas linhagens não produtoras de H_2S . O maior nível de selênio na biomassa foi ao redor de 7500 mg.Kg^{-1} de matéria seca, mas a característica de produção de H_2S não afetou o acúmulo de selênio.

**EFFECT OF SELENITE IN DESCONTINUOUS
CULTIVATION OF YEAST *Saccharomyces cerevisiae*
STRAINS, PRODUCING AND NO PRODUCING H₂S**

Author: FABIO PATRIK PEREIRA DE FREITAS

Adviser: LUIZ CARLOS BASSO

SUMMARY

The aim of this work was to evaluate the growth of some commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* producing and no producing H₂S, cultivated in molasses media containing 0, 40 and 80 mg of selenite per litre, with 3 replicates for each treatment. Four independent batch growth essays with different yeast strains were realized. Nine 250 mL erlenmeyer flasks containing 200 mL molasses media with 6% TRS (total reducing sugar) were inoculated with 5 mL of 1% yeast cell suspension, and incubated at 30°C and 120 rpm. Aliquots of 0,5 mL were withdrawn during growth (0; 3; 6; 9; 12; 15; 18 and 21 h for biomass measurements using a spectrophotometer at 660 nm. At the end of each essay, the fresh biomass, cellular viability, budding rate, ethanol concentration and pH in fermented media were evaluated. Results shown that growth rate and biomass were not affected by selenite in H₂S producing strains. However, H₂S no producing strains presented a decrease in growth, final biomass and

ethanol yield, in the presence of selenite. Selenite decreased budding rate in both producing and no producing H₂S strains. Selenium level in biomass was around 7500 mg.Kg⁻¹ (dry weight), and there is not effect of H₂S production ability on selenium accumulation.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor mundial de etanol, e na safra 1999-2000, produziu 12.851.362 m³ desse combustível (Jornalcana, 2001). Considerando que o rendimento em biomassa de leveduras em destilarias onde realiza-se sangria de 5%, varia de 20 a 30 kg de matéria seca por m³ de álcool produzido (Butolo, 1997), estima-se uma produção total de 321.284 toneladas de levedura seca nesse período. O excedente de biomassa que não é reutilizada no processo fermentativo, é em alguns casos removida, inativada por termólise, seca, e utilizada na confecção de ração animal, como fonte de proteínas e de vitaminas do complexo B.

Devido ao fato da levedura seca apresentar custo superior em relação as outras fontes protéicas, como farelo de soja, algodão, amendoim e girassol (Machado, 1997), aos elevados teores de ácido úrico, e deficiência em alguns aminoácidos essenciais na biomassa (Sarwar et al., 1985), torna-se desinteressante seu emprego na formulação de rações como única fonte protéica.

O uso de leveduras como fonte dietética de selênio é uma interessante alternativa de utilização dessa biomassa, pois quando esses microrganismos são cultivados na presença de selenito, obtém-se biomassa com elevadas concentrações de selênio. Essa biomassa pode ser fornecida para humanos e animais, com uma série de vantagens em relação às fontes inorgânicas de selênio. Devido a sua

comprovada importância terapêutica e preventiva de doenças ligadas ao estresse oxidativo, o selênio vem sendo empregado na composição de medicamentos e dietas, principalmente na forma inorgânica, visando suprir a deficiência decorrente baixa ingestão desse elemento. É nesse contexto que se insere o presente trabalho, que teve por objetivos investigar o cultivo de linhagens comerciais da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, produtoras e não produtoras de H_2S , em meio contendo diferentes concentrações de selenito, visando a produção de leveduras com elevadas concentrações de selênio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Selênio

O selênio foi descoberto em 1818 por Berzelius e Gahn. Seu número atômico é 34. Está posicionado entre o enxofre e o telúrio no grupo VI da tabela periódica, no quarto período. Seu peso atômico é 78,96 (Paulmier, 1986). Apresenta-se em três formas alotrópicas distintas, incluindo selênio cinza, vermelho e preto. Ocorre na natureza principalmente em minérios associados ao sulfeto. Na forma elementar é um semiconductor. O alótropo cinza, uma forma sensível à luz, é usado em fotocélulas, em fotocopiadores, e em outras aplicações similares (Centro de divulgação científica e cultural, 2002).

O selênio é o 69° elemento em abundância na crosta terrestre, e o 29° na água do mar, onde ocorre numa concentração média de 0,09 mg. Kg⁻¹, e 0,004 mg.L⁻¹, respectivamente. Na faixa do pH fisiológico, e dentro do potencial óxido redutor (E^0) admitido pela água, somente Se^0 , SeO_3^{-2} , $HSeO_3^-$ e SeO_4^{-2} podem existir no equilíbrio termodinâmico (Milne, 1998). O selênio ocorre em vários estados de oxidação: 6⁺ em selenatos ($HSeO_4^-$; SeO_4^{2-}) e ácido selênico (H_2SeO_4); 4⁺ em selenitos ($HSeO_3^-$, SeO_3^{-2}) e ácido selenoso (H_2SeO_3); 0, como selênio elementar (Se^0); 2⁻, em selenetos (Se_2^{2-} , HSe^-), seleneto de hidrogênio (H_2Se), e selenetos orgânicos (R_2Se). O selênio também tende a formar espécies catenadas, como diselenetos orgânicos ($RSeSeR$) (Milne, 1998).

Por muito tempo omitiu-se as reações de óxido redução do seleneto (Nuttall & Allen, 1984b), pois o valor de $E^0 = -0,51V$, atribuído ao par selênio elementar/íon seleneto de hidrogênio, eram incorretos. Ao verificarem que, em meio ácido, o seleneto ($E^0 = -0,08V$) oxidava prontamente o ácido lipóico, mas não o ditioltreitol oxidado (DTT, $E^0 = -0,12V$), Nuttall & Allen (1984b) propuseram que o valor correto de E^0 do par selênio elementar/íon seleneto de hidrogênio, está entre o do ácido lipóico e do DTT oxidado, na faixa de $-0,12$ a $-0,08 V$. Na figura 1 estão apresentadas as reações de óxido redução do selênio em meio ácido e básico, e seus respectivos valores de E^0 .

Figura 1 - Reações de óxido redução do selênio. Valores de potencial de óxido redução (E^0) em eletrôn-volts (eV).

Enquanto o selênio quimicamente se assemelha ao enxofre, os selenóis, que são análogos aos tióis, se caracterizam por possuir menor E^0 , pois são facilmente oxidados. Por outro lado, o estado tetravalente do ácido selenoso (H_2SeO_3), é termodinamicamente mais estável que o ácido sulfuroso (H_2SO_3) (Kaim & Schwederski, 1994).

O comportamento paralelo de algumas formas análogas de selênio e enxofre em sistemas biológicos tem sido destacado na literatura, mas deve-se esclarecer que as propriedades químicas desses

elementos apresentam muitas diferenças. O selenato possui E^0 comparável ao cromato, e muito maior que o sulfato [E^0 ($\text{SeO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{SeO}_3$)=1,15V; E^0 ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}/\text{Cr}^{3+}$)=1,33V; E^0 ($\text{SO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{SO}_3$)=0,2V (potenciais padrão em soluções ácidas)], enquanto o seleneto é um agente redutor mais forte que o sulfeto [$E^0(\text{Se}^0/\text{H}_2\text{Se})=-0,36\text{V}$; $E^0(\text{S}^0/\text{H}_2\text{S})=0,14\text{V}$]. Apesar do seu E^0 , o selenato exibe considerável estabilidade na presença de agentes redutores (Milne, 1998).

As formas mais abundantes de selênio (selenato e selenito), tem pressão de vapor negligível nas condições ambientais, mas as formas reduzidas e metiladas de selênio são voláteis. Segundo Chasteen (1998), são cinco as formas voláteis de selênio identificadas : Seleneto de hidrogênio (H_2Se); dimetil selenil sulfeto ($\text{CH}_3\text{SeSCH}_3$); metanoselenol (CH_3SeH); dimetilseleneto ($(\text{CH}_3)_2\text{Se}$); e dimetildiseleneto ($\text{CH}_3\text{SeSeCH}_3$).

O H_2Se é um gás incolor, e prontamente solúvel em água ($\text{pK}_1=3,88$). Sua acidez é próxima a do ácido fórmico, e muito maior que a do H_2S ($\text{pK}_1=6,94$). É facilmente oxidado pelo oxigênio atmosférico, através da seguinte reação (Paulmier, 1986):

O H_2Se é venenoso, provoca irritação nas mucosas do nariz, olhos, e trato respiratório superior. É considerado 15 vezes mais perigoso que o H_2S (Paulmier, 1986). O íon seleneto de hidrogênio (HSe^-), também pode ser oxidado pelo O_2 atmosférico, através da seguinte reação (Nuttall & Allen, 1984a):

Essa reação exibe uma cinética complexa, incluindo a ocorrência de auto aceleração, e a formação de intermediários reativos, capazes de induzir reações entre outras substâncias presentes na solução. Soluções contendo níveis de seleneto superiores a 10^{-6} M, quando expostas ao O_2 atmosférico, são rapidamente oxidadas a uma suspensão coloidal, formada por polímeros insolúveis de selênio vermelho, em menos de três minutos (Nuttall & Allen, 1984a). O dimetilseleneto $((CH_3)_2Se)$ é um composto de alta volatilidade, que apresenta alta solubilidade em membranas celulares (Gadd, 1993), e é de 500-700 vezes menos tóxico que os íons selenito e selenato (Frankeberger & Karlson, 1994).

Em sistemas biológicos, o selênio ocorre mais comumente na forma de selenol ($R-SeH$), ou como selenocompostos, análogos ao enxofre em aminoácidos (Reddy & Massaro¹, citado por Czauderna et al., 1996a). Selenóis são ácidos mais fortes que tióis, e no pH fisiológico, ocorrem principalmente na forma aniônica ($R-Se^-$), constituindo-se em excelentes nucleófilos, ao passo que o grupo sulfidril ocorre principalmente na forma protonada (Nuttal & Allen, 1984a). Nessas condições, o selênio tende a se associar com cátions presentes no meio intracelular, podendo reduzir os efeitos nocivos causados por elementos tóxicos.

Devido a similaridade estrutural entre o selênio e o enxofre, e devido aos íons inorgânicos seleneto, selenito e selenato, análogos ao sulfeto, sulfito e sulfato, o selênio pode substituir o enxofre no metabolismo de leveduras. A intensidade em que o selênio substitui o enxofre, no entanto, é desconhecida (Korhola et al., 1986).

¹ REDDY, C.C.; MASSARO, E.J. Biochemistry of selenium: a brief overview. **Fundamental Applied Toxicology**, v.3, p.431, 1983.

2.1.1 Selênio na nutrição humana e animal

A descoberta da essencialidade do selênio na dieta se deu através do uso de leveduras na alimentação. Gyorgy² et al., citados por Gitler et al. (1957), reportaram que o uso de leveduras de panificação de origem inglesa na dieta, induziu a ocorrência de massiva necrose hepática em ratos, o que não ocorria quando leveduras de cervejaria de origem americana eram utilizadas.

Schwartz^{3,4}, citado por Gitler et al. (1957), não encontrou efeito do gênero de levedura na indução de necrose hepática em ratos, ao avaliar os efeitos causados pela ingestão de leveduras dos gêneros *Candida* e *Saccharomyces*. Schwartz⁴, citado por Gitler et al. (1957), atribuiu a ausência de necrose hepática à presença de um dado fator protetor em leveduras não necrogênicas, denominado fator 3. Gitler et al. (1957) demonstraram que o potencial necrótico de *C. utilis* e *S. cerevisiae*, podia variar com a composição do meio de cultura utilizado, e que a ingestão conjunta de vitamina E e aminoácidos sulfurados prevenia a ocorrência desse tipo de distúrbio. O fator protetor contra a necrose hepática, ou seu precursor essencial, vinha do meio de cultura, sendo que o mosto de cervejaria era considerado uma boa fonte, mas os meios sintéticos e o licor de sulfito eram deficientes nessa substância.

² GYORGY, P.; ROSE, C.S.; TOMARELLI, R.M.; GOLDBLATT, H. Yeast in the production of dietary massive necrosis in rats. **Ibid.**, v.41, p.265, 1950.

³ SCHUARTZ, K. Production of dietary necrotic liver degeneration using American torula yeast. **Proceedings of Society in Exploratory Medicine and Biology**, v.77, p.818, 1951a.

⁴ SCHWARTZ, K. A hitherto unrecognized factor against necrotic liver degeneration in American yeast (Factor 3). **Ibid.**, v.78, p.852, 1951b.

Schwartz & Foltz (1957) finalmente identificaram o fator 3 como sendo uma forma de selênio orgânico, devido a sua eficiência na prevenção da necrose hepática em ratos alimentados com leveduras do gênero *Candida*. Kelleher et al. (1957) verificaram que leveduras cultivadas em meio contendo selênio, prolongavam a vida de ratos submetidos a uma dieta necrótica, entretanto, não indicaram se esse efeito era devido ao selênio orgânico (fator 3), ou selênio inorgânico. Rações a base de leveduras contendo níveis de 30 µg de selênio por Kg, proporcionaram proteção total, enquanto que ao nível de 15 µg.Kg⁻¹, a proteção foi apenas parcial.

Tendo estabelecido o selênio como elemento essencial na dieta humana e animal, Schwarz & Foltz (1957) relataram a ocorrência de selênio no sítio ativo da enzima glutathiona peroxidase (GHS-Px).

O selênio atua como grupo prostético da enzima GHS-Px, catalisando a destruição do H₂O₂ plasmático e celular, protegendo a membrana celular e subcelular contra oxidação pelos peróxidos. A enzima GHS-Px protege as células vermelhas do sangue, membranas celulares e componentes intracelulares, contra indesejáveis reações com peróxidos solúveis (Rotruck et al., 1973).

Bronzetti et al. (2001) verificaram que baixas concentrações de selenito de sódio e selenometionina, tem efeito antimutagênico em *S. cerevisiae*. O efeito antimutagênico, observado nas fases de crescimento exponencial e estacionária, foi acompanhado por aumento significativo na atividade das enzimas GHS-Px, catalase, e superóxido dismutase. Os selenocompostos atuam como antioxidantes em baixas concentrações, e estão envolvidos em diferentes fases da desintoxicação celular, causada pelos radicais livres. A adição de 0,01 e 0,1 µM de selenito em cultivo de leveduras expostas ao PH, fez com que a ocorrência de conversões mitóticas e mutações pontuais, fossem

reduzidas em duas e sete vezes, respectivamente, acompanhadas de notável recuperação na viabilidade celular (Bronzetti et al., 2001). A selenometionina também reduziu o efeito tóxico causado pelo PH em leveduras na fase estacionária, e na fase exponencial, reduziu a incidência de conversões mitóticas, mutações pontuais, e proporcionou recuperação total da viabilidade celular (Bronzetti et al., 2001).

O selênio também é componente da enzima tetraiodotironina 5 deiodinase, requerida na produção do princípio ativo do hormônio tireóide triiodotironina T3 (Beckett et al, 1987). A tetraiodotironina 5 deiodinase, converte o pró-hormônio tiroxina, no hormônio biologicamente ativo triiodotironina, etapa essencial no metabolismo de hormônios da tireóide (Arthur et al, 1990). Doenças oriundas de deficiências severas de selênio, podem ocorrer quando a ingestão diária desse elemento é inferior à recomendada.

Em 1980, a *National Academy of Sciences*, estabeleceu que a quantidade adequada de selênio a ser ingerida na dieta, está na faixa de 50-200 $\mu\text{g} \cdot \text{dia}^{-1}$. Posteriormente, a *Food and Drug Administration* (FDA) aprovou o uso de selenito e selenato de sódio na suplementação de ração animal, numa concentração de 3 mg de selênio por Kg (Reilly, 1994). As recomendações de ingestão diária de selênio pela *Dietary Reference Intake* (DRI, 2000), encontram-se no apêndice.

Jacob et al. (1998a) relataram o envolvimento de selênio no metabolismo e regulação da disponibilidade de zinco no organismo, ao verificar que a droga ebselen (2 fenil 1,2 benzisoselenazol 3(2H)) realiza papel similar à cisteína no sítio ativo da enzima glutathiona peroxidase, e reage com a metalotionina e outros sítios coordenados zinco/enxofre, para liberar o zinco. Essa função deriva dos grupos tiól da cisteína, aonde se formam aglomerados de zinco. Os ligantes tiól são unidades coordenadas que reagem com dissulfetos, sais de selênio e

selenocistamina, através de um mecanismo óxido redutor, provocando a liberação do zinco (Maret & Vallee, 1998). Esta alta reatividade e comportamento óxido redutor dos selenocompostos em relação aos tióis, são verificadas principalmente quando o tiól está ligado ao zinco. O ebselen reage estequiometricamente com as 20 cisteínas presentes na metalotionina. Jacob et al. (1998a) estudaram também a enzima álcool desidrogenase de leveduras, que contem 2 átomos de zinco em cada uma das quatro subunidades, e verificaram a liberação do zinco pelo ebselen. A atividade dessa enzima, no entanto, caiu 40% em relação à enzima íntegra.

Os selenocompostos são mais eficientes na liberação do zinco a partir da metalotionina, que concentrações equimolares de seus análogos sulfurados, pois são requeridas concentrações de selênio muito menores para realizar a mesma função (Jacob et al. 1998b). Devido a seu papel antioxidante, o selênio tem reconhecido efeito protetor contra o câncer (Ip, 1986), e exerce efeito marcante na sobrevivência de portadores do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) (Baum, 1997).

A suplementação nutricional com selênio, geralmente resulta em elevação dos níveis séricos desse elemento, e pode ser efetuada por meio de compostos orgânicos e inorgânicos. A toxicidade e biodisponibilidade desses compostos, são importantes critérios na seleção de uma fonte de selênio adequada para a suplementação humana e animal. As formas inorgânicas de selênio utilizadas em suplementação nutricional, representadas por sais como selenito (Na_2SeO_3) e selenato de sódio (Na_2SeO_4), não são tão biodisponíveis quanto o selênio na forma orgânica, e apresentam tempo de retenção inferior no organismo (Yoshida et al. 1999). Segundo Bronzetti et al. (2001), são necessários níveis mais elevados de selenometionina para

causar efeito tóxico em leveduras equivalente ao selenito. As selenoleveduras, principais representantes dos suplementos orgânicos de selênio, são cultivadas em meio de cultura acrescidos de selênio, onde a selenometionina é o principal composto orgânico de selênio presente nesse produto (Korhola et al. 1986).

2.2 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

2.2.1 Composição química de leveduras sob o ponto de vista nutricional

Uma célula de *S. cerevisiae* tem em média de 5 a 10 μm de diâmetro, e pesa cerca de 25 picogramas (Korhola et al., 1986). Quanto a composição química, o enxofre é o 7º elemento mais abundante em *S. cerevisiae*, depois do carbono, oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, potássio e fósforo, e ocorre numa concentração média de $3,6 \text{ g.Kg}^{-1}$ de matéria seca. O selênio ocorre numa concentração media de apenas $40 \mu\text{g.Kg}^{-1}$ de matéria seca. O nível celular de selênio pode ser aumentado para 500 mg.Kg^{-1} de matéria seca, através da adição de selênio ao meio de cultura (Korhola et al., 1986).

Com relação a outros compostos de interesse nutricional, as leveduras são fonte de vitaminas do complexo B, particularmente niacina, ácido fólico e ácido pantotênico (Halasz & Lasztity, 1991). Com relação aos aminoácidos, esses microrganismos apresentam níveis elevados de lisina e treonina, mas são deficientes em metionina, e parcialmente deficientes em valina, isoleucina e triptofano (Caballero-Córdoba et al., 1997). Segundo a FDA, somente células secas de leveduras *S. cerevisiae*, *Candida utilis* e *Kluyveromyces fragilis* podem ser utilizadas como aditivos alimentares para consumo humano, pois

já foram submetidas aos testes toxicológicos necessários (Halasz & Lasztity, 1991).

Há restrições ao consumo intenso de leveduras, pois o alto conteúdo de ácidos nucleicos na biomassa, pode levar à formação de cálculos no trato urinário (Costa & Sgarbieri, 1997), e deposição de cálcio nos tecidos moles (Lyutskanov et al., 1990). Reed & Pepler (1973) recomendam que a ingestão de levedura seca seja inferior a 30 g.dia⁻¹. O suíno tem capacidade de decompor o ácido úrico em alantoína, que é eliminada na urina, minimizando os efeitos deletérios da ingestão de purinas. Quanto às aves, embora essas tenham o ácido úrico como principal produto de excreção, a ingestão de elevados teores de ácidos nucleicos também pode ocasionar gota, pois, assim como os humanos, as aves são desprovidas da enzima uricase (Butolo, 1997). Butolo (1997) relatou também que a substituição de farelo de soja por levedura seca no arração de frangos de corte e poedeiras comerciais ao nível de 10%, substituiu completamente o farelo de soja, e 50% da suplementação com vitaminas do complexo B.

A levedura seca é um importante subproduto da indústria sucro-alcooleira, e possui vasto mercado consumidor, tanto no Brasil quanto no exterior. Seu valor comercial, que era equivalente a 70% do preço do farelo de soja, alcançou em 1997 o valor de R\$ 360,00 a tonelada (Pinotti, 1997). Segundo Ghiraldini & Rossell (1997), 80% da levedura comercializada no mercado interno era direcionada para rações de bovinos. A partir de 1995, passou a ser fornecida para aves, suínos, animais domésticos e aquicultura. Na safra 96/97, foram produzidas e comercializadas ao redor de 25000 ton de levedura seca, sendo que cerca da metade foi consumida pelo mercado interno. Os maiores consumidores de levedura seca no exterior são os países sudeste asiático, Europa e América Latina, onde as leveduras são

empregadas na alimentação de suínos, aquicultura (camarões e peixes de água doce), e na confecção de ração para animais domésticos (Pinotti, 1997).

2.2.2 Enxofre em leveduras *S. cerevisiae*

O metabolismo do enxofre é muito importante nas fermentações industriais para obtenção de bebidas alcoólicas. Na produção de vinhos e cervejas, vários compostos voláteis de enxofre são excretados por leveduras, dando origem a odores indesejáveis, quando seus níveis excedem certos valores (Walker, 1998). O H_2S é um exemplo de produto do metabolismo redutor do sulfato e do sulfito em leveduras, e quando o enxofre reduzido não é incorporado em aminoácidos sulfurados, é excretado a níveis que são dependentes da linhagem da levedura, da concentração exógena e do precursor sulfurado, da velocidade de crescimento, e da atividade da enzima sulfito redutase, imediatamente antes do esgotamento do nitrogênio no meio de cultura (Jiraneck et al., 1995).

A primeira etapa do metabolismo do enxofre em microrganismos é a absorção. Tweedie & Segel (1970) observaram que a temperatura ótima para a absorção de sulfato é de 30°C, mas pré-incubações a 50°C causam perda irreversível na habilidade da célula em transportar esse íon. A assimilação de sulfeto (S^{2-}), verificada em fungos filamentosos por Tweedie & Segel (1970), parece não ser saturável, e independe do *status* nutricional de enxofre e da temperatura. Em *S.cerevisiae*, McCready & Din (1974) verificaram que a absorção de sulfato é saturável, dependente da temperatura, e da presença de glicose. McCready & Din (1974) sugeriram a existência de um sistema de transporte ativo de sulfato em *S. cerevisiae*, sendo que

a velocidade de absorção depende da concentração desse íon no meio de cultura, e é crescente até o nível de 10^{-4} M. A partir daí, o sistema é saturado, e a absorção é interrompida.

Breton & Surdin-Kerjan (1977) identificaram duas sulfato permeases em leveduras, sendo que a primeira (permease I) apresenta maior afinidade pelo substrato que a segunda (permease II). A entrada de sulfato na célula é acompanhada pela entrada de três íons H^+ , e pela saída de um íon K^+ , para cada íon sulfato absorvido (Cooper, 1982). Já o sulfito inorgânico passa livremente pela membrana plasmática de leveduras por difusão facilitada, ou difusão do tipo de Fick (Stratford & Rose, 1985).

Uma vez no interior da célula, o enxofre é reduzido, e posteriormente incorporado em aminoácidos. O mecanismo de redução do sulfato absorvido envolve quatro reações enzimáticas, que só ocorrem com gasto de ATP. O sulfato inorgânico absorvido reage com ATP, em reação catalisada pela enzima ATP sulfurilase, formando adenosina fosfosulfato (APS) (Bandurski et al., 1956; Lipmann, 1958). A APS formada, por sua vez, reage com outro ATP, por meio da enzima APS quinase, formando fosfoadenosinafosfosulfato (PAPS) (Bandurski et al., 1956; Lipmann, 1958). A reação entre ATP e APS quinase é termodinamicamente desfavorável, e só ocorre através da retirada de pirofosfato inorgânico pela enzima pirofosfatase (Robbins & Lipmann, 1956 a e b). O PAPS formado é hidrolisado pela enzima PAPS redutase, dando origem a sulfito (SO_3^{2-}), que é finalmente reduzido a sulfeto (S^{2-}) pela ação da enzima sulfito redutase (Prabhakararao & Nicholas, 1969). A seqüência de reações acima mencionadas encontra-se descrita na figura 2:

Figura 2 - Seqüência de reações envolvidas na redução do sulfato a sulfeto em *S. cerevisiae*.

Fonte: Jiraneck et al. (1996)

O sulfeto reduzido por leveduras pode ser incorporado em aminoácidos como cisteína e metionina, ou liberado no meio de cultura na forma de H_2S . Stratford & Rose (1985) verificaram que a liberação de H_2S por *S. cerevisiae* só ocorre a partir de sulfito, e que não há liberação de H_2S tendo sulfato como fonte de enxofre. Jiraneck et al. (1995) observaram que o sulfato também é substrato para produção de H_2S , mas as quantidades de H_2S liberadas são limitadas, devido a existência de um mecanismo de controle transcricional da produção de H_2S pela célula. A liberação de H_2S começa no início da fase estacionária de crescimento, e é desencadeada pelo esgotamento do nitrogênio inorgânico, pois a ausência de precursor nitrogenado impossibilita a incorporação do sulfeto formado (Stratford & Rose, 1985; Jiraneck et al., 1995).

Stratford & Rose (1985) afirmaram que a produção de H_2S está fortemente correlacionada com a atividade da enzima sulfito redutase, mas Jiraneck et al. (1996) discordaram dessa afirmação ao demonstrar que a máxima atividade dessa enzima, detectada durante a fase exponencial de crescimento, não foi acompanhada pela liberação de H_2S . A liberação de H_2S é retardada quando as células se

multiplicam em baixas velocidades de crescimento, sendo que a inclusão de metionina no meio de cultura, reduz a liberação de H_2S pela metade (Stratford & Rose, 1985). Jiraneck et al. (1995) detectaram a maior liberação de H_2S quando o nitrogênio se esgotou durante a fase exponencial de crescimento, e verificaram que a adição de amônio ou de aminoácidos (com exceção da cisteína, treonina e prolina), reduziu a liberação de H_2S . Segundo o mesmo autor, qualquer composto nitrogenado precursor de aminoácidos sulfurados, pode prevenir a liberação excessiva de H_2S .

A ocorrência simultânea de esgotamento do reservatório de metionina em leveduras, e a superprodução de H_2S , são ocasionados por deficiência de vitaminas que atuam como cofatores enzimáticos no sistema de redução do enxofre. A deficiência de pantotenato, por exemplo, que é precursor da coenzima A, essencial na conversão do sulfeto em metionina, resulta em desbalanço na biossíntese de aminoácidos sulfurados, ocasionando excessiva absorção de sulfato, e excreção de H_2S (Walker, 1998). A produção líquida de H_2S pode ser aumentada em linhagens haplóides de *S. cerevisiae*, bem como em leveduras de cervejaria, pelo aumento da dosagem dos genes *MET3* e *MET14*, que codificam a síntese das enzimas ATP sulfurilase e APS quinase (Hansen & Kielland-Brandt, 1996).

Enquanto a redução do enxofre parece ocorrer de modo semelhante em microrganismos, a incorporação do H_2S é realizada de maneira diferente, de acordo com o a espécie. O sulfeto pode ser incorporado em esqueleto de três carbonos (O-acetilserina) para produzir cisteína, ou em esqueleto de quatro carbonos (O-acetilhomoserina), para produzir homocisteína, ou esses dois mecanismos podem ocorrer simultaneamente em certos microrganismos (Cherest & Surdin-Kerjan, 1991). Homocisteína e

cisteína podem ser interconvertidos através da via de transulfuração, na qual a cistationina é a intermediária comum em ambos os sentidos (figura 3).

Figura 3 - Via de transulfuração, com a incorporação do sulfeto em esqueleto de 3 e 4 carbonos.

Fonte: Cherest & Surdin-Kerjan (1991)

Cherest & Surdin-Kerjan (1991) verificaram que a síntese direta de cisteína em *Escherichia coli*, pela incorporação de enxofre em esqueleto de 3 carbonos, não ocorre em *S. cerevisiae*, pois mutações no gene *STR1* de *S. cerevisiae* causaram queda acentuada na atividade da enzima cistationina γ -liase, que catalisa a síntese de cisteína a partir da homocisteína, pela via da transulfuração, e provocaram requerimento nutricional estrito em cisteína. Cherest & Surdin-Kerjan (1991) propuseram que a serina transacetilase não é sintetizada em *S. cerevisiae*, pois não detectaram atividade dessa enzima em linhagens

selvagens, e apresentaram um modelo de biossíntese de cisteína, que envolve a incorporação do enxofre apenas através da O-acetilhomoserina. A síntese de cisteína, nesse caso, ocorre através da via de transulfuração, a partir da homocisteína (figura 4).

Figura 4 - Via de transulfuração em *S. cerevisiae*, que envolve a incorporação do sulfeto apenas em esqueleto de 4 carbonos. A síntese da cisteína em leveduras se dá exclusivamente através da via da transulfuração, a partir da homocisteína.

Fonte: Cherest & Surdin-Kerjan (1991)

A síntese de metionina em *S. cerevisiae*, ocorre através da produção de O-acetilhomoserina a partir da homoserina, catalisada pela enzima homoserina acetiltransferase (de Robichon-Szulmajster & Cherest, 1967). A O-acetilhomoserina se funde com o sulfeto, formando homocisteína, que é precursora direta da metionina. São inúmeros os fatores que influenciam o metabolismo do enxofre em *S. cerevisiae*, como a presença de produtos metabólicos no meio de cultura, que afetam a produção e atividade das enzimas envolvidas na redução e incorporação do enxofre, e interferem na expressão dos genes

responsáveis pela síntese dessas enzimas, e a competição de certos íons com as fontes sulfuradas, que podem tanto favorecer quanto obstruir a absorção de enxofre por *S. cerevisiae*. A S-adenosilmetionina (SAM), substância intermediária na síntese da metionina, e a própria metionina, reprimem transcricionalmente, em vários níveis, a expressão dos genes envolvidos na assimilação do enxofre, na síntese e na atividade da enzima homoserina acetiltransferase, que catalisa a síntese da O-acetilhomoserina. (de Robichon-Szulmajster & Cherest, 1967).

Cherest et al. (1973) reportaram que a SAM também provoca repressão em algumas enzimas específicas do sistema de redução do enxofre, como ATP sulfurilase, sulfito redutase e homocisteína sintase, e a reativação dessas enzimas pela redução dos níveis celulares de metionina em *S. cerevisiae*, é acompanhada por severa redução dos níveis celulares de SAM e de metionina, ao passo que a enzima metionina adenosiltransferase é pouco reativada. A regulação da síntese e atividade das enzimas envolvidas na redução e incorporação do enxofre, também é controlada pela concentração exógena de metionina e SAM (Breton & Surdin-Kerjan, 1977).

Ao investigar a atividade da enzima ATP sulfurilase em linhagens de leveduras selvagens e mutantes, pouco e muito produtoras de sulfito, Heinzl & Truper (1978) observaram que a presença de sulfito, metionina ou cisteína, em conjunto com sulfato, causaram repressão dessa enzima em linhagens selvagens de *S. cerevisiae*. As linhagens produtoras de sulfito apresentaram comportamento diversificado quanto a repressão na produção de sulfito, e se distinguiram das linhagens pouco produtoras por apresentarem maior atividade da enzima ATP sulfurilase. O gene *MET2* de *S. cerevisiae*, codifica a enzima homoserina O-acetiltransferase, que

catalisa a conversão da homoserina para O-acetilhomoserina, e se combina com o sulfeto de hidrogênio, para formar homocisteína, o precursor imediato da síntese de metionina (Hansen & Kielland-Brandt 1996).

Jiraneck et. al (1996) reportaram que a atividade da enzima sulfito redutase foi fortemente reduzida em cultivos celulares tendo metionina como única fonte de nitrogênio, quando comparada com a atividade enzimática de células cultivadas na presença de amônio.

2.2.3 Selênio em leveduras *S. cerevisiae*

Elementos como nitrogênio, potássio e enxofre, são essenciais ao crescimento de leveduras, e devem estar presentes no meio de cultura. Todavia, elementos como cromo, boro e manganês, enquanto não estritamente necessários ao crescimento celular, podem exercer efeito estimulante ou inibitório, quando presentes em concentrações pouco superiores àquelas requeridas para o crescimento ótimo. Ao avaliar o efeito tóxico de 50 elementos químicos no metabolismo de leveduras em meio sintético, White & Munns (1951) classificaram esses elementos em 4 categorias:

- Muito tóxicos;
- Moderadamente tóxicos;
- Pouco tóxicos;
- Muito pouco tóxicos.

Dentro desse contexto, o selênio é considerado um elemento não essencial e pouco tóxico para *S. cerevisiae*, pois níveis de 400 mg.L⁻¹ reduziram o crescimento celular pela metade, e níveis de 500 a

600 mg.L⁻¹ causaram inibição completa no crescimento (White & Munns, 1951).

Ao avaliar a suscetibilidade de *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. tropicalis* ao cádmio, mercúrio, chumbo, arsênico e selênio, Berdicevsky et al. (1993) verificaram que a presença de 800 mg.L⁻¹ de selenito durante 8 dias de cultivo, causou forte queda na viabilidade celular, sendo que a levedura menos tolerante foi *S. cerevisiae*. Dentre os cinco elementos avaliados por Berdicevsky et al. (1993), os metalóides arsênico e selênio foram considerados os menos tóxicos para as leveduras investigadas, pois foram necessários níveis de selenito da ordem de 1000; 32 e 4 vezes superiores aos de mercúrio, cádmio e chumbo, respectivamente, para causar toxidez equivalente a esses metais pesados em *S. cerevisiae*.

A primeira etapa na interação entre selenito e a levedura é a absorção. Tweedie & Segel (1970) verificaram que a absorção dos íons sulfato, selenato e molibdato em *Penicillium* e *Aspergillus* sp, é realizada pelas mesmas permeases, em processo dependente de energia, temperatura, pH, e da concentração exógena desses íons, devido as seguintes evidências:

- Os três ânions exibiram inibição competitiva recíproca;
- Os micélios cultivados em condições que reprimem a sulfato permease (presença de metionina), exibiram baixas taxas de assimilação desses íons;
- Mutantes deficientes no transporte de sulfato foram igualmente deficientes no transporte de selenato e molibdato.

Uma vez no interior da célula, a biorredução domina a química do selênio, pois o meio intracelular é mais redutor que o meio externo. Segundo Falcone & Nickerson (1963), a taxa de redução do selenito por leveduras é influenciada pela concentração de selenito no

substrato, pH, temperatura e tempo de incubação. Os produtos finais do metabolismo do selênio em microrganismos são selenoproteínas, selênio elementar, e algumas formas metiladas de selênio, como dimetilseleneto (Milne, 1998). A via de redução do selenito é mais conhecida, entretanto, as últimas etapas da formação de selênio elementar e a síntese de compostos orgânicos de selênio ainda permanecem obscuras (Milne, 1998).

Existem evidências de que o mesmo complexo enzimático que catalisa a redução de sulfato e sulfito em leveduras, também é ativo na redução de selenato e selenito. McCready & Din (1974) verificaram que níveis de 10^{-4} e 10^{-3} M de selenato no substrato, inibiram em 55 e 85% a absorção de sulfato, respectivamente, não afetando a absorção de glicose e metionina. Breton & Surdin-Kerjan (1977) observaram inibição da atividade das duas sulfato permease de *S. cerevisiae* pelos íons selenato e cromato, sendo que a primeira sulfato permease apresentou quase a mesma afinidade, tanto pelo selenato, quanto pelo cromato.

Wilson & Bandurski (1956) reproduziram uma reação enzimática entre ATP e selenato, catalisada pela ATP sulfurilase, semelhante aquela entre ATP e sulfato, demonstrando que esse mesmo sistema está presente em leveduras, e também é ativo tendo selenato como substrato. A adição de selenato a uma fração enzimática, resultou em crescente liberação de pirofosfato, como ocorre na presença de sulfato. Essa liberação foi dependente da concentração enzimática, da presença de Mg^{2+} , que atua como cofator enzimático, e foi inibida pelo Be^{+2} .

Há evidências de que a enzima sulfito redutase não participa da redução do selenato. Wilson & Bandurski (1958) verificaram que a reação entre ATP e selenato, catalisada pela ATP sulfurilase, resultou

na formação de baixas quantidades de adenosina fosfoselenato (APSe), e a quantidade de fosfato liberada foi menor do que aquela formada tendo o sulfato como substrato. A APSe formada era pouco estável, e a 30°C e pH 4,5, apresentou meia vida de 30 minutos. Com a adição da enzima APS quinase, houve maior liberação de fosfato, e maior síntese do complexo nucleotídio-selenato, mas a quantidade de nucleotídio formada, no entanto, não correspondeu a quantidade de fosfato formada, e análises eletroforéticas não detectaram acúmulo de PAPSe.

Hsich & Ganter (1975) relataram a ocorrência de redução do selenito na presença de glutathione, em condições onde a atividade da enzima sulfito redutase é reprimida. A selenodiglutathione (GSSeSG) foi o primeiro intermediário estável formado na reação entre selenito e glutathione, e foi posteriormente reduzida a GSSeH pela glutathione redutase, ou pelo excesso de glutathione reduzida.

O fosfato, em concentrações equimolares às de selenito, causou inibição de 90% na redução do selenito, mas concentrações de fosfato 10 vezes maior ou menor que a de selenito, causaram menor inibição, da ordem de 60% (Falcone & Nickerson, 1963).

O seleneto é a forma mais reduzida de selênio na natureza, e em leveduras, pode ser incorporado em aminoácidos e proteínas, em substituição ao enxofre, ou ser liberado para o meio externo na forma de H_2Se (Milne, 1998). Mudd & Cantoni (1957) demonstraram que compostos inorgânicos de selênio podem ser convertidos biologicamente em compostos orgânicos, ao verificar a substituição da metionina pela selenometionina em proteínas, sendo que as proteínas resultantes mantiveram sua integridade funcional. Blau (1961); Korhola et al. (1986); Korhola & Edelman (1986) e Ogawa et al. (1985), também relataram a biossíntese de selenometionina por *S. cerevisiae*.

Haas & Velten (1992) identificaram duas selenoproteínas em *S. cerevisiae*, que apresentam selenocisteína em sua constituição. Uma foi localizada na mitocôndria (proteína SP1), que apresentou a mesma atividade da GHS-Px, e atingiu uma concentração máxima mediante baixas concentrações de selênio. Uma segunda selenoproteína (SP2) foi encontrada no citoplasma e na mitocôndria. Haas & Velten (1992) verificaram também que a intensidade de biossíntese de selenoproteínas na mitocôndria e no citossol de *S. cerevisiae*, foi dependente da concentração de selenito no meio de cultura.

As interações entre íons presentes no meio de cultura podem, através dos mecanismos de antagonismo e sinergismo, reduzir ou potencializar a toxidez de metais pesados em microrganismos. O selênio, por exemplo, interage sinergicamente com alguns metais pesados, acarretando aumento da concentração celular desses metais. Uma vez no interior da célula, a forma aniônica do grupo selenidril, se liga fortemente aos metais pesados, formando compostos inertes (Nuttal & Allen, 1984).

Czauderna et al. (1995) demonstraram a ocorrência de antagonismo e sinergismo entre o selênio e outros elementos químicos, ao verificarem que a presença de selenito causou pequena redução na concentração celular de antimônio, e o antimônio aumentou a concentração celular de selênio em leveduras, após longos períodos de incubação. Czauderna et al. (1996a) avaliaram o efeito do selênio e glutathione no acúmulo de zinco, cobalto, ferro e tório por *S. cerevisiae*. A presença de selênio e glutathione provocou aumento significativo na concentração celular de selênio. Por outro lado, a presença de selenato ou selenito provocou aumento na concentração celular de cobalto e ferro, e redução nos níveis de zinco. A selenocisteína não afetou os níveis celulares de ferro, mas causou forte redução nos níveis celulares

de zinco, o que sugere que as formas orgânicas de selênio interagem mais eficientemente com o zinco.

Czauderna et al. (1996b) observaram a ocorrência de antagonismo entre o telúrio e selenito ou selenato em *S. cerevisiae*. A presença de telúrio causou redução no conteúdo celular de selênio, mas a presença de selenito favoreceu o acúmulo de telúrio. Em contrapartida, há sinergismo entre selenocisteína e telúrio, pois a presença de telúrio aumentou significativamente a concentração celular de selênio. Mediante esses resultados, os autores propuseram a ocorrência de substituição do selênio pela forma análoga de telúrio na célula. Czauderna et al. (1996b) verificaram também a ocorrência de sinergismo entre selênio, prata e ferro, e antagonismo entre selênio e zinco em *S. cerevisiae*.

Ao analisar a distribuição de ^{75}Se em leveduras, Korhola et al. (1986) verificaram a presença desse radioisótopo na glutathiona, na diglutathiona (GSSG), na metionina e na selenometionina, sendo que a selenometionina foi o principal selenocomposto encontrado em leveduras. Varimo⁵ et al., citado por Korhola & Edelman (1986), cultivaram leveduras em mosto de melaço de beterraba contendo selênio, e verificaram que 80% do selênio acumulado estava associado a compostos de alto peso molecular, 58% em proteínas solúveis e ácidos nucleicos; 19% em peptídios, aminoácidos, e sais inorgânicos; 15% adsorvido à parede celular e 9% na mitocôndria e microssomos.

Leveduras cultivadas por Dilsiz et al. (1997) na presença de selênio e vitamina E, apresentaram aumento significativo nos níveis de ácidos graxos saturados, insaturados e proteínas. Acredita-se, por essa razão, que a vitamina E está envolvida na regulação do metabolismo celular de selênio.

⁵ VARIMO, K.; HARJU, K.; EDELMANN, K.; KORHOLA, M. Selenium enriched yeast. **Kemia-Kemi**, v.12, p.1049-1050, 1983.

Em leveduras do gênero *Candida* cultivadas por Zhil'tsova et al. (1998), o selênio foi encontrado principalmente em aminoácidos, proteínas solúveis (52%), e membranas (32%). Dentre os componentes celulares, 72% do selênio estava incorporado em proteínas e aminoácidos, e menos de 1% em lipídios. A fração inorgânica foi de 27%, cuja maior parte (22%) estava retida na parede celular.

Em outro cultivo de leveduras em meio contendo selênio, Isakova et al. (1996) encontraram 80% do selênio celular incorporado em aminoácidos, concordando com o encontrado em bactérias do gênero *Lactobacillus* por Calomme et al. (1995). Demirci et al. (1999) desenvolveram protocolo para produção de selenoleveduras em processo descontínuo alimentado, utilizando níveis de 63,2 e 31,6 g.L⁻¹ de selenato de sódio, adicionados em dose única ou continuamente, e verificaram que nos cultivos contendo 63,2 g.L⁻¹ de selenato com adição contínua, houve menor produção de biomassa, e menor teor de selênio na biomassa. Nos cultivos com 31,6 g.L⁻¹ de selenato, houve maior produção de biomassa quando o selênio foi adicionado continuamente, mas o acúmulo de selênio foi maior no cultivo em que o selênio foi adicionado de uma só vez.

Demirci & Pometto (1999) investigaram a produção de selenoleveduras em cultivo contínuo, onde o meio de cultura era acrescido de doses de 690 mg.L⁻¹ de selenito de sódio, ou 280 mg.L⁻¹ de selenato de sódio. No cultivo com selenito de sódio, houve maior produção de biomassa, e maior acúmulo de selênio na biomassa, mas a forma de selênio que predominou na biomassa foi a inorgânica. No cultivo com selenato, foi detectada maior concentração de selênio orgânico na biomassa. Houve maior formação de biomassa e maior concentração de selênio nos tratamentos em que a adição de selênio foi contínua. Menores concentrações de selênio no substrato

proporcionam maior produção de biomassa, e maior teor de selênio na forma orgânica.

2.3 Cultivo de microrganismos

O termo fermentação, num sentido amplo, pode ser definido como todo o processo no qual microrganismos catalisam a conversão de determinada substância a um determinado produto. O processo de conversão pode ou não requerer oxigênio, e os próprios microrganismos podem estar incluídos entre os produtos formados (Doin, 1975).

Os processos fermentativos podem ser tecnologicamente classificados de acordo com a maneira em que o substrato é adicionado, e o produto retirado. Assim sendo, numa fermentação descontínua, o substrato é transferido para o fermentador de uma só vez, e ao término do processo, todo o produto é retirado do mesmo. Já em uma operação contínua, a matéria prima é adicionada no decorrer do processo, a uma vazão constante, e o meio fermentado é retirado com vazão igual a de alimentação (Doin, 1975).

Alta produção de biomassa de *S. cerevisiae* pode ser obtida em cultivo contínuo aeróbio, sob baixas concentrações de açúcares ($<20 \text{ g.L}^{-1}$). Em concentrações superiores a 20 g.L^{-1} , *S. cerevisiae* sofre repressão catabólica, e converte os açúcares em etanol e CO_2 , reduzindo a produção de biomassa. Esse fenômeno de produção de etanol sob aerobiose, é denominado “efeito Crabtree” (Demirci et al., 1999). Existem ainda os processos semicontínuos, nos quais a adição de substrato e a retirada de produto, são efetuadas intermitentemente (Doin, 1975).

O desenvolvimento de um processo fermentativo, envolve o estudo de diversas etapas relativas ao processo, como a seleção do tipo de microrganismo a ser utilizado, e da cepa mais produtiva, além de estudos sobre as melhores condições de cultivo do microrganismo (pH, temperatura, condições de aeração e agitação), e o estabelecimento das melhores condições de inoculação, visando obter a máxima produtividade (Pamboukian, 1997). O desenvolvimento microbiano é normalmente caracterizado por dois parâmetros, que são o tempo de duplicação celular (t_d), e a velocidade específica de crescimento celular (μ). O primeiro parâmetro expressa o intervalo de tempo decorrido até que ocorra duplicação do número ou massa de células. O t_d depende de uma série de fatores, dentre os quais temperatura, pH, concentração de nutrientes, presença de inibidores e agitação da cultura (Dias, 1982). Para um mesmo microrganismo, este parâmetro pode variar entre limites bastante amplos. Os valores típicos para t_d , segundo Wang et al., 1979, apresentam :

- Para leveduras : entre 90 e 120 minutos (com valor mínimo da ordem de 45 minutos);

O segundo parâmetro é a velocidade específica de crescimento celular (μ), que consiste numa grandeza que é numericamente igual à massa de células produzidas na unidade de tempo, dividida pela massa de microrganismo já existentes, e é dada pela seguinte fórmula:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \quad (3)$$

onde X é a concentração celular no instante t. A velocidade específica máxima de crescimento na fase exponencial (μ_m) pode ser calculada lançando-se os valores de X em um gráfico mono logarítmico, sendo

que a tangente à reta obtida na fase exponencial corresponde ao valor de μ_M (Dias, 1982).

O crescimento celular, que é caracterizado pelo aumento na massa ou no número de células, ocorre quando certas condições químicas e físicas são satisfeitas, como temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes requeridos (Wang et al., 1979). A cinética de crescimento e de formação de produto, reflete a habilidade das células em responder as condições ambientais. Geralmente, o crescimento celular é medido pela estimativa da massa celular (Pamboukian, 1997).

Durante a fermentação descontínua, a composição química do meio de cultura é alterada, conforme o meio de cultura vai sendo consumido, e os produtos metabólicos vão sendo excretados. Em determinado instante, a velocidade de crescimento começa a decair, devido ao esgotamento de um nutriente essencial, ou pelo acúmulo de um produto inibidor (Dias, 1982).

A fase estacionária ocorre quando todas as células completam a divisão, ou quando é alcançado um equilíbrio entre células viáveis e não viáveis. A massa celular pode se manter constante, mas o número de células viáveis pode diminuir. Com a redução da viabilidade, as células podem sofrer lise, provocando redução na massa celular (Dias, 1982).

2.4 Curva de crescimento de microrganismos

A curva de crescimento de leveduras cultivadas em sistema descontínuo, é caracterizada pelas fases lag, exponencial e estacionária (figura 5).

Figura 5 - Exemplo típico de curva de crescimento de microrganismos, cultivados em sistema descontínuo.

Fonte: Dias (1982)

A fase lag (I da figura 5), representa o período onde o crescimento celular é zero ($\mu = 0$), e ocorre a partir da inoculação do meio de cultura, quando as células se deparam com mudanças no *status* nutricional, ou alterações nas condições físicas de crescimento, como osmolaridade e temperatura. Durante essa fase, ocorre aumento na massa celular, sem alterar o número de células (Wang et al., 1979).

A duração da fase lag depende das condições de crescimento, da densidade, viabilidade celular, e das condições de cultivo do inóculo (Walker, 1998). A fase lag consiste no tempo requerido para as células inoculadas se adaptarem ao novo ambiente, através da síntese de ribossomos e enzimas que possibilitem o crescimento celular em taxas superiores (Walker, 1998).

Uma vez que as células saem da fase lag e começa a realizar divisão celular, inicia-se a fase de aceleração de crescimento (II da figura 5), antes da fase exponencial. A taxa de aumento da biomassa de leveduras (X) em relação ao tempo (t), durante essa fase, é expressa

pela fórmula 4, onde o valor de μ varia entre zero (fase lag) e o valor máximo (μ_M), que ocorre na fase exponencial (III da figura 5):

$$\frac{dX}{dt} = \mu X \quad (4)$$

A fase exponencial representa o período crescimento logarítmico, onde a taxa de crescimento específico é máxima (μ_M). O valor preciso de μ_M depende da espécie da levedura e das condições de crescimento. Se as condições de crescimento são ótimas, e as células se duplicam logaritmicamente, então (fórmula 5):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_M X \quad (5)$$

Integrando-se essa expressão, obtém-se:

$$\ln X - \ln X_0 = \mu_M t, \quad (6)$$

onde X_0 é a massa celular inicial, e X , a massa celular no instante t (fórmula 6). Nos cultivos descontínuos, a fase exponencial tem duração relativamente curta, devido ao esgotamento de nutrientes essenciais, ou ao acúmulo de metabólitos inibidores de crescimento, como o etanol, baixo pH e elevadas concentrações de CO_2 . Depois da fase exponencial, o crescimento celular é retardado, caracterizando a fase de desaceleração do crescimento celular (IV da figura 5). Posteriormente, as células passam para a fase estacionária (V da figura 5), período em que o crescimento celular é zero (Walker, 1998).

Na fase estacionária, que ocorre quando todas as células completam a divisão, ou quando é alcançado um equilíbrio entre a morte e o brotamento celular, a quantidade de levedura acumulada permanece relativamente constante, e a velocidade específica de crescimento celular (μ) retorna a zero (Wang et al., 1979). Nessa fase, a massa celular pode se manter constante, mas o número de células viáveis pode cair. A queda na viabilidade, causada pela ocorrência de lise celular, leva a criação de um complexo meio de produtos de lise, e um período secundário de crescimento, chamado crescimento crítico (Wang et al., 1979).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Todos as linhagens utilizadas são pertencentes à espécie *Saccharomyces cerevisiae*. Foi utilizada a linhagem de destilaria, denominada PE-2, obtida a partir da coleção do Departamento de Ciências Biológicas, da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, da Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), e a linhagem de panificação Fleischmann, adquirida no comércio local, ambas produtoras de H₂S; Utilizou-se também as linhagens de vinificação não produtoras de H₂S, denominadas KI e KD1-88, obtidas a partir da coleção do Departamento de Ciências Biológicas da ESALQ-USP.

3.1.1 Caracterização de linhagens produtoras e não produtoras de H₂S

A primeira etapa do trabalho consistiu em caracterizar linhagens produtoras e não produtoras de H₂S, através de cultivo em meio bismuto sulfito agar (BSA)⁶. Esse meio de cultura contém compostos sulfurados em sua composição, que servem como fonte de enxofre para produção de H₂S. Quando o meio BSA é inoculado com uma linhagem de levedura produtora de H₂S, o ferro presente no meio é

precipitado pela presença de H_2S , dando às colônias positivas a coloração marrom ou preta, com brilho metálico característico (Difco, 1984).

Depois de preparado, o meio BSA foi inoculado com culturas puras de leveduras, e incubado a $30^{\circ}C$ por 48 h. Após esse período, realizou-se avaliação visual das colônias. Aquelas que apresentaram coloração escura, foram consideradas como sendo produtoras de H_2S , enquanto aquelas que não apresentaram alterações na cor, foram consideradas não produtoras de H_2S . Depois de caracterizadas, as linhagens foram multiplicadas e utilizadas como inóculo nos ensaios de cultivo celular.

3.1.2 Preparo do inóculo

As linhagens de levedura selecionadas, foram pinçadas a partir de culturas puras mantidas em tubos com meio YEPD sólido inclinado, transferidas para tubos de ensaio com tampa, contendo 5 mL de meio YEPD líquido, e incubadas a $30^{\circ}C$ por 12 h. Em seguida, as suspensões celulares resultantes foram transferidas para erlenmeyers de 200 mL, contendo 100 mL de meio de melaço, preparado conforme o item 3.2.3, e incubadas a $30^{\circ}C$ sob agitação de 120 rpm, por 12 horas. Ao término desse período, a biomassa foi separada do vinho por centrifugação a 800 *g* durante 15 minutos. O sobrenadante foi descartado, e a biomassa resultante foi diluída em água, até atingir a concentração celular de 1% (p/v). Depois de preparado, o inóculo foi mantido sob refrigeração a $5^{\circ}C$ por 24 h, e utilizado nos ensaios de cultivo celular, e na elaboração das retas padrão (figura 6).

⁶ A composição do meio BSA encontra-se no apêndice.

Figura 6 - Representação esquemática da preparação do inóculo para os ensaios de cultivo celular descontínuo.

3.2 Meios de Cultura

A composição dos meios de cultura utilizados neste trabalho encontra-se descritas no apêndice.

3.2.1 Preparo do meio bismuto sulfito agar (BSA)

O meio BSA desidratado foi transferido para *becker* com água deionizada, e colocado em banho-maria até a dissolução completa. Em seguida, o meio foi vertido em placas de Petri, e inoculado com culturas de leveduras, após atingir a temperatura ambiente.

3.2.2 Preparo do meio de extrato de levedura, peptona e dextrose (YEPD)

O meio YEPD, utilizado no repique das linhagens selecionadas para os ensaios de cultivo celular, foi preparado por dissolução dos componentes em água, e esterilizado em autoclave a 121,1 °C, por 20 min.

3.2.3 Preparo do meio de melaço para produção de inóculo e para os ensaios de cultivo descontínuo

Em todos os ensaios de cultivo celular realizados, utilizou-se meio de melaço de cana-de-açúcar como substrato. O melaço de cana-de-açúcar foi diluído em água, até a concentração de açúcares redutores totais (ART) de 60 g.L^{-1} , e posteriormente suplementado com sais. O pH do meio de melaço foi ajustado para 4,00, com a adição de ácido sulfúrico para análise (P.A.). Em seguida, volumes de 200 mL de meio foram distribuídos em erlenmeyers com 250 mL de capacidade. Os frascos foram vedados com papel alumínio, e esterilizados em autoclave a $121,1^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Após atingir a temperatura ambiente, os frascos foram utilizados nos ensaios de cultivo celular. O selenito foi adicionado ao meio de melaço de uma só vez, antes da inoculação, por meio de adição de solução estoque contendo $17,87 \text{ g.L}^{-1}$ de selenito de sódio, resultando em concentrações finais de 40 e 80 mg.L^{-1} de selenito no meio de melaço.

3.3 Ensaio de cultivo celular descontínuo

Os valores dos seguintes fatores foram previamente fixados no início de todos os ensaios realizados.

- Temperatura de cultivo : 30°C
- Velocidade do incubador rotativo : 120 rpm
- pH inicial do meio : 4,0
- Concentração inicial do substrato (S_0) : 60 g.L^{-1} de ART

3.3.1 Condução dos ensaios de cultivo celular descontínuo

Realizou-se 4 ensaios independentes, nos quais foram avaliados os efeitos da adição de selenito ao meio de cultivo de linhagens *S. cerevisiae*, produtoras e não produtoras de H_2S . Para cada ensaio, utilizou-se uma série de 9 erlenmeyers de 250 mL de capacidade, contendo 200 mL de meio de melaço, preparados conforme descrito no item 3.2.3. Cada ensaio foi constituído pelos seguintes tratamentos (Quadro 1):

Tratamento (concentração de selenito no meio de cultura)		
Controle (0 mg.L ⁻¹ Se)	40 mg.L ⁻¹ Se	80 mg.L ⁻¹ Se

Quadro 1 - Tratamentos avaliados nos ensaios de cultivo celular

Após a adição do selenito, os frascos foram inoculados com 5 mL de suspensão celular contendo 1 g.L⁻¹ de células. Logo em seguida, agitou-se os frascos manualmente, e retirou-se as primeiras amostras para medida de absorbância, em espectrofotômetro a 660 nm. A primeira leitura, referente ao tempo 0 h, serviu como branco, da qual foram subtraídas as leituras dos demais tempos. Depois de coletadas as amostras referentes ao tempo 0 h, os frascos foram acondicionados em incubador rotativo a 120 rpm e 30°C. No transcorrer dos ensaios, determinou-se a absorbância do meio de cultura, através de amostras retiradas em intervalos de 3 h, a partir do tempo 0 h.

3.3.2 Encerramento dos ensaios de cultivo descontínuo

Os ensaios de cultivo celular foram encerrados no momento em que os cultivos atingiram a fase estacionária, o que na prática, era observado quando a redução da transmitância nas últimas 6 h de cultivo celular era inferior a 5%. Isso normalmente ocorreu nos intervalos entre 18 e 21 h. Encerrados os ensaios de cultivo celular, os frascos foram armazenados em câmara fria a 5°C, durante 24 h. Em seguida, procedeu-se as análises na biomassa, e no meio fermentado delevurado, descritas nos itens 3.4.2 e 3.4.3, respectivamente.

3.4 Metodologia analítica

3.4.1 Determinação da concentração celular (X)

Foi realizada por método turbidimétrico. As amostras retiradas durante o cultivo celular, representadas por alíquotas de 0,5 mL, foram diluídas em 9,5 mL de água (diluição 1:20), e imediatamente submetidas a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 660 nm. Os valores de absorbância foram convertidos em concentração celular (X), com auxílio de reta padrão (item 3.4.1.1). Os valores de X estão expressos em g de células por 100 mL de substrato, ou % p/v.

3.4.1.1 Reta padrão

Na construção das retas padrão, foram empregadas as mesmas suspensões de leveduras 1%, utilizadas como inóculo nos ensaios de cultivo celular. Transferiu-se alíquotas de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1 mL da

suspensão celular 1%, para tubos de ensaio contendo 9,8; 9,6; 9,4; 9,2 e 9 mL de água, respectivamente. Esses tubos foram agitados e submetidos a leitura de absorbância em espectrofotômetro a 660 nm, conforme representado na figura 7.

Figura 7 - Representação esquemática do procedimento de elaboração das retas padrão.

A partir dessas leituras, construiu-se as retas padrão, por meio de gráficos correlacionando absorbância versus concentração celular (%). Então, determinou-se as equações das retas, que foram utilizadas na conversão dos resultados de absorbância, em concentração celular. Uma reta padrão típica, para conversão de valores de absorbância em concentração celular, está representada na figura 8.

Figura 8 - Reta padrão, equação da reta, e coeficiente r^2 , utilizados na determinação da concentração celular, durante o ensaio de cultivo da linhagem Fleischmann.

3.4.2 Análises na biomassa produzida

3.4.2.1 Determinação da viabilidade e da taxa de brotamento celular

A análise da viabilidade foi realizada nas suspensões de leveduras utilizadas como inóculo, e no meio fermentado, obtido ao final do cultivo celular. Alíquotas de 20 μL de suspensão celulares foram transferidas para tubos de ensaio, e diluídas em partes iguais de água e de solução do corante eritrosina. As amostras convenientemente diluídas foram transferidas para câmara de Neubauer, onde foi realizada a contagem direta ao microscópio ótico. As células coradas foram consideradas não viáveis, e as não coradas, viáveis (Zago et al., 1989). Toda célula adulta ligada a célula de tamanho inferior, foi considerada broto.

3.4.2.2 Determinação da biomassa produzida

Consistiu em centrifugar a suspensão celular, separando o meio fermentado bruto da biomassa, ao final de cada ensaio de cultivo celular, a 800 *g* por 15 min, em tubo de centrífuga previamente tarado. O meio fermentado delevurado foi recolhido em recipientes com tampa. Depois da primeira centrifugação, a biomassa foi lavada por duas vezes, por meio de ressuspensão em água, e separada através de centrifugações. Descartou-se o sobrenadante, e determinou-se a biomassa por pesagem (Silva, 1990).

3.4.2.3 Determinação da concentração de selênio na matéria seca

O teor de selênio na matéria seca foi determinado por análise multielementar instrumental de fluorescência de raios X por dispersão de energia (ED-XRF, *energy dispersive X-ray fluorescence*), técnica conhecida também como fluorescência de raios X não dispersiva.

Essa análise é baseada na medida das intensidades dos raios X emitidos pelos elementos químicos componentes da amostra, quando devidamente excitada por raios X emitidos por uma fonte radioativa. Quando um elemento de uma amostra é excitado, tende a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, e como consequência disto, os elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron, e esta energia é emitida na forma de um fóton de raio X, de energia característica e bem definida para cada elemento. Assim, de modo resumido, a análise por fluorescência de raios X consiste de três fases: excitação dos elementos que constituem

a amostra, dispersão dos raios X característicos emitidos pela amostra e detecção desses raios X.

A técnica de ED-XRF tem sido muito usada nos últimos anos, tanto para análise qualitativa quanto para quantitativa, podendo atingir limites de detecção da ordem de 1 a 20 mg.Kg⁻¹, para amostras sólidas (sem tratamento químico) e da ordem de 1 a 20 µg.Kg⁻¹ para amostras líquidas (com tratamento de pré concentração). O procedimento analítico pode ser verificado em Nascimento Filho (1999).

3.4.3 Análises no meio fermentado

3.4.3.1 Determinação da concentração de etanol no meio fermentado

Destilou-se de 25 mL de meio fermentado em destilador microkjeldhal. O destilado foi submetido a leitura densitométrica em densímetro digital, de acordo com protocolo descrito por Zago et al. (1989). Os resultados das análises foram expressos em % v/v.

3.4.3.2 Determinação do pH

O pH no meio fermentado delevurado foi determinado ao final do ensaio de cultivo celular, por medição direta em potenciômetro digital.

3.5 Tratamento dos resultados

3.5.1 Cálculo das velocidades específicas de crescimento celular (μ)

A determinação das velocidades específicas de crescimento celular foi efetuada através da construção de curvas $X = X(t)$, que é um dos métodos utilizados para cultivos descontínuos (Dias, 1982).

Os dados experimentais de crescimento de *S. cerevisiae* em sistema descontínuo, extraídos ao longo dos cultivos em intervalos de 3 horas, e sujeitos a flutuações, foram ajustados a uma tendência que representa bem o fenômeno em questão, através de “alisamento” dos pontos experimentais, que consistiu no ajuste manual da curva de crescimento em papel milimetrado, com auxílio de curva francesa, antes do cálculo das velocidades específicas de crescimento (μ) (Gombert, 2001). Dessa maneira, foi possível estimar os valores de concentração celular a cada hora de ensaio (valores alisados). A partir dos valores alisados, determinou-se as velocidades específicas de crescimento celular (μ), a partir de método geométrico de cálculo de derivadas, proposto por Le Duy & Zajic (1973), e adaptado para a planilha eletrônica em Microsoft Excel, conforme proposto por Gombert (2001). Os valores de μ foram expressos em h^{-1} .

4 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados em duas etapas. A primeira etapa compreende as curvas de crescimento e de velocidades específicas de crescimento celular (μ), e a segunda etapa contém os resultados das análises na biomassa produzida e no meio fermentado delevurado. Os resultados estão apresentados na forma de gráficos, construídos a partir dos valores médios de três repetições. Um quadro contendo todos os resultados experimentais obtidos encontra-se no apêndice.

4.1 Curvas de crescimento, e de velocidades específicas de crescimento celular (μ), no decorrer do cultivo descontínuo

Os resultados dos ensaios de cultivo celular estão apresentados na forma de gráficos de concentração celular no meio de cultura (X) em função do tempo (h), e de gráficos de velocidades específicas de crescimento celular (μ) em função do tempo.

4.1.1 Cultivo descontínuo da linhagem Fleischmann

As curvas de crescimento da linhagem Fleischmann, apresentadas na figura 9, possuem perfis muito semelhantes para os três tratamentos estudados. Nas primeiras horas de cultivo, os três tratamentos apresentaram valores de concentração celular muito próximos. Os cultivos permaneceram na fase lag até a 7^o h. A partir da

8° h de cultivo, os tratamentos contendo selenito foram superados pelo controle. Entre a 8° e a 10° h, o cultivo manteve-se em fase exponencial de crescimento. As máximas concentrações celulares atingidas foram de 2,62 g.L⁻¹ para o controle, no instante 15 h; 2,64 g.L⁻¹ e 2,45 g.L⁻¹ para os tratamentos 40 e 80 mg.L⁻¹ de selenito, respectivamente, no instante 18 h. O cultivo controle entrou em declínio na 15° h, e teve os níveis de concentração celular superados pelo tratamento 40 mg.L⁻¹ de selenito, ao final do ensaio, que ocorreu na 18° h.

Figura 9 - Curvas de crescimento da linhagem Fleischmann, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.

As curvas de velocidade específica de crescimento celular (μ), no decorrer do ensaio com a linhagem Fleischmann (figura 10), foram semelhantes desde o início, até a 5° h de cultivo. As velocidades máximas de crescimento celular (μ_M) foram verificados no instante 10 h, em torno de 0,37 e 0,27 h⁻¹, para os tratamentos controle e contendo selenito, respectivamente. Da 10° h em diante, as velocidades de crescimento caíram abruptamente, e no instante 16 h, observou-se que

o valor de μ do tratamento controle foi nulo. Posteriormente, as velocidades de crescimento do tratamento controle foram inferiores a zero, o que indica a ocorrência de morte celular.

Figura 10 - Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ) da linhagem Fleischmann, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.

4.1.2 Cultivo descontínuo da linhagem PE-2

As análises das curvas de crescimento da linhagem PE-2, no decorrer no cultivo descontínuo (figura 11), revelaram que o tratamento controle apresentou valores de concentração celular semelhantes aos tratamentos contendo selenito, desde o início até a 9° h de cultivo. Da 9° h de cultivo em diante, o tratamento controle superou os tratamentos contendo selenito, e manteve níveis de concentração celular superiores durante toda a fase exponencial de crescimento, até atingir a fase estacionária, na 18° h, quando verificou-se concentração celular máxima de 2,78 g.L⁻¹. Da 18° até a 21° h de cultivo, o tratamento controle apresentou decréscimo na concentração celular, e foi

alcançado pelos tratamentos contendo selenito. Os valores máximos de concentração celular atingidos pelos tratamentos 40 e 80 mg.L⁻¹ de selenito, foram de 2,7 e 2,6 g.L⁻¹, respectivamente, no instante 21 h (instante de encerramento do ensaio).

Figura 11 - Curvas de crescimento da linhagem PE-2, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontinuo.

A semelhança de comportamento no crescimento da levedura PE-2 (figura 12), também foi verificada nos gráficos de velocidade específica de crescimento celular (μ). Mas os valores de μ do tratamento controle foram superiores aos dos tratamentos contendo selenito até a 12° h de cultivo. O valor de μ_M foi de 0,29 h⁻¹ para o tratamento controle, no intervalo entre 11 e 12 h. Os tratamentos contendo selenito atingiram os mesmos valores de μ_M , entre 0,27 e 0,26 h⁻¹, no intervalo entre 12 e 13 h.

Figura 12 - Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ) da linhagem PE-2, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.

4.1.3 Cultivo descontínuo da linhagem KD1-88

O gráfico de X em função do tempo (figura 13), revelou que a linhagem KD1-88 apresentou valores de X praticamente constantes nas primeiras 5 h de cultivo. No intervalo entre a 3ª e a 6ª h, verificou-se ocorrência da fase de crescimento exponencial, e após a 15ª h, houve desaceleração no crescimento celular, que se manteve até a 19ª h de cultivo, quando a concentração celular se estabilizou, evidenciando o início da fase estacionária. Na 21ª h, o cultivo foi encerrado. As concentrações celulares máximas foram de 1,64; 1,41 e 1,12 g.L⁻¹, para os tratamentos controle, 40 e 80 mg.L⁻¹ de selenito, respectivamente.

Figura 13 - Curva de crescimento da linhagem KD1-88, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontinuo.

Os valores de μ durante o cultivo da linhagem KD1-88, apresentaram comportamento semelhante para os três tratamentos investigados (figura 14). Nas primeiras 2 h de cultivo, os valores de μ apresentaram forte elevação, e na 3ª h, foi estabelecido um patamar, onde o valor de μ_M foi atribuído ao tratamento 80 mg.L⁻¹ de selenito, próximo de 0,7 h⁻¹. Esse patamar se manteve até a 6ª h de cultivo. Após a 6ª h, os valores de μ de todos os tratamentos decresceram continuamente, até atingirem um valor mínimo na 21ª h, que coincidiu com o encerramento do cultivo.

Figura 14 - Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ) da linhagem KD1-88, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.

4.1.4 Cultivo descontínuo da linhagem KI.

As cinéticas de crescimento da linhagem KI estão apresentadas na figura 15, onde verifica-se que o cultivo manteve-se em fase lag desde o início até a 3° h, instante em que se deu início a fase de crescimento exponencial, e que se estendeu até a 6° h. Da 18° h em diante, o cultivo manteve-se em fase estacionária, e na 21° h, todos os tratamentos atingiram a máxima concentração celular, cujos valores corresponderam a 1,8; 1,4 e 1,2 g.L⁻¹, para os tratamentos controle, 40 e 80 mg.L⁻¹ de selenito, respectivamente.

Figura 15 - Curva de crescimento da linhagem KI, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.

As velocidades específicas de crescimento celular (μ) durante o cultivo da linhagem KI apresentaram elevação desde o início do ensaio, até alcançar um pico entre a 5° e a 7° h de cultivo, intervalo no qual o tratamento controle atingiu a velocidade máxima de 0,62 h⁻¹ (figura 16). A partir da 7° h, verificou-se redução contínua no valor de μ , até o encerramento do cultivo. Os valores de μ_M de 0,58 e 0,5 h⁻¹ foram atingidos pelos tratamentos 40 e 80 mg.L⁻¹ de selenito, respectivamente, na 5° h de cultivo.

Figura 16 - Curvas de velocidades específicas de crescimento celular (μ), da linhagem KI, cultivada a 30°C em meio de melaço com 6% de ART, em processo descontínuo.

4.2 Resultados das análises na biomassa produzida e no meio fermentado

A produção de biomassa no cultivo das linhagens produtoras de H_2S , não foi afetada pela presença de selenito, pois não verificou-se redução na produção de biomassa nos tratamentos 40 e 80 mg.L^{-1} de selenito (figura 17). Já as linhagens não produtoras de H_2S , apresentaram redução na produção de biomassa na presença de selenito, da ordem de 7 e 19,4 % para a linhagem KD1-88, e de 24,5 e 32% para a linhagem KI, nos tratamentos 40 e 80 mg.L^{-1} de selenito, respectivamente. As linhagens não produtoras de H_2S apresentaram menor produção de biomassa, quando comparadas com as produtoras de H_2S .

Figura 17 - Biomassa úmida (g), ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.

Os níveis de selênio acumulados pelas leveduras avaliadas, ao final dos ensaios de cultivo celular descontínuo, estão apresentados na figura 18.

Figura 18 - Concentração de selênio na matéria seca (mg.Kg^{-1}), ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.

Dentre as leveduras avaliadas, as linhagens Fleischmann e KD1-88 apresentaram maior concentração de selênio na matéria seca,

da ordem de 7510 e 7221 mg.Kg⁻¹ de selênio, respectivamente, no tratamento 80 mg.L⁻¹ de selenito.

A viabilidade celular das linhagens produtoras e não produtoras de H₂S, ao final do cultivo celular, não foi afetada pela presença de selenito, pois não houve diferença na viabilidade celular entre os tratamentos contendo selenito e o controle (figura 19).

Figura 19 - Viabilidade celular (%), ao final dos ensaios de cultivo descontinuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.

A presença de selenito no meio de melaço causou redução na taxa de brotamento celular das linhagens produtoras e não produtoras de H₂S (figura 20). No tratamento 80 mg.L⁻¹, verificou-se redução de 18; 23,3; 19 e 23% na taxa de brotamento celular das linhagens Fleischmann, PE-2, KD1-88 e KI, respectivamente, ao final dos ensaios de cultivo descontinuo.

Figura 20 - Taxa de brotamento celular (%), ao final do cultivo descontínuo da linhagem KD1-88 a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.

A produção de etanol pelas linhagens produtoras de H_2S não foi afetada pelo selenito, pois houve redução inferior a 2% no teor alcoólico do meio fermentado nos tratamentos contendo selenito, ao final do cultivo celular das linhagens Fleischmann e PE-2 (figura 21).

Figura 21 - Teor alcoólico no meio fermentado (% v/v), ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C, em meio de melaço com 6% de ART.

As linhagens não produtoras de H_2S KI e KD1-88, no entanto, apresentaram redução na síntese de etanol de 9,3 e 5,4%, respectivamente, na presença de 40 mg.L^{-1} de selenito, e redução de 12,9 e 17,3%, respectivamente, na presença de 80 mg.L^{-1} de selenito. As linhagens não produtoras de H_2S apresentaram menor síntese de etanol que as linhagens produtoras de H_2S .

A presença de selenito no meio de cultura não afetou o pH no meio fermentado, pois não houve diferença entre os valores de pH dos tratamentos contendo selenito e o controle (figura 22). Verificou-se também que os cultivos das linhagens não produtoras de H_2S causaram maior redução do pH no meio fermentado, quando comparados com o pH no meio fermentado obtido do cultivo das linhagens produtoras de H_2S .

Figura 22 - pH no meio fermentado de levedurado, ao final dos ensaios de cultivo descontínuo a 30°C , em meio de melaço com 6% de ART.

5 DISCUSSÃO

O selênio foi considerado um elemento não essencial e pouco tóxico em *S. cerevisiae*, concordando com White & Munns, (1951), e Berdicevsky et al. (1993), pois níveis de 40 e 80 mg.L⁻¹ de selenito reduziram o crescimento celular, a produção de biomassa, e a síntese de etanol pelas linhagens de *S. cerevisiae* não produtoras de H₂S. Algumas vias metabólicas afetadas pelo selênio justificam o efeito desse elemento na redução da produção de biomassa, e na síntese de etanol. O selenito inibe a via glicolítica ao provocar a oxidação da glutathione (Potter & Elvehøyen, 1936), afeta as vias oxidativas do etanol e do ácido acético em leveduras (Potter & Elvehøyen, 1937), e inibe a absorção de O₂ na presença de glicose, frutose e manose, devido a obstrução da atividade da enzima succinato desidrogenase (Fels & Cheldelin, 1948). Segundo Fels & Cheldelin (1949), a toxidez do selenato em leveduras é regulada por um mecanismo de inibição competitiva entre sulfato e selenato, que resulta no bloqueio da síntese de metionina. O selenito também inibe a oxidação de glicose por linhagens de *C. albicans* suscetíveis ao selenito (Falcone & Nickerson, 1963). Em linhagens resistentes, o selenito provocou menor inibição na respiração celular, e liberação excessiva de CO₂. A fermentação dos carboidratos endógenos e exógenos pela linhagem de *C. albicans* resistente não foi inibida pelo selenito, mas na linhagem sensível, o selenito estimulou a fermentação das reservas endógenas, e bloqueou a fermentação da glicose exógena (Falcone & Nickerson, 1963).

A inibição do crescimento das leveduras não produtoras de H₂S foi diretamente proporcional à concentração de selenito no meio de cultura, em concordância com Wilson et al. (1992), e Bronzetti et al. (2001). A redução na taxa de brotamento celular está associada à ocorrência de fragmentações na fita simples do DNA, causada pela ação do peróxido de hidrogênio (PH), produto da reação entre selenito e glutathione reduzida (Wilson et al., 1992; Pinson et al., 2000; Bronzetti et al., 2001). Bronzetti et al. (2001) relataram a ocorrência de conversões mitóticas e de mutações pontuais em leveduras, cultivadas na presença de selenometionina e selenito, em fase exponencial e estacionária de crescimento, sendo que esses eventos tiveram maior incidência na fase exponencial.

Pinson et al. (2000) confirmaram a ocorrência de fragmentação apenas na fita simples de DNA de leveduras, ao verificarem que mutações nos genes que codificam a maquinaria de reparo da fita dupla do DNA (*RAD51* e *RAD52*), rompida pelo estresse oxidativo, não aumentaram a sensibilidade de leveduras ao selenito. Outros genes ligados a reparos de injúrias oxidativas ao DNA (*OGG1*, *NTG1*, *NTG2* e *APN1*), não reduziram a toxidez pelo selenito. Os danos ao DNA causados pelo selenito, não são reparados pelos sistemas de reparo de excisão nucleotídica (NER), de reparo de excisão basal (BER), nem por outras vias recombinantes, mas são convertidos a mutações por meio da proteína *Rev3p* DNA polimerase, possibilitando a continuidade do ciclo celular, por meio da replicação mutagênica do DNA danificado (Pinson et al., 2000).

As linhagens produtoras de H₂S não tiveram o crescimento celular e a produção de biomassa afetados pelo selenito, mas apresentaram atraso no crescimento celular. O selenito apresentou efeito tóxico crescente com o decorrer do tempo, concordando com

Potter & Elvehøyen (1936). Verificou-se também que os tratamentos contendo selenito cresceram mais lentamente na fase exponencial, e entraram na fase estacionária numa concentração celular inferior ao tratamento controle, em concordância com Pinson et al. (2000). Esses autores observaram que na 4^ª h de cultivo de leveduras em meio YPD contendo 5 mM de selenito, 60% das células estavam ligadas a grandes brotos, sendo que no cultivo sem selenito, todos os estágios do ciclo celular foram encontrados. Análises de microscopia de epifluorescência realizadas por Pinson et al. (2000) revelaram que, dentre as células ligadas a grandes brotos em pré-anáfase, 71% dos brotos apresentavam uma região manchada no interior da célula, e 18% apresentavam duas regiões manchadas distintas, uma na célula mãe e outra na célula filha, o que indicou que o último estágio do ciclo celular antes da citocinese, foi retardado pelo selenito. Esse efeito é atribuído a injúrias ao gene *RAD9* causado pelo peróxido de hidrogênio, produzido durante a redução do selenito (Pinson et al., 2000).

Os genes *GLR1* e *SSU1*, super expressados em leveduras cultivadas na presença de selenito, estão envolvidos no processo de defesa celular contra o selenito (Pinson et al., 2000). A super expressão do gene *GLR1*, envolvido na síntese de glutathione redutase, aumentou o crescimento celular de *S. cerevisiae* na fase exponencial, mas teve efeito apenas na linhagem selvagem. Resistência parcial ao selenito pela super expressão do gene *SSU1*, foi verificada tanto na linhagem selvagem, quanto na linhagem que sofreu deleção *ycf1*. Esse efeito foi acompanhado por aumento de concentração celular na fase estacionária. O gene *SSU1* codifica a proteína *Ssu1p* da membrana plasmática, envolvida na desintoxicação do sulfito. A função exata dessa proteína não foi elucidada, mas especula-se sua participação no defluxo do selenito para o exterior da célula, reduzindo a concentração

intracelular desse elemento (Pinson et al., 2000). A super expressão simultânea dos genes *GLR1* e *SSU1* em um vetor multicópias, ou em plasmídios separados, causou resistência ao selenito maior que a observada com a expressão desses genes separadamente, o que demonstra seu efeito aditivo na resistência ao selenito (Pinson et al., 2000).

A ausência de efeito do selenito no crescimento celular, e na produção de biomassa pelas linhagens produtoras de H_2S , é justificada pelo mecanismo de produção de H_2S , que confere às linhagens produtoras maior resistência ao selenito, pois o sulfeto produzido liga-se ao selenito, tornando-o inerte, reduzindo assim a intoxicação da levedura pelo selênio (Volesky, 1990).

A formação de biomassa avermelhada, e a liberação de odor desagradável pelos tratamentos contendo selenito, indicam a ocorrência de absorção do selenito pelas linhagens produtoras e não produtoras de H_2S , durante os ensaios de cultivo descontínuo. Depois de absorvido pelas leveduras produtoras e não produtoras de H_2S , o selenito foi reduzido a selênio elementar, e posteriormente a seleneto. A partir dos resultados experimentais, e das informações obtidas na literatura, formulou-se a seguinte hipótese quanto ao mecanismo de toxidez causado pelo selenito em leveduras:

Quando os teores de selenito no substrato resultam em níveis celulares de seleneto que excedem a demanda da levedura por esse elemento, um mecanismo de desintoxicação é ativado, fazendo com que uma parte do seleneto excedente, que não foi incorporado em aminoácidos sulfurados em substituição ao enxofre, fosse oxidado à forma elementar (de baixa toxicidade), e acumulado no vacúolo celular como um precipitado vermelho, e o restante, fosse eliminado na forma de compostos voláteis, como seleneto de hidrogênio (H_2Se).

O acúmulo de selênio elementar, evidenciado pela formação de biomassa avermelhada, também foi observado em *C. albicans* e *C. tropicalis* por Berdicevsky et al. (1993); em *Lactobacillus* por Calomme et al. (1995) e Diowksz et al. (1999); em *Penicillium* por Brady et al. (1996); e em *S. cerevisiae* por Berdicevsky et al. (1993); Gharieb & Gadd (1998); Diowksz et al. (1999); Pinson et al. (2000); e Bronzetti et al. (2001). O selênio elementar acumulado foi formado a partir da oxidação do selenito pelo O₂ atmosférico (Nuttall & Allen, 1984a). Segundo Zhil'tsova et al (1996), a quantidade de selênio acumulada por leveduras está associada com a atividade da enzima glutathione peroxidase e glutathione reductase, pois linhagens de leveduras que apresentaram alta atividade dessas enzimas, apresentaram maior acúmulo de selênio.

A formação de biomassa vermelha, causada pela conversão do selenito a selênio elementar, só foi verificada na fase de declínio do crescimento celular, concordando com o verificado em *Penicillium* sp por Brady et al. (1996). O destino do selênio elementar formado a partir do selenito excedente absorvido, é o vacúolo celular (Gharieb & Gadd, 1998; Pinson et al., 2000; Bronzetti et al., 2001). Ao investigar o comportamento de mutantes fisiológicos e morfológicos de *S. cerevisiae*, anômalos na formação do vacúolo celular, na presença dos íons telurito, selenito e cromato, Gharieb & Gadd (1998) observaram que mutantes desprovidos de vacúolo celular, ou com vacúolo defeituoso, acumularam níveis de selênio inferiores aos atingidos pelos parentais, o que evidencia que a tolerância da levedura a esse elemento, está relacionada com a capacidade do conteúdo citossólico em converter o selenito absorvido à selênio elementar.

Pinson et al. (2000) verificaram que o gene *YCF1*, que codifica uma bomba transportadora de cádmio no vacúolo, também está

envolvido no mecanismo de toxidez ao selenito, pois mutantes *ycf1* expostos a 3 e 5 mM de selenito, foram mais resistentes que a linhagem selvagem. Uma explicação para o aumento na resistência de leveduras ao selenito é que, em células portadoras de *Ycf1p*, o selenito é transportado no vacúolo como um conjugado de glutathione, causando esgotamento dos estoques citoplasmáticos dessa enzima. Enquanto mais selenito presente no meio de cultura for assimilado pela célula, a glutathione, seqüestrada no vacúolo, não poderia ser eficientemente regenerada. Já em mutantes *ycf1p*, a maior parte da glutathione reduzida estaria disponível para a redução do selenito citoplasmático. A super expressão do *GLR1*, que codifica a glutathione redutase, acompanhada de mutações no gene *YCF1*, não surtiu efeito aditivo no mecanismo de resistência ao selenito (Pinson et al., 2000).

O restante do seleneto absorvido que não foi convertido na forma elementar, e acumulado no vacúolo das linhagens produtoras e não produtoras de H_2S , foi eliminado por volatilização. A liberação de compostos voláteis de selênio por leveduras foi evidenciada pela formação de odor desagradável nos tratamentos contendo selenito, a partir da fase exponencial de crescimento. O composto liberado não foi identificado, mas conforme verificado por Gharieb & Gadd (1998), trata-se de seleneto de hidrogênio (H_2Se), que é a forma mais reduzida de selênio encontrada na natureza (Milne, 1998), e é volátil nas condições ambientais (Chasteen, 1998). Gharieb & Gadd (1998) verificaram liberação de H_2Se por *S. cerevisiae* cultivada na presença de selenito. Fungos *Penicillium* sp, cultivados na presença de selenito por Brady et al. (1996), liberaram 9% do selenito absorvido na forma de dimetilseleneto, sendo que 3,7% foi liberado durante a fase lag e exponencial, e o restante, durante a fase estacionária e de declínio.

A viabilidade celular das linhagens de leveduras não produtoras de H_2S , não foi afetada pela presença de selenito, em desacordo com Pinson et al. (2000); e Bronzetti et al. (2001), que verificaram queda significativa na viabilidade celular de leveduras cultivadas em meio sintético contendo selenito. Segundo White & Munns (1951), a toxidez exercida pelo selenito em leveduras, é atenuada quando parte dos açúcares do meio de cultura, são substituídos por meio de malte ou de melaço, pois constituintes desses substratos adsorvem e precipitam elementos tóxicos, reduzindo os efeitos prejudiciais desses elementos na célula.

A presença de selenito não afetou a síntese de etanol pelas leveduras produtoras de H_2S . É possível, entretanto, que a toxidez causada por elevados níveis de etanol em *S. cerevisiae*, seja potencializada pelo selenito, pois Dilsiz et al. (1997) verificaram que 1 mg.L^{-1} de selenito afetou a composição da membrana plasmática de *S. cerevisiae*, provocando elevação no teor de ácidos graxos saturados, e redução no teor de ácidos graxos insaturados. Essa proposição é fundamentada pela existência de forte relação entre tolerância ao etanol e a natureza dos ácidos graxos e esteróis da membrana plasmática de *S. cerevisiae*, conforme revisado por Walker (1998).

A ausência de efeito do selenito na síntese de etanol em leveduras produtoras de H_2S , é explicada pela ocorrência de inibição na respiração aeróbia, devido a obstrução da atividade da enzima succinato desidrogenase (Potter⁷, citado por Potter & Elvehyen, 1937; Fels & Cheldelin, 1948; Falcone & Nickerson, 1963). O selenito também inibe as vias oxidativas do etanol e do ácido acético em leveduras (Potter & Elvehyen, 1937), e estimula a fermentação das reservas endógenas, sem afetar a fermentação da glicose exógena em linhagens

⁷ POTTER, V.R. Thesis, University of Wisconsin, 1936.

de *C. albicans* resistentes ao selenito (Falcone & Nickerson, 1963). Esses efeitos são considerados estimulantes à síntese de etanol.

As linhagens não produtoras de H_2S , foram consideradas pouco resistentes ao selenito, pois apresentaram redução na síntese de etanol, quando cultivadas na presença de selenito. A redução na síntese de etanol é explicada pelo crescimento celular reduzido, conforme verificado nos resultados experimentais. A inibição da oxidação da glicose exógena por linhagens de *C. albicans* suscetíveis ao selenito, verificada por Falcone & Nickerson (1963), pode também ocorrer em *S. cerevisiae* suscetíveis ao selenito, justificando a redução na síntese de etanol.

A redução do pH do mosto de melaço, verificada ao término dos ensaios de cultivo celular, favorece a absorção do selenito pelas linhagens de leveduras cultivadas, pois de acordo com Szabo et al. (1991), a redução do pH influencia favoravelmente a taxa de absorção do selênio por leveduras cultivadas em substratos de diferentes composições.

O processo de cultivo de selenoleveduras proposto nesse trabalho é de fácil execução, e pode ser realizado numa escala mais ampla, com resultados muito satisfatórios. Sugerimos, no entanto, a realização de estudos visando a otimização do processo, e a investigação de cultivos em sistemas contínuos e aerados. É de fundamental importância o monitoramento das variáveis X e concentração de substrato (S), no decorrer do cultivo, o que possibilita o cálculo da produtividade e do fator de conversão de substrato à células, parâmetros essenciais para a avaliação do sistema.

O monitoramento da taxa de brotamento celular, foi realizado apenas ao término dos ensaios de cultivo descontínuo, e não durante, devido ao desconhecimento da ocorrência de atraso de desligamento

entre célula mãe e broto de *S. cerevisiae*, induzido pelo selenito. Somente tomou-se conhecimento da existência de efeito do selenito na taxa de brotamento celular, através da leitura do artigo de Pinson et al. (2000), feita durante a última etapa do levantamento bibliográfico, após a conclusão da fase de laboratório. Recomendamos, portanto, que em novas investigações, esse parâmetro seja monitorado durante todo o cultivo celular. Segue-se abaixo outras sugestões para novas investigações sobre o desenvolvimento de processos para produção de selenoleveduras:

- Utilizar concentrações de selenito inferiores 40 mg.Kg⁻¹;
- Utilizar concentrações de ART no substrato superiores a 6%;
- Investigar a relação entre liberação de H₂Se com deficiência de nitrogênio;
- Investigar o envolvimento das enzimas relacionadas com o metabolismo do enxofre no mecanismo de redução do selenito.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho, em que foram avaliados os efeitos do selênio no cultivo descontínuo de linhagens de *S. cerevisiae*, produtoras e não produtoras de H_2S , permitem concluir que:

6.1 O selênio foi considerado um elemento moderadamente tóxico para *S. cerevisiae*, pois verificou-se que níveis de 40 e 80 mg.L⁻¹ desse elemento no meio de cultura, não causaram intoxicação aguda nas linhagens de leveduras produtoras de H_2S , mas reduziram a taxa de brotamento celular. As linhagens não produtoras de H_2S , além da redução na taxa de brotamento celular, apresentaram redução na produção de biomassa, e na produção de etanol.

6.2 As linhagens produtoras de H_2S , apresentaram melhor performance em todos os parâmetros avaliados, quando comparadas com as linhagens não produtoras de H_2S . Conclui-se, portanto, que as linhagens produtoras de H_2S , são mais tolerantes a elevadas concentrações de selenito no meio de cultura.

6.3 O acúmulo de selênio não é afetado pela característica de produção de H_2S , pois verificou-se que as linhagens produtoras de H_2S acumularam níveis de selênio muito próximos daqueles acumulados pelas linhagens não produtoras de H_2S .

6.4 Os maiores valores de μ , foram verificados nos cultivos das linhagens não produtoras de H_2S . Esses valores não resultaram em maior crescimento celular, pois os valores médios de μ , apresentados

pelas linhagens produtoras de H_2S durante o cultivo celular, foi superior aos valores médios de μ , determinados nos cultivos das linhagens não produtoras de H_2S .

6.5 O teor total máximo de selênio encontrado em leveduras foi da ordem de 7500 mg de selênio por Kg de matéria seca. Esses teores englobam todas as formas de selênio absorvidos pela levedura, além do selênio retido na parte externa da parede celular.

6.6 As linhagens produtoras de H_2S , apresentaram maior capacidade de síntese de etanol na ausência de selênio, quando comparadas com as linhagens não produtoras de H_2S . A presença de selênio, no entanto, não afetou produção de etanol pelas linhagens produtoras de H_2S , entretanto, as linhagens não produtoras de H_2S , apresentaram queda na produção de etanol, quando cultivadas na presença de selenito.

6.7 A formação de biomassa vermelha, e a liberação de odor desagradável pelos tratamentos contendo selênio, verificada em todas as linhagens de leveduras cultivadas, evidenciou a ocorrência de redução do selenito a selênio elementar (Se^0), estado de valência no qual o selênio apresenta cor vermelha. Parte do selenito absorvido também foi reduzido a Se^{-2} , e não tendo sido incorporado em aminoácidos sulfurados, foi eliminado na forma de compostos voláteis de selênio, causadores de odor desagradável.

6.8 O pH do vinho delevurado, apresentou decréscimo durante o cultivo celular. Esse decréscimo não está relacionada com a presença do selenito, pois os valores de pH dos tratamentos contendo selenito, não diferiram do pH dos tratamentos controle correspondentes. As linhagens não produtoras de H_2S , causaram queda mais acentuada no pH do vinho, quando comparadas com as linhagens produtoras de H_2S . A queda do pH, é decorrente do metabolismo oxidativo da glicose por

leveduras, principalmente através das vias de Embden-Meyerhof-Parnas; glicolítica e ciclo de Krebs, cujos principais produtos são ácidos orgânicos, como ácido málico e ácido pirúvico, que são excretados por leveduras, e promovem queda do pH no meio de cultura.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARTHUR, J.R.; NICOL, F. BECKETT, G.J. Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. **Biochemical Journal**, v.272, p.537-540, 1990.
- BANDURSKI, R.S.; WILSON, L.G.; SQUIRES, C.L. The mechanism of "active sulfate" formation. **Journal of American Chemical Society**, v.78, p.6408-6409, 1956.
- BAUM, M.K. Micronutrient status in relationship to mortality in HIV-1 disease. **Nutrition**, v.13, n.3, p.273, 1997.
- BECKETT, G.J.; BEDDOWS, S.E. MORRICE, P.C. et al. Inhibition of hepatic deiodination of thyroxine is caused by selenium deficiency in rats. **Biochemical Journal**, v.248, p.443-447, 1987.
- BERDICEVSKY, I.; DUEK, L.; MERSBACH, D.; YANNAI, S. Susceptibility of different yeast species to environmental toxic metals. **Environmental Pollution**, v.80, p.41-44, 1993.
- BLAU, M. Biosynthesis of [⁷⁵Se]selenomethionine and [⁷⁵Se]selenocysteine. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.49, p.389-390, 1961.
- BRADY, J.M.; TOBIN, J.M.; GADD, G.M. Volatilization of selenite in aqueous medium by a *Penicillium* species. **Mycological Research**, v.100, n.8, p.955-961, 1996.
- BRETON, A.; SURDIN-KERJAN, Y. Sulfate uptake in *Saccharomyces cerevisiae*: Biochemical and genetic study. **Journal of Bacteriology**, v.132, p.224-232, 1977.
- BRONZETTI, G.; CINI, M.; ANDREOLI, E.; CALTAVUTURO, L. PANUNZIO, M.; DELLA CROCE, C. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. **Mutation Research**, v.496, p.105-115, 2001.

- BUTOLO, E.A.F. Uso de levedura desidratada na nutrição de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997. p.51-83.
- CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. Composição centesimal de levedura integral (*Saccharomyces cerevisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.17, p.102-106, 1997.
- CALOMME, M.R.; BRANDEN, K. Van Den; BERGHE, D.A.V. Selenium and *Lactobacillus* species. **Journal of Applied Bacteriology**, v.79, p.331-340, 1995.
- CENTRO DE DIVULGAÇÃO CIENTÍFICA E CULTURAL. **Selênio**. <http://www.cdcc.sc.usp.br/elementos/selenio.html> (26 fev. 2002)
- CHASTEEN, T.G. Volatile chemical species of selenium. In: FRANKENBERGER, W.T.JR.; ENGBERG, R.A. **Environmental chemistry of selenium**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.589-612.
- CHEREST, H.; SURDIN-KERJAN, Y.; ANTONIEWSKI, J.; DE ROBICHON SZULMAJSTER. S-adenosil methionine-mediated repression of methionine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Jornal of Bacteriology**, v.114, n.3, p.928-933, 1973.
- CHEREST, H.; SURDIN-KERJAN, Y. Mutation conferring cysteine auxotrophy in *Saccharomyces cerevisiae*: Updating of sulfur metabolism pathway. **Genetics**, v.130, p.51-58, 1991.
- COOPER, T.G. Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. In: STRATHERN, J.N.; BROACH, J.R.; JONES, E.W. **The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae***. New York: Cold Spring Harbor, 1982. v.1, p.399-462.
- COSTA, E.; SGARBIERI, V.C. Uso de levedura íntegra e de derivados de levedura na alimentação humana. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997. p.129-149.

- CZAUDE RNA, M.; SIERAKOWSKA, S.; SITOWSKA, B. Use of INAA to study Se, Sb, Zn and Co levels of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry Articles**, v.46, p.1295-1298, 1995.
- CZAUDE RNA, M.; TURSKA, SITOWSKA, B. Use of INAA to study the determination of Se, Th, Zn, Co and Fe levels of yeast cells. **Applied Radiation and Isotopes**, v.47, n.1, p.105-110, 1996a.
- CZAUDE RNA, M.; TURSKA, M.; SIERAKOWSKA, S.; SMOLINSKY, S. Use of INAA to study the interaction between Se and Te in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Radiation and Isotopes**, v.47, n.2, p.153-157, 1996b.
- DE ROBICHON-SZULMAJSTER, H.; CHEREST, H. Regulation of homoserine O-transacetylase: first step in methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.28, n.2, p.256-262, 1967.
- DEMIRCI, A.; POMETTO, A.L. Production of organically bound selenium yeast by continuous fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.2491-2495, 1999.
- DEMIRCI, A.; POMETTO, A.L. COX, D.J. Enhanced organically bound selenium yeast production by fed batch fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.2496-2500, 1999.
- DIAS, J.M.C.S. Aplicação do método dinâmico de medida da velocidade específica máxima de crescimento celular na fermentação alcoólica contínua de mosto de melaço. São Paulo, 1982. 225p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- DIFCO manual: dehydrated culture media and reagents for microbiology. Detroit: Difco Laboratories, 1984. 1155p.
- DILSIZ, N.; ÇELİK, S.; YILMAZ, O.; DIGRAK, M. The effects of selenium, vitamin E and their combination on the composition of fatty acids and proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Cell Biochemistry and Function**, v.15, p.265-269, 1997.

- DIOWKSZ, A.; WOJCIECH, A.; WLODARCZIK, M. Investigation of the ability of selenium accumulation by lactic acid bacteria of *Lactobacillus* species and yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v.8, n.1, p.17-21, 1999. /Resumo/
- DOIN, P.A. Fermentação contínua. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. p.112-136.
- DIETARY reference intake for vitamin C, vitamin E, selenium and carotenoids. Washington: National Academy Press, 2000. 505p.
- FALCONE, G.; NICKERSON, W.J. Reduction of selenite by intact yeast cells and cell-free preparations. **Journal of Bacteriology**, v.85, p.754-762, 1963.
- FELS, I.G.; CHELDELIN, V.H. Methionine in selenium poisoning. **Journal of Biological Chemistry**, v.176, p.819-828, 1948.
- FELS, I.G.; CHELDELIN, V.H. Selenate inhibition studies. III. The role of sulfate in selenate toxicity in yeast. **Archives in Biochemistry**, v.22, p.402-405, 1949.
- GHARIEB, M.M; GADD, G.M. Evidence for the involvement of vacuolar activity in metal tolerance: Vacuolar-lacking and defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* display higher sensitivity to chromate, tellurite and selenite. **Biometals**. v.11, n.2, p.101-106, 1998. /Resumo/
- GHIRALDINI, A, ROSSELL, R. Caracterização e qualidade da levedura desidratada para alimentação animal. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997. p.27-50.
- GITLER, C.; SUNDE, M.L.; BAUMANN, C.A. Necrogenic potency of yeast growth on various media. **Journal of Nutrition**, v.63, p.399-408, 1957.
- GOMBERT, A.K. Cinética de processos fermentativos. In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia industrial**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v.2, p.114-122: Apêndice.

- HAAS, H.J.; VELTEN, M. Selenoproteins in mitochondria and cytosol of *Saccharomyces uvarum* after growth in sodium selenite-supplemented media. **Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease**, v.6 p.71-74, 1992. /Resumo/
- HALÁSZ, A; LÁSZTITY, R. **Use yeast biomass in food production**. Boca Raton: CRC Press, 1991. 312p.
- HANSEN, J.; KIELLAND-BRANDT, M.C. Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases the level of sulfite in beer. **Journal of Biotechnology**, v.50, p.75-87, 1996.
- HEINZEL, M.A.; TRUEPER, H.G. Sulfite formation by wine yeasts: Regulation of biosynthesis of ATP and ADP sulfurylase by sulfur and selenium compounds. **Archives of Microbiology**, v.118, p.243-247, 1978.
- HSICH, H.S.; GANTHER, H.E. Acid-volatile selenium formation catalyzed by glutathione reductase. **Biochemistry**, v.14, n.8, p.1632-1636, 1975.
- IP, C. Selenium and experimental cancer. **Annals of Clinical Research**, v.18, p.22-29, 1986.
- ISAKOVA, E.P.; GORPENKO, L.V.; ZINCHENKO, G.A.; BELOV, A.P. Accumulation of selenium by yeasts of the genus *Candida*. **Microbiology**, v.65, p.171-175, 1996.
- JACOB, C.; MARET, W.; VALLEE, B.L. Ebselen, a selenium-containing redox drug, releases zinc from metallothionein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.248, p.569-573, 1998a.
- JACOB, C.; MARET, W.; VALLEE, B.L. Control of zinc transfer between thionein, metallothionein, and zinc proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.3489-3494, 1998b.
- JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.2, p.461-467, 1995.

JIRANEK, V.; LANGRIDGE, P.; HENSCHKE, P.A. Sulfite reductase activity and its response to nitrogen status in a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast. **Journal of Applied Bacteriology**, v.81, p.329-336, 1996.

JORNALCANA. <http://www.canaweb.com.br/conteudo/DadoseEstatisticas.htm> (05 out. 2001)

KAIM, W.; SHWEDERSKI, B. **Bioinorganic chemistry**: inorganic elements in the chemistry of life. Chichester: Wiley-Interscience, 1994. 401p.

KELLEHER, W.J.; GITLER, C.; SUNDE, M.L.; BAUMANN, C.A. Antinecrogenic property of torula yeast treated in various ways. **Journal of Nutrition**, v.67, p.433-444, 1957.

KORHOLA, M.; VAINIO, A.; EDELMANN, K. Selenium yeast. **Annals of Clinical Research**, v.18, p.65-68, 1986.

KORHOLA, M.; EDELMANN, K. Yeast preparations enriched with trace elements. **Acta Pharmacology and Toxicology**, p.148-151, 1986.

LEDUY, A.; ZAJIC, J.E. A geometrical approach for differentiation of an experimental function at a point: Applied to growth and product formation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.15, p.805-810, 1973.

LIPMANN, F. Biological active sulfate activation and transfer. **Science**, v.128, p.575-581, 1958.

McCREADY, R.G.L.; DIN, G.A. Active sulfate transport in *Saccharomyces cerevisiae*. **FEBS Letters**, v.38, n.3, p.361-363, 1974.

MARET, W.; VALLEE, B.L. Thiolate ligands in metallothionein confer redox activity on zinc clusters. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.95, p.3478-3482, 1998.

MILNE, J.B. The uptake and metabolism of inorganic selenium species In: FRANKENBERGER, W.T.; ENGBERG, R.A. In: **Environmental chemistry of selenium**. New York: Marcel Dekker, 1998. p.459-477.

- MUDD, S.H.; CANTONI, G.L. Selenomethionine in enzymatic transmethylations. **Nature**, v.180, n.45, p.1052, 1957.
- NASCIMENTO FILHO, V.F. Técnicas analíticas nucleares de fluorescência de raios x por dispersão de energia (ED-XRF) e por reflexão total (TXRF). Piracicaba: ESALQ/CENA, 1999. 99p. http://web.cena.usp.br/apostilas/Virgilio/cen5723/EDXRF_TXRF.doc (21 jun. 2002)
- NUTTALL, K.L.; ALLEN, F.S. Redox reactions of hydrogen selenide ion. **Inorganic Chimica Acta**, n.92, p.33-36, 1984a.
- NUTTALL, K.L.; ALLEN, F.S. Kinetics of the reaction between hydrogen selenide ion and oxygen. **Inorganic Chimica Acta**, n.91, p.243-246, 1984b.
- OGAWA, K.; SAITO, J.; TAKI, K.; NOZAKI, T. Synthesis of selenium labeled compounds I. The rapid biosynthesis of selenomethionine. **Kitassato Archives of Experimental Medicine**, v.58, n.1-2, p.37-44, 1985.
- PAMBOUKIAN, C.R.D. Influência das condições de preparo do inóculo na morfologia do microrganismo e na síntese de glicoamilase por *Aspergillus awamori*. São Paulo, 1997. 189p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo.
- PAULMIER, C. Selenium reagents and intermediates in organic synthesis. In: PAULMIER, C. **General aspects of selenorganic chemistry**. Oxford: Pergamon Press, 1986. p.4-24.
- PINOTTI, E.A.F. Situação atual e perspectivas de produção da indústria sucro alcooleira - Levedura. In: SIMPÓSIO SOBRE TECNOLOGIA DA PRODUÇÃO E UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA DESIDRATADA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, Campinas, 1997. **Anais**. Campinas: CBNA, 1997. p.1-5.
- PINSON, B.; SAGOT, I.; DAIGNAN-FORNIER, B. Identification of genes affecting selenite toxicity and resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Microbiology**, v.36, n.3, p.679-687, 2000.
- POTTER, V.R.; ELVEHJEM, C.A. The effect of selenium on cellular metabolism. The rate of oxygen uptake by living yeast in the presence of sodium selenite. **Biochemical Journal**, v.30, p.189-196, 1936.

- POTTER, V.R.; ELVEHJEM, C.A. The effect of inhibitors on succinoxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v.117, p.341-349, 1937.
- PRABHAKARARAO, K.; NICHOLAS, J.D. Sulphite reductase from baker's yeast: a haemoflavoprotein. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.180, p.253-263, 1969.
- REED, G.; PEPPLER, H. **Yeast technology**. Wetsport: The AVI Publishing Company, 1973. 378p.
- REILLY, C. Selenium in health and diseases I: the agricultural connection In: REILLY, C. **Selenium in food and health**. Cornwall: Blackie Academic & Professional, 1996. p.86-109.
- ROBBINS, P.W.; LIPMANN, F. Identification of enzymatically active sulfate as adenosine-3'-phosphate-5'-phosphosulfate. **Journal of American Chemical Society**, v.78, p.2652-2653, 1956.
- ROTRUCK, J.T.; POPE, A.L.; GANTHER, H.E.; HAFEMAN, D.G.; SWASON, A. B.; HOEKSTRA, W. G. Selenium, biochemical role as a component of glutathione peroxidase. **Science**, v.179, p.588-590, 1973.
- SARWAR, G.; SHAH, B.G.; MONGEAU, R.; HOPPNER, K. Nucleic acid, fiber and nutrient composition of inactive dried food yeast products. **Journal of Food Science**, v.50, p.353-357, 1985.
- SCHWARTZ, K.; FOLTZ, C.M. Selenium as an integral part of factor 3 against necrotic liver degeneration. **Journal of American Chemical Society**, v.79, p.3292-3293, 1957.
- SILVA, D.J. **Análise de alimentos: métodos químicos e biológicos**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1990. 165p.
- STRATFORD, M.; ROSE, A.H. Hidrogen sulphide production from sulphite by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of General Microbiology**, v.131, p.1417-1424, 1985.
- SZABO, G.; BARKOCZAI, L.; JANZSO, B.; SUHAJDA, A. Yeasts enriched with microelements. **Szeszipar**, v.39, n.1, p.13-14. 1991, /Resumo/

- TWEEDIE, J.W.; SEGEL, I.H. Specificity of transport process for sulfur, selenium, and molybdenum anions by filamentous fungi. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.196, p.95-106, 1970.
- VOLESKY, B. **Biosorption of heavy metals**. Boca Raton: CRC Press, 1990. 396p.
- ZAGO, E.; AMORIM, H.V.; BASSO, L.C. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool**. Piracicaba: FERMENTEC/CEBTEC/ESALQ, 1989. 144p.
- ZHIL'TSOVA, T.S.; SHAGOVA, M.V.; GRADOVA, N.B.; GOLUBKINA, N.A. Resistance to selenium compounds in yeast of genus *Candida*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.32, n.5, p.511-513, 1996.
- ZHIL'TSOVA, T.S.; BELOV, A.P.; GRADOVA, N.B. Accumulation and distribution of selenium in selenium enriched yeast cells of the genus *Candida*. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v.34, n.2, p.170-172, 1998.
- WALKER, G.M. **Yeast physiology and biotechnology**. New York: John Wiley & Sons, 1998. 350p.
- WANG, D.I.C.; COONEY, C.L.; DEMAINE, A.L.; DUNNILL, P.; HUMPHREY, A.E.; LILLY, M.D. **Fermentation and enzyme technology**. New York: Wiley-Interscience, 1979. 374p.
- WHITE, J.; MUNNS, D.J. Inhibitory effect of common elements towards yeast growth. **Journal of Institute of Brewing**, v.57, p.175-179, 1951.
- WILSON, A.C.; THOMSON, H.J.; SCHEDIN, P.J.; GIBSON, N.W.; GANTHER, H.E. Effect of methylated forms of selenium on cell viability and the induction of DNA strand breakage. **Biochemical Pharmacology**, v.43, p.1137-1141, 1992.
- WILSON, L.G.; BANDURSKI, R.S. An enzymatic reaction involving adenosine triphosphate and selenate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.62, p.503-506, 1956.
- WILSON, L.G.; BANDURSKI, R.S. Enzymatic reactions involving sulfate, sulfite, selenate, and molybdate. **Journal of Biological Chemistry**, v.233, n.4, p.975-981, 1958.

YOSHIDA.; M.; FUKUNAGA, K.; TSUCHITA, H.; YASUMOTO, K. An evaluation of the bioavailability of selenium in high-selenium yeast. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.45, p.119-128, 1999. /Resumo/

APÊNDICE

A1 - Composição dos meios de cultura

Meio bismuto sulfito agar

Em g.L⁻¹: 10 g de bacto peptona; 5 g de bacto dextrose; 4 g de fosfato de sódio; 5 g de bacto extrato de carne; 0,3 g de sulfato ferroso; 8 g de indicador sulfito bismuto; 20g de bacto agar e 0,025g de bacto verde brilhante.

Mosto de melaço

Em g.L⁻¹: 0,87 g de KH₂PO₄; 0,66 g de (NH₄)₂SO₄; 0,3 g de uréia; 0,49 g de MgSO₄.7H₂O; 0,03 g de ZnSO₄.7H₂O; 0,02 g de MnSO₄.H₂O e 1,0 ml de ácido linoléico.

Meio YEPD

Em g.L⁻¹: 10 g Extrato de levedura; 10 g de peptona e 20 g de glicose.

Levedura	Tratamento (Teor de selenito no substrato)	Biomassa úmida (g)	Matéria seca (%)	Viabilidade (%)	Brotamento (%)	Teor alcoólico (% v/v)	pH final
Fleischmann	Controle	5,11	19,47	99,57	18,67	2,89	3,38
	40 mg.L ⁻¹	4,87	19,29	97,75	16,00	2,85	3,40
	80 mg.L ⁻¹	4,72	18,61	97,37	15,33	2,83	3,41
PE-2	Controle	4,31	21,60	98,51	22,04	2,89	3,73
	40 mg.L ⁻¹	4,47	21,09	98,50	22,08	2,88	3,74
	80 mg.L ⁻¹	4,09	21,25	97,93	16,90	2,83	3,74
KI	Controle	3,50	22,44	96,57	13,07	2,82	2,46
	40 mg.L ⁻¹	2,65	21,77	93,27	11,20	2,56	2,45
	80 mg.L ⁻¹	2,37	21,88	92,97	10,57	2,33	2,48
KD1-88	Controle	3,19	24,98	96,70	11,47	2,79	2,42
	40 mg.L ⁻¹	2,96	23,36	95,67	10,0	2,64	2,44
	80 mg.L ⁻¹	2,57	22,21	94,10	8,83	2,43	2,48

Quadro 2 - Resultados gerais das análises realizadas na biomassa produzida e no meio fermentado delevurado, ao término dos ensaios de cultivo celular.

Faixa etária (anos)	Selênio ($\mu\text{g}.\text{dia}^{-1}$)
Bebes	
0-6 *	15
7-12 *	20
1-3	20
4-8	30
Homens	
9-13	40
14-18	55
19-30	55
31-50	55
51-70	55
>70	55
Mulheres	
9-13	40
14-18	55
19-30	55
31-50	55
51-70	55
>70	55
Gestantes	
<18	60
19-30	60
31-50	60
Lactantes	
<18	70
19-30	70
31-50	70
* meses	

Quadro 3 - Recomendação de ingestão diária de selênio, de acordo com idade e faixa etária.