**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Produção de leveduras enriquecidas em selênio

Layna Amorim Mota

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2020**

Layna Amorim Mota
Farmacêutica

Produção de leveduras enriquecidas em selênio
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **ANTONIO SAMPAIO BAPTISTA**

Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestra em Ciências. Área de concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA – DIBD/ESALQ/USP

Mota, Layna Amorim

Produção de leveduras enriquecidas em selênio / Layna Amorim Mota. - -
Piracicaba, 2020. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018
de 2011. - - Piracicaba, 2020.

69 p.

Dissertação (Mestrado) - USP / Escola Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz".

1. Bioetanol 2. Selenito de sódio 3. Selenometionina 4. Selenocisteína I.
Produção de leveduras enriquecidas em selênio

A minha querida e amada mãe
Luciena Nunes Amorim Mota (*In memoriam*)
DEDICO

AGRADECIMENTOS

Expresso minha gratidão as pessoas e instituições que contribuíram para a concretização deste trabalho, em especial:

A Deus, pela vida, pela fé, pela perseverança e por tantas as vitórias;

Ao Prof. Dr. Antonio Sampaio Baptista pela orientação, apoio, confiança, amizade e exemplo de profissional e ser humano;

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos – ESALQ/USP, pela formação acadêmica;

À Escola de Superior de agricultura “Luiz de Queiroz” – ESALQ, pelo uso do laboratórios (Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio). Setor de Açúcar e Álcool, LAN/ESALQ/USP;

À equipe técnica do LTSBio: MSc. Ana Paula Maria da Silva, MSc. Laysa M. Lewandowski, MSc. Rubens Perez Calegari, MSc Eric Alberto da Silva e MSc. Gabriela Maria F. L. L. que foram imprescindíveis durante a execução dos trabalhos;

À minha família, pai Ricardo Roque Almeida Mota e irmão Adriano Amorim da Costa, pelos conselhos sábios durante essa jornada. Vocês são a minha base e meu refúgio sempre;

Ao meu namorado Riccardo Barbosa Berto, pelo apoio e compreensão;

À minha amiga Georgia Menezes Defensor Aires do Rego pela paciência em todos os momentos difíceis e pelos anos de amizade;

À minha querida Carmelinda Rodrigues da Cunha Palmieri que sempre acreditou em mim e no meu trabalho;

E, a todos que não citados, mas que, direta ou indiretamente, ajudaram para a conclusão deste trabalho.

“Mil cairão ao teu lado, e dez mil, à tua direita, mas tu não serás atingido.”

Salmo 91: 7-9

SUMÁRIO

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
1. INTRODUÇÃO.....	10
Referências	11
2. HABILIDADE DAS LEVEDURAS DA ESPÉCIE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, LINHAGEM Y904, TOLERAR E SE ADAPTAR ÀS ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO.....	12
Resumo	12
Abstract.....	13
2.1 Introdução.....	14
2.2 Revisão da literatura	15
2.3 Material e métodos	19
2.3.1 Local dos ensaios	19
2.3.2 Estudo de tolerância da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ao selênio	19
2.3.3 Estudo de adaptação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em meio enriquecido com selenito de sódio	20
2.3.4 Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)	21
2.4 Resultados e discussão	21
2.4.1 Estudo de tolerância da <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , linhagem Y904, ao selênio	21
2.4.2 Estudo de adaptação da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24
2.5 Conclusão.....	32
Referências	33
3. FERMENTAÇÃO COM LEVEDURA Y904 ADAPTADAS EM MEIO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO.....	36
Resumo	36
Abstract.....	37
3.1 Introdução.....	38
3.2 Revisão da literatura	38
3.3 Material e métodos	42
3.3.1 Local dos ensaios	42
3.3.2 Ensaio de fermentação alcoólica utilizando mosto enriquecido com selênio.....	42
3.3.3 Análise de viabilidade celular das leveduras.....	45
3.3.4 Biomassa	45
3.3.5 Desprendimento de CO ₂	45
3.3.6 Concentração de leveduras.....	46
3.3.7 Teor alcoólico	46
3.3.8 Rendimento fermentativo.....	47
3.3.9 Produtividade de etanol.....	47
3.3.10 Teores de açúcares (Açúcares redutores e açúcares redutores totais)	47

3.3.11 Selênio inorgânico	48
3.3.12 Análises estatísticas	48
3.4 Resultados e discussão	49
3.4.1 Ensaio de fermentação alcoólica enriquecida com selênio	49
3.4.2 Viabilidade celular das leveduras	49
3.4.3 Biomassa.....	52
3.4.4 Desprendimento de CO ₂	54
.....	55
3.4.5 Concentração de células de leveduras	56
3.4.6 Teor alcoólico, produtividade e rendimento	57
3.4.7 Análises de açúcares e glicerol.....	59
3.4.8 Selênio inorgânico.....	61
3.5 Conclusão	65
Referências	66

RESUMO

Produção de leveduras enriquecidas em selênio

A produção de bioetanol tem sido considerada uma alternativa para diminuir os problemas energéticos e ambientais ocasionados devido ao uso de combustíveis fósseis. No processo de produção de etanol, podem ser disponibilizadas grandes quantidades de leveduras como subproduto. Por esses motivos, para melhor avaliar o potencial alimentício e farmacológico da levedura produzida como subproduto da indústria de produção do etanol, foi realizado o presente estudo, com o objetivo de investigar o enriquecimento de leveduras com selênio, um micronutriente essencial aos seres humanos e animais. Este nutriente é responsável por diversas funções e capaz de estimular as atividades de enzimas antioxidantes, como a glutathione peroxidase. Para tal foi realizado um estudo de tolerância da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ao selenito de sódio. Além disso, também foi feita uma investigação sobre a capacidade das leveduras de se adaptarem ao cultivo em substrato com altas concentrações de selênio. Para tal foram realizados ensaios de viabilidade e de mudanças morfológicas das células das leveduras. Posteriormente, foi realizado ensaio sem biorreatores, tipo Erlenmeyer, para avaliar a capacidade das leveduras adaptadas às altas concentrações de selênio de realizarem a fermentação alcoólica a partir do mosto obtido de xarope da cana de açúcar. Neste experimento, o mosto foi inoculado com 3% (m v⁻¹) de levedura, linhagem Y904, a fim de se avaliar os tratamentos através dos parâmetros (produtividade, rendimento, viabilidade celular, produção de etanol, desprendimento de CO₂ e biomassa). As análises de açúcares redutores totais (ART) e glicerol foram realizadas através de um cromatógrafo de íons (IC) e selênio inorgânico através da espectroscopia de emissão atômica por plasma acoplado (ICP-OES). No ensaio de tolerância, a máxima concentração de selênio no substrato, que as leveduras conseguiram crescer foi 60 µg mL⁻¹ de selenito de sódio. Por outro lado, após passarem pelo processo de adaptação, as leveduras conseguiram tolerar a concentração de selenito de sódio no substrato de até 246 µg mL⁻¹. Contudo, nessas condições de cultivo, foram observadas mudanças morfológicas nas leveduras (cor, rugosidade e diâmetro das colônias); também foram verificados efeitos sobre o tempo de crescimento e quantidade de colônias que conseguiram se desenvolver. No ensaio de fermentação do mosto com diferentes concentrações de selenito de sódio, o tratamento T2 (com 60 µg mL⁻¹) obteve o melhor resultado de rendimento fermentativo (98%) e T3 (com 150 µg mL⁻¹) a maior concentração de selênio inorgânico (5.562,68 mg L⁻¹) na biomassa das leveduras ao término da fermentação. Sendo assim, conclui-se que, a levedura Y904, nas condições normais de cultivo, tolera até 60 µg mL⁻¹, mas com o processo adaptativo consegue desenvolver habilidade para tolerar até 246 µg mL⁻¹ de selenito de sódio no meio de cultivo. As leveduras previamente adaptadas conseguem manter a habilidade de tolerar altas concentrações de selenito de sódio em fermentações realizadas em substrato líquido. Isto pode ser observado por apresentar alta viabilidade celular, produção de biomassa, desprendimento de CO₂, rendimento da fermentação, produtividade e também altas concentrações de selênio total na biomassa celular.

Palavras-chave: Bioetanol, Selenito de sódio, Selenometionina, Selenocisteína

ABSTRACT

Production of selenium-enriched yeasts

Bioethanol production has been considered an alternative to reduce energy and environmental problems caused by the use of fossil fuels. In the ethanol production process, large quantities of yeast can be made available as a by-product. For these reasons, in order to better evaluate the nutritional and pharmacological potential of yeast produced as a by-product of the ethanol production industry, the present study was carried out, with the objective of investigating the enrichment of yeasts with selenium, a micronutrient essential to humans and animals. This nutrient is responsible for several functions and capable of stimulating the activities of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase. To this end, a study of the tolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to sodium selenite was carried out. In addition, an investigation was made on the ability of yeasts to adapt to cultivation on substrates with high concentrations of selenium. For this, viability studies and morphological changes of yeasts were carried out. Finally, the study was carried out in bioreactors, Erlenmeyer type, to assess the ability of yeasts adapted to high concentrations of selenium to perform alcoholic fermentation from the must (sugar cane syrup). In this experiment, the must was inoculated with 3% (m v⁻¹) yeast, strain Y904, in order to evaluate the treatments through the parameters (productivity, yield, cell viability, ethanol production, CO₂ release and biomass). The analysis of total reducing sugars (ART) and glycerol were performed using an ion chromatograph (IC) and inorganic selenium through coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES). In the tolerance test, the maximum concentration of selenium in the substrate that the yeasts were able to grow was 60 µg mL⁻¹ of sodium selenite. On the other hand, after adaptation tests, the yeasts were able to tolerate the sodium selenite concentration in the substrate of up to 246 µg mL⁻¹. However, under these cultivation conditions, morphological changes were observed in the yeasts (color, roughness and diameter of the colonies); effects on growth time and number of colonies that managed to develop were also verified. In the wort fermentation test with different concentrations of sodium selenite, treatment T2 (with 60 µg mL⁻¹) obtained the best result of fermentative yield (98%) and T3 (with 150 µg mL⁻¹) the most high concentration of inorganic selenium (5,562.68 mg L⁻¹) in yeast biomass at the end of fermentation. Thus, it is concluded that, in normal cultivation conditions, yeast Y904 tolerates up to 60 µg mL⁻¹, but the adaptive process can develop the ability to tolerate up to 246 µg mL⁻¹ of sodium selenite in the cultivation. Previously adapted yeasts are able to maintain the ability to tolerate high concentrations of sodium selenite in fermentations carried out in liquid substrate. This can be observed for presenting high cell viability, biomass production, CO₂ shedding, fermentation yield, productivity and also high concentrations of total selenium in the cell biomass.

Keywords: Bioethanol, Sodium Selenite, Selenomethionine, Selenocysteine

1. INTRODUÇÃO

A recorrente preocupação do Brasil e do mundo pelas questões ambientais e econômicas vem estimulando à busca pelo desenvolvimento sustentável e pela produção cada vez mais intensa de biocombustíveis. O Brasil é o segundo principal produtor de etanol biocombustível no mundo, com a produção estimada em 33,12 bilhões de litros na safra 2019/2020 (UNICA, 2020).

A produção de álcool combustível é realizada através da fermentação alcoólica de açúcares contidos no mosto, conduzida por leveduras. Estes microrganismos unicelulares apresentam a capacidade de transformar os açúcares contidos no mosto em etanol, gás carbônico, energia e outros produtos secundários. No processo de produção de etanol, as leveduras são utilizadas apenas como agentes de transformação do açúcar em álcool etílico, e após essa reação bioquímica, podem ser reutilizadas para outras finalidades, tais como o enriquecimento em nutrientes de interesse. Em algumas situações, no momento do reciclo das leveduras, após o tratamento do fermento, parte delas podem ser removidas do processo e enriquecidas com minerais, tais como o selênio. Em estudo conduzido por TINGGI (2003) o uso do selênio, um mineral que desempenha importantes funções antioxidantes e é um nutriente essencial para os animais e seres humanos, as leveduras foram enriquecidas com o uso do selenito de sódio.

As leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* têm a capacidade de transformar o selênio inorgânico quando adicionado ao meio de cultivo em compostos orgânicos, o que facilita a sua biodisponibilidade no organismo e dependendo das suas condições de crescimento, pode acumular notáveis quantidades de selênio na forma de selenometionina e (ou) selenocisteína (formas orgânicas) (PEDRERO, 2011).

Por esses motivos, se for adicionado o selênio no mosto para a fermentação alcoólica, espera-se obter leveduras que apresentem altos níveis de selênio orgânico e de enzimas antioxidantes, aminoácidos e alto valor nutricional. Isto pode disponibilizar material biológico e orgânico com potencial para suplementação nutricional de seres humanos e animais, seja através da formulação de prebióticos ou probióticos.

Referências

CASEIRO, C. A produção e o consumo de biocombustíveis no mundo atual: questões-chave para analisar a sua sustentabilidade. **Campo-Território: revista de geografia agrária**, v. 6, n. 12, p. 6-31, 2011.

DESMONTS, R. Tecnologia da produção dos fermentos secos de destilaria. **Boletim Inform. da Ass. Paul. Med**, v. 8, p. 1-7, 1966.

PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, n. 2, p. 135-152, 2009.

Produção de etanol na safra 2019/2020 deve aumentar 7,1%. UNICA. Disponível em:

<https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2019-12/producao-de-etanol-na-safra-20192020-deve-aumentar-71-diz-unica>

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicology Letters**. 137 p. 2003.

2. HABILIDADE DAS LEVEDURAS DA ESPÉCIE *Saccharomyces cerevisiae*, LINHAGEM Y904, TOLERAR E SE ADAPTAR ÀS ALTAS CONCENTRAÇÕES DE SELÊNIO

Resumo

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar e segundo maior produtor de etanol de mundo. Atualmente, produz aproximadamente 33,1 milhões de metros cúbicos (m^3) por ano. Essa produção, pode gerar um excedente de aproximadamente 20 kg de leveduras por m^3 de etanol produzido. Como as leveduras possuem capacidade de assimilar inúmeros componentes presentes nos substratos e alta velocidade de crescimento; essas têm sido utilizadas em estudos e pesquisas principalmente na área de biotecnologia e no desenvolvimento de novos produtos. Nesse sentido, o desenvolvimento da habilidade de adaptação das leveduras aos micronutrientes tem sido investigado, visando obter leveduras de maior valor agregado. O selênio é um micronutriente muito importante para os seres humanos e animais. Ele participa de diversas funções no organismo, tais como: processo antioxidante, imunológico, produção hormonal entre outros. Encontrado principalmente em frutos do mar, carnes e castanha-do-Pará. Em algumas regiões do mundo, o conteúdo de selênio na dieta tem sido estimado insuficiente para uma expressão correta de suas proteínas. Por esses motivos, o objetivo deste trabalho foram: a) encontrar a concentração máxima de selênio, na forma de selenito de sódio, incorporado ao meio de cultivo que as leveduras, *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y904, podem tolerar; b) adaptar essa linhagem de leveduras ao substrato com altas concentrações de selênio, através da adição de concentrações crescentes e gradativas de selênio ao meio de cultivo; c) Produzir leveduras com altas concentrações de selênio incorporado à biomassa celular, utilizando meio YEPD solido em placa de Petri. Os parâmetros analisados foram contagem total de microrganismos (UFC mL^{-1}); características morfológicas das colônias e tempo necessário para o crescimento das colônias de leveduras. No ensaio de tolerância foi observado que as leveduras sem adaptação conseguiram crescer em substrato contendo até $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selênio sem alterações morfológicas, mas com diminuição do número de colônias. Por outro lado, as leveduras que foram submetidas ao processo adaptativo conseguiram crescer em meios de cultivo contendo até $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selênio. Apesar da capacidade de adaptação, a partir da concentração de $84 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selênio, começaram a ser observadas diferenças morfológicas de coloração nas colônias das leveduras. Sendo que nas leveduras obtidas em substratos com $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selênio, foram observadas as seguintes características morfológicas: odor característico de sulfeto de hidrogênio, alterações na coloração e rugosidade da levedura. Em relação ao tempo de incubação para o crescimento das colônias foi observado o aumento, tendendo ao crescimento após 24 ou até 36 horas de incubação nas concentrações de 222 à $246 \mu\text{g mL}^{-1}$. Conclui-se que, as leveduras da linhagem Y904 não adaptadas conseguem ser cultivadas de forma eficiente em substrato enriquecido em selenito de sódio de até $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selênio. Contudo, o processo de adaptação permite aumentar a capacidade de tolerar selênio no substrato em concentração 300 % maior do que a levedura não adaptada. Contudo, observa-se alterações morfológicas das colônias das leveduras em função do estresse às condições que são submetidas pelo meio de cultivo.

Palavras-chave: Leveduras enriquecidas, Selenito de sódio, Selenoproteínas, Selenometionina, Selenocisteína

Abstract

Brazil is the largest producer of sugarcane and the second largest producer of ethanol in the world. Currently, it produces approximately 33.1 million cubic meters (m^3) per year. This production can generate a surplus of approximately 20 kg of yeasts per m^3 of ethanol produced. As yeasts have the capacity to assimilate countless components present in the substrates and high growth speed; these have been used in studies and research mainly in the area of biotechnology and in the development of new products. In this sense, the development of the ability to adapt yeasts to micronutrients has been investigated, aiming to obtain yeasts with greater added value. Selenium is a very important micronutrient for humans and animals. It participates in several functions in the body, such as: antioxidant, immunological, hormonal production, among others. Found mainly in seafood, meat and Brazil nuts. In some regions of the world, selenium content in the diet has been estimated to be insufficient for correct expression of its proteins. For these reasons, the objective of this work was: a) to find the maximum concentration of selenium, in the form of sodium selenite, incorporated into the culture medium that yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, strain Y904, can tolerate; b) adapt this yeast strain to the substrate with high concentrations of selenium, by adding increasing and gradual concentrations of selenium to the culture medium; c) Produce yeasts with high concentrations of selenium incorporated into cell biomass, using solid YEPD medium in Petri dish. The analyzed parameters were total count of microorganisms (UFC mL^{-1}); colony morphological characteristics and time required for yeast colonies to grow. In the tolerance test it was observed that yeasts without adaptation were able to grow on a substrate containing up to $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ of selenium without morphological changes, but with a decrease in the number of colonies. On the other hand, yeasts that were submitted to the adaptive process managed to grow in culture media containing up to $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ of selenium. Despite the ability to adapt, from the concentration of $84 \mu\text{g mL}^{-1}$ of selenium, morphological differences in color began to be observed in the yeast colonies. Since in yeasts obtained in substrates with $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ of selenium, the following morphological characteristics were observed: characteristic odor of hydrogen sulfide, changes in yeast color and roughness. Regarding the inoculation time for the growth of the colonies, an increase was observed, tending to grow after 24 or up to 36 hours of incubation in concentrations of 222 to $246 \mu\text{g mL}^{-1}$. It is concluded that yeasts, strain Y904, that are not adapted can be grown efficiently on a substrate enriched with sodium selenite of up to $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ of selenium. However, the adaptation process allows to increase the capacity to tolerate selenium in the substrate in a concentration 300% higher than the non-adapted yeast. However, morphological changes are observed in the yeast colonies as a result of stress to the conditions that are submitted by the culture medium.

Keywords: Enriched yeasts, Sodium selenite, Selenoproteins, Selenomethionine, Selenocysteine.

2.1 Introdução

Os microrganismos são seres unicelulares imprescindíveis para o meio ambiente e consequentemente para a humanidade. Composto por grande diversidade de tipos e espécies, esses são responsáveis por diversas funções dentro dos ecossistemas, participam do ciclo do carbono, nitrogênio, são componentes fundamentais de cadeias alimentares e até fazem parte da composição de organismos multicelulares. Composto por bactérias, arqueas, fungos, protozoários, parasitas intracelulares (vírus), invertebrados microscópicos (nematóides e ácaros) entre outros, os microrganismos podem ter diversas aplicabilidades nos setores: farmacêutico, nutrição animal e humana, agricultura e meio ambiente.

Aplicações microbianas em biotecnologia têm gerado importantes avanços, e as leveduras (fungos) como detentoras da capacidade de promover a fermentação, produzem o etanol. Produto este que vem ganhando um espaço cada vez maior no mercado.

O Brasil atualmente é o segundo maior produtor de etanol combustível do mundo, gerando aproximadamente 33 bilhões de litros do produto por ano (ÚNICA, 2019). Como a produção de etanol no país é realizada exclusivamente por via fermentativa, ao final de cada ciclo de fermentação, há grande excedente de leveduras. Esses microrganismos unicelulares apresentam a capacidade de transformar os açúcares contidos no mosto em etanol, gás carbônico, energia e outros produtos secundários. No processo de produção do etanol, as leveduras são utilizadas apenas como agentes de transformação do açúcar em etanol, e após essa reação bioquímica, podem ser reutilizadas para outras finalidades, tais como o enriquecimento em nutrientes de interesse (MUSSATTO, 2010).

Em algumas situações, no momento do reciclo das leveduras, após o tratamento do fermento, parte delas podem ser removidas do processo e enriquecidas em minerais, tais como o selênio. De acordo com TINGGI (2003), o selênio, um mineral que desempenha funções antioxidantes e nutriente essencial para os animais e seres humanos, pode ser obtido como fonte para o enriquecimento de leveduras.

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nas fermentações alcoólicas tem a capacidade de transformar o selênio inorgânico que será adicionado ao meio

de cultivo, em compostos orgânicos, o que facilita a sua biodisponibilidade no organismo e dependendo das suas condições de crescimento, pode acumular notáveis quantidades de selênio na forma de selenometionina e selenocisteína (PEDRERO et al., 2009). As formas orgânicas do selênio fazem parte do sítio ativo de importantes selenoproteínas, como por exemplo a glutathione peroxidase.

Por esses motivos, neste estudo as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* foram adaptadas às altas concentrações de selênio no meio, com o propósito de se obter microrganismos que apresentassem adaptações evolutivas e geração de novos metabólitos que permitissem elas sobreviverem nessas condições de estresse; adquirindo vantagens pela formação de enzimas antioxidantes e agregando valor ao mesmo. Sendo assim os objetivos deste trabalho foram avaliar a tolerância de levedura *Saccharomyces cerevisiae* às altas concentrações de selênio no substrato, realizar a adaptação evolutiva das leveduras a esse mineral e acompanhar as variações morfológicas das colônias/células.

2.2 Revisão da literatura

Os microrganismos são organismos unicelulares microscópicos, que vivem na natureza como células isoladas ou em agregados celulares. Composto por grupos de bactérias, arqueas, fungos, protozoários, vírus entre outros, foram os primeiros seres vivos a colonizarem a terra (BERNARDI, 2019).

Esses seres vivos devido a sua relativa simplicidade morfológica e grande diversidade genética e metabólicas, desempenham funções únicas e cruciais na manutenção de ecossistemas (CANHOS, 2001). Algumas dessas funções são: fotossíntese oxigênica, ciclagem de matéria orgânica, ciclos biogeoquímicos, manutenção da fertilidade e estrutura dos solos. Podem também atuar no setor biotecnológico, conceitualmente, a união de biologia com tecnologia – é um conjunto de técnicas que utiliza os seres vivos, ou parte desses, no desenvolvimento de processos e produtos que tenham uma função econômica e (ou) social (FALEIRO, 2011).

As leveduras (fungos) por exemplo, são microrganismos muito utilizados no setor de biotecnologia, pois podem ser utilizados no campo da nutrição como suplemento humano e animal, na área da indústria alimentícia como produção de

pães, bebidas alcoólicas e leite fermentado, na indústria farmacêutica são largamente utilizadas para a produção de probióticos e no setor sucroenergético servem para a geração de etanol (principal biocombustível produzido no mundo).

Os biocombustíveis podem ser definidos como combustíveis que contêm um teor de energia proveniente de uma fonte biológica. Portanto, são produzidos a partir de diversas fontes de biomassa, tais como materiais vegetais, tipos de colheitas e óleos vegetais reciclados ou resíduos dos mesmos (CASEIRO, 2011). Apesar de existirem diversos tipos de biocombustíveis os mais produzidos e consumidos são: biodiesel e etanol.

Os Estados Unidos e o Brasil, seguidos pela China são os maiores produtores mundiais de álcool combustível. Os Estados Unidos com uma produção de 60 bilhões de litros (produzidos a partir do milho) e o Brasil com 30,3 bilhões de litros por safra (usando como matéria-prima, principalmente, a cana-de-açúcar) (UNICA, 2019).

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, devido às suas características edafoclimáticas, com produção de aproximadamente 615,98 milhões de toneladas prevista para a safra 2019/20 (CONAB, 2019). Dentro deste número em torno de 55% é voltado para a geração de etanol e a outra parte para produção de açúcar (UNICA, 2019). O processo industrial para a produção do etanol de cana-de-açúcar contempla várias etapas, dentre elas a lavagem, a extração do caldo, a remoção de impurezas, a fermentação, a destilação, a desidratação e o armazenamento. O processo de fermentação é realizado através das leveduras e que pode gerar um excedente de 20 kg da mesma por m³ de etanol produzido (DESMONTS, 1966).

As leveduras são microrganismos unicelulares detentores de uma diversidade muito grande, que fazem parte de diversas áreas da ciência e da tecnologia. Normalmente, reproduzem-se de forma assexuada, por brotamento, e englobam mais de 500 espécies com diversas atividades metabólicas (ZEYL, 2000)

A fermentação alcoólica é um processo de geração de energia que ocorre sem a presença de gás oxigênio, logo, trata-se de uma via de produção de energia anaeróbia. As leveduras iniciam o processo de fermentação a partir do ácido pirúvico proveniente da glicólise. Basicamente duas reações ocorrem na fermentação alcoólica: Primeiramente ocorre a conversão do piruvato em acetaldeído, conduzida pela enzima piruvato descarboxilase, com a ajuda de cofatores (Mg²⁺ e tiamina

pirofosfato) e liberação de gás carbônico (CO_2), em seguida a enzima álcool desidrogenase oxida o NADH em NAD^+ produzindo assim o etanol (NELSON, 2014).

Além de serem utilizadas para a realização de fermentação e geração de etanol combustível, as leveduras têm outras aplicabilidades, isso porque possuem altos teores de proteínas, composição balanceada de aminoácidos e são ricas em vitaminas do complexo B. Elas podem ser usadas para formulação de medicamentos, alimentos para consumo humano, forragens, além de serem suplementadas para uso em nutrição animal. O enriquecimento de leveduras com micronutrientes é possível porque elas são capazes de assimilar metais e metalóides, que podem ser adsorvidos na parede celular ou incorporados a aminoácidos e vitaminas. Além disso, em pouco tempo elas conseguem acumular uma elevada concentração desses minerais. Alguns dos micronutrientes que podem ser utilizados são: cromo, ferro, zinco, cobre, selênio, entre outros (ROEPCKE, 2011).

O selênio (Se) é um micronutriente utilizado para enriquecimento de leveduras por conta dos seus benefícios, ele é essencial na dieta de humanos e animais, por estar relacionado: ao sistema antioxidante por fazer parte da enzima glutathione peroxidase, melhora na atuação do sistema imunológico, regula os hormônios da tireoide, melhora a eficiência da vitamina E e participa ao sistema reprodutivo (ARTHUR, 2003).

O selênio é um mineral que pode ser encontrado em quatro estados de oxidação, selenato Se (VI), selenito Se (IV), selênio elementar Se (0) e seleneto Se (-II) e em duas formas químicas, sais minerais inorgânicos (selenito de sódio, selenato) e orgânicos (selenometionina, selenocisteína) (STOLZ, 2006).

A principal fonte de selênio para os seres humanos é a dieta (castanha-do-pará, frutos do mar, fígado, rins e outras carnes), no entanto, em várias regiões do mundo, o conteúdo de selênio na dieta tem sido estimado insuficiente para uma expressão correta das proteínas (PEDRERO e MADRID, 2009).

Quando o selênio é absorvido pela célula de levedura em alguma de suas formas inorgânicas, o metabolismo da mesma tem a capacidade de metabolizá-lo e convertê-lo em selênio orgânico, como selenocisteína ou selenometionina que compõem o sítio ativo de algumas selenoproteínas como é o caso da glutathione peroxidase, uma enzima que protege o tecido celular contra o estresse oxidativo,

catalisando as reações que convertem o peróxido de hidrogênio em água, e os hidroperóxidos de lipídeos a ácidos graxos alcoólicos (AMANULLAH, 2012).

Tabela 1- Selenoproteínas dos mamíferos e suas funções (adaptada de Mehdi et alii., 2013; Santos e Fonseca, 2013).

Selenoproteína	Função
Glutathiona peroxidase (GPx)	Enzimas antioxidantes
GPx1	Antioxidante no citosol celular; reserva de selênio
GPx2	Antioxidante no trato gastrointestinal
GPx3	Antioxidante no espaço extracelular e plasma
GPx4	Antioxidante em membranas; proteína estrutural nos espermatozoides; apoptose
GPx5	Desconhecida
GPx6	Homologa a GPx1
Tioredoxinaredutase (TRx)	Funções múltiplas incluindo a oxiredutase ditioldissulfídrica. Destoxificaperoxidases, reduz tioredoxina (controla o crescimento celular); mantém o estado redox dos fatores de transcrição
TR1	Majoritariamente citosólica, ubíquo
TR2	Expressa por células germinativas nos testículos
TR3	Mitocondrial, ubíquo
Iodotironinasdesiodases	
Tipos D1 e D2	Converte a tiroxina (T4) para a bioativa 3,5,3'-triiodotironina (T3)
Tipos D1 e D3	Converte a tiroxina (T4) para a 3',3',5' T3 reversa bioinativa
Selenoproteína P	Proteína de transporte de selênio. Antioxidante no endotélio
Selenoproteína W	Antioxidante
Sintetase selenofosfato (SPS2)	Síntese de selenofosfato para a síntese de selenoproteínas
Selenoproteínas de 15 kDa (Sep 15)	Proteção anticâncer
Selenoproteínas H, I, K, M, N, O, R, S, T, V	Função em grande parte desconhecida

Para que forma inorgânicas do selênio como selenito de sódio possa ser absolvido pela célula, é preciso primeiramente que esta molécula sofra redução através do NADPH, gerando o seleneto de hidrogênio que por sua vez consegue atravessar a membrana plasmática. Paralelamente, o oxaloacetato (intermediário do

ciclo de Krebs) irá sofrer uma transaminação, recebendo um grupo amina formando o aspartato que através de sucessivas reduções irá formar a homoserina. Pela ação da acetil-CoA, transferindo um grupo acetil para a homoserina, de modo que vai formar a O-acetil-homoserina que vai reagir com o seleneto de hidrogênio formando a Se-homoserina, podendo levar a formação da selenocisteína ou selenometionina (THOMAS et al., 1997; MAPELLI et al., 2011)

Muitos trabalhos têm sido publicados utilizando o selênio como meio de desenvolvimento de algum produto biotecnológico (KAUR, 2006). Diante da importância dos minerais e em específico do selênio, a produção de levedura enriquecida com o mesmo, sob condições bem definidas, são capazes de conterem tais nutrientes em teores mais elevados do que os níveis normais e fixá-los como fonte orgânica, o que possibilita aplicações na suplementação humana e animal além da geração de probiótico rico em selênio orgânico e selenoproteínas antioxidante (SANTOS e FONSECA, 2013)

As leveduras têm sido alvo de estudos e pesquisa principalmente no campo tecnológico, particularmente devido a sua capacidade de assimilar grande variedade de substratos e sua alta velocidade de crescimento (ICIDCA, 1999), porém a determinação de condições ideais para a produção de biomassa de levedura enriquecida com selênio orgânico, ainda é um problema desafiador enfrentado pelas indústrias alimentícia e farmacêutica (KIELISZEK, 2019).

Por isso, o referente trabalho propõe o estudo da tolerância e posterior adaptação às altas concentrações de selênio, para que essas leveduras excedente do processo de produção do etanol possam adquirir novas funcionalidades e agreguem valor a mesma.

2.3 Material e métodos

2.3.1 Local dos ensaios

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio), Setor de Açúcar e Alcool, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da ESALQ/USP.

2.3.2 Estudo de tolerância da *Saccharomyces cerevisiae* ao selênio

Os ensaios de tolerância das leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* linhagem Y904) ao selênio foram realizados em placas de Petri, contendo meio de cultivo YEPD

(yeast extract, peptone and dextrose) com e sem a adição de selênio. Nos tratamentos utilizando meio enriquecido com o selênio, foram adicionadas diferentes concentrações do micronutriente ($0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T1); $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T2); $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T3); $120 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T4) e $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ (T5)). A fonte de selênio utilizado foi o selenito de sódio (Na_2SeO_3). Este foi adicionado ao meio de cultivo YEPD (2% de glicose, 0,5% de extrato de levedura, 1% de peptona e 2% de ágar). O cultivo foi realizado em quadruplicatas, com 10 mL de substrato e 1 mL de inóculo (diluições em série de 10^{-5} e 10^{-6} UFC mL^{-1}). Estas foram incubadas sob $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, por um período de 24 a 48 horas, conforme o aparecimento de colônias (ASSUNÇÃO, 2011). Para analisar a tolerância foi considerado que aquelas leveduras que cresceram até as 48 horas de incubação foram tolerantes à concentração de selênio contida no meio de cultivo. Por outro lado, as leveduras que não conseguiram crescer até as 48 horas de incubação, foram consideradas não tolerantes ao selênio e aquela concentração foi avaliada como tóxica para as células de leveduras.

2.3.3 Estudo de adaptação da *Saccharomyces cerevisiae* em meio enriquecido com selenito de sódio

A partir dos resultados obtidos no estudo de tolerância, foi selecionada a concentração máxima na qual as leveduras conseguiram se desenvolver, para então iniciar o processo de adaptação das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y904, em meio de cultivo enriquecido em selenito de sódio. No primeiro ciclo, a adaptação foi iniciada com o meio de cultivo YEPD contendo $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio. Após esse ciclo, foram feitos aumentos gradativos nas concentrações do selenito de sódio ao meio de cultivo em cada novo ciclo. Os aumentos foram realizados em concentrações crescente de $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ por ciclo durante 32 ciclos de cultivo. De modo que a adaptação teve início com a dose de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D1) e foram conduzidos cultivos em substrato com até a concentração de $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ (D32).

As placas de Petri continham 10 mL de substrato e receberam 1 mL de inóculo, com diluições de 10^{-5} e 10^{-6} UFC mL^{-1} . A incubação foi feita em estufa, com temperatura controlada, $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$, durante o período de 24 à 48 horas, conforme o crescimento das colônias, de acordo com Assunção (2011). Conforme o crescimento das colônias, as que cresceram dentro do período de 48 horas foram consideradas adaptadas e aquelas que não conseguiram crescer foi considerado que a dose de selenito de sódio adicionada ao meio exerceu efeito tóxico às células de leveduras.

Quanto as variações morfológicas das colônias/células, as características analisadas foram: Coloração, tamanho, odor e rugosidade da colônia.

2.3.4 Análise em microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Após os ensaios de adaptação das leveduras, os tratamentos (T1, T10 e T31) foram analisados em microscópio eletrônico de varredura. A biomassa de cada tratamento foi recolhida e armazenada em um ependorf de 0,5 mL contendo Karnovsky modificado, composto de gluceraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M, pH 7,2 CaCl₂ 0,001 M. O preparo das amostras que foram visualizadas seguiu os seguintes passos: Foi adicionado uma gota de poly-L-lisina na lamínula e esta foi colocada em repouso por 15 a 20 minutos, em seguida foi adicionado uma gota da amostra em suspensão e colocada em repouso por mais 30 minutos na lamínula. As lamínulas com separadores entre uma amostra e outra, foram colocadas na gaiola e as amostras foram desidratadas dentro da gaiola em um béquer em concentrações crescentes de acetona: 30%, 50%, 70%, 90% por 30 minutos cada concentração e na de 100%, 3 vezes de 30 minutos cada, para então serem secas até o ponto crítico (CO₂). Por fim as lamínulas foram fixadas nos *stubs* submetidas ao processo de metalização, para que as amostras pudessem ser visualizadas no Microscópio eletrônico de varredura com aumento de 5000 vezes (KITAJIMA, 1999).

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Estudo de tolerância da *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y904, ao selênio

Os resultados obtidos demonstraram que, nos tratamentos T1, T2 e T3 obteve-se crescimento de colônias até as 48 horas após a inoculação. Isso indica a tolerância da levedura, linhagem Y904, ao selenito de sódio até a concentração de 60 µg mL⁻¹ (T3). Por outro lado, não foi observado crescimento de colônias até 48 horas após a incubação, nos tratamentos T4 e T5. No tratamento T1, na diluição do inóculo de 10⁻⁵ UFC mL⁻¹, obteve-se o maior número de colônias com aproximadamente 3,9 x10² UFC mL⁻¹, essas colônias apresentaram coloração branca, formato circular, não rugosa e tamanhos variando entre 0,8 e 5 mm de diâmetro. Nos tratamentos T2 e T3 foi observado menor crescimento do número de colônias com aproximadamente 2,0 e 1,7 x 10² UFC mL⁻¹, respectivamente.

Também foram identificadas que essas colônias apresentaram coloração branca, formato circular e não rugosas. No entanto, variando de 2 e 5 mm de diâmetro. Já nos tratamentos T4 e T5, não foram observados crescimento de colônias após às 48 horas de incubação, como pode ser visto na Figura 1.

Figura 1 - Crescimento da levedura Y904, em meio YEPD, diluição 10^{-5} sob 30°C durante 48 horas. (A1) Tratamento T1, (A2) Tratamento T2; (A3) Tratamento T3; (A4) tratamento T6; (A5) Tratamento T4; (A6) Tratamento T5.

Como não foi identificado crescimento de colônias na concentração de $120\ \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio de cultivo YEPD, mas foi encontrado na concentração de $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$, fez-se necessário definir o intervalo de concentração entre 60 e $120\ \mu\text{g mL}^{-1}$. Após realizar a inoculação em substrato de $70\ \mu\text{g mL}^{-1}$ (T6) de selenito de sódio, também não foi observado crescimento de colônias. Portanto, foi observado que as leveduras conseguiram crescer até $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo então submetidas ao T3, pois foi a máxima concentração que se obteve crescimento celular sem a necessidade de um processo adaptativo.

O tratamento T2, concentração de $60\ \mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, foi o melhor resultado do estudo de tolerância da levedura Y904 ao selênio, pois foi a maior concentração do nutriente no substrato que obteve-se crescimento celular dentro do tempo estimado de 24 a 48 horas, sem a necessidade de adaptação

celular das leveduras ao selênio. Pode ser encontrado resultados semelhantes nos estudos desenvolvidos por Assunção (2011) e Rajashree et al. (2013).

Segundo Assunção (2011), o qual investigou o efeito inibitório (número de células viáveis após 24 h de crescimento) de diferentes concentrações (0,0; 5,6; 34,8; 49,7 e 94,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de selenito de sódio em meio líquido YEPD sobre o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* EVN 166. Como resultado o número de células viáveis após 24 h de crescimento é idêntico para as concentrações de selênio ensaiadas (de 0; 5,6; 34,8 e 49,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$), embora tenha-se observado um valor ligeiramente inferior de UFC mL^{-1} para a concentração de 94,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

No estudo desenvolvido por Rajashree et al. (2013) em que o objetivo foi analisar a toxicidade do selênio em células de leveduras e os efeitos na produção de biomassa, os autores utilizaram leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (NCYC 1026), meio estéril Sabouraud Dextrose, condições assépticas e incubação de 72 horas a 30°C. Adicionou ao meio diferentes concentrações de selenito de sódio (0, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e obteve 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ como a maior concentração que pode ser adicionada ao meio, levando em consideração sua produção de biomassa, e, 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ levando em consideração a captação de selênio pela célula de levedura.

Apesar de serem da mesma espécie, *Saccharomyces cerevisiae*, e dispor da propriedade única de aumento da tolerância aos metais tóxicos, as diferentes linhagens podem reagir de forma diferentes ao estresse. Isto porque apresentam variações específicas dentro da mesma espécie. Há estudos com leveduras da mesma espécie que toleram diferentes concentrações de selênio (WHITE, 1987). Como nos resultados obtidos por Wang et al. (2010), a adição de 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na fase tardia de desenvolvimento da levedura de linhagem GS2, foi a maior concentração tolerada levando em conta a diminuição da produção de biomassa.

2.4.2 Estudo de adaptação da *Saccharomyces cerevisiae*

Os resultados obtidos no ensaio de tolerância permitiram definir a concentração de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, para iniciar o processo de adaptação. Com o cultivo de adaptação das leveduras às concentrações crescentes de selenito de sódio no meio, foi possível induzir a tolerância das células de leveduras ao selenito de sódio da concentração de $60 \mu\text{g mL}^{-1}$ até $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ no meio de cultivo. Esse processo adaptativo teve duração de 64 dias. A medida que, a concentração de selenito de sódio no meio foi aumentada, pode-se observar mudanças na coloração das colônias de leveduras (Figuras 2, 3, 4 e 5).

Figura 2 - Crescimento de leveduras em meio YEPD, sob 30°C , durante 48 horas do grupo controle, diluição 10^{-5} e 10^{-6} , respectivamente, de acordo com a imagem para cada letra. (A) Tratamento T1; (B) Tratamento T2; (C) Tratamento T3; (D) Tratamento T4; (E) Tratamento T5; (F) Tratamento T6; (G) Tratamento T7; (H) Tratamento T8.

Figura 3 - Crescimento de leveduras em meio YEPD, sob 30°C, durante 48 horas, do grupo controle, diluição 10^{-5} e 10^{-6} respectivamente, de acordo com a imagem para cada letra. (I) Tratamento T9; (J) Tratamento T10; (L) Tratamento T11; (M) Tratamento T12; (N) Tratamento T13; (O) Tratamento T14; (P) Tratamento T15; (Q) Tratamento T16).

Figura 4 – Crescimento de leveduras em meio YEPD, sob 30°C, durante 48 horas do grupo controle, diluição 10^{-5} e 10^{-6} , respectivamente, de acordo com a imagem para cada letra. (R) Tratamento T17; (S) Tratamento T18; (T) Tratamento T19; (U) Tratamento T20; (V) Tratamento T21; (X) Tratamento T22; (Z) Tratamento T23; (AA) Tratamento T24.

Figura 5 – Crescimento de leveduras em meio YEPD, sob 30°C, durante 48 horas do grupo controle, diluição 10-5 e 10-6 respectivamente, de acordo com a imagem para cada letra. (BB) Tratamento T25; (CC) Tratamento T26; (DD) Tratamento T27; (EE) Tratamento T28; (FF) Tratamento T29; (GG) Tratamento T30; (HH) Tratamento T31; (II) Tratamento T32.

No início do processo adaptativo, as colônias eram de coloração bege clara e brilhantes, à medida que foram aumentadas as doses de selenito de sódio no meio de cultivo, as colônias começaram apresentar coloração mais escura. De modo que após 32 ciclos de cultivo sucessivos, as colônias apresentaram coloração marrom avermelhada intensa. Além disso, houve a redução no número de colônias e o aumento da rugosidade das colônias em toda superfície, mas principalmente nas bordas. Também foram observadas mudanças no odor das colônias, as quais começaram apresentar cheiro semelhante ao do sulfeto de hidrogênio.

Na Figura 6, letra (A), pode-se verificar nitidamente a mudança de coloração do bege ao vermelho alaranjado, quando as leveduras foram cultivadas em meio com $96 \mu\text{g mL}^{-1}$. Já na Figura 6, letra (B), foram encontradas colônias com coloração intensa de vermelho alaranjado e bastante rugosidade nas bordas, quando as leveduras foram cultivadas em meio com $150 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Apesar das leveduras conseguirem crescer em concentração de $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio no meio de cultivo, nessa concentração foi observado a diminuição significativa na velocidade de crescimento das colônias, ou seja, enquanto nas placas de Petri contendo meio de cultivo com concentrações de selenito de sódio de 60, 66 e $72 \mu\text{g mL}^{-1}$ já podia ser observado colônias nas primeiras 12 horas de incubação, nas condições de cultivo onde as concentrações de selenito de sódio foram entre 222 até $246 \mu\text{g mL}^{-1}$, as colônias começaram ser visualizada no meio de cultivo apenas após 24 ou até 36 horas de incubação.

Figura 6 – Adaptação das células de levedura *Saccharomyces c.* (A) Tratamento T7 e (B) Tratamento T16.

Também foram observadas mudanças morfológicas nas colônias de leveduras quando visualizadas sob microscopia óptica (Figura 7), quando comparadas as células provenientes dos cultivos submetidos ao T6 com aquelas cultivadas nas condições do T1 foram encontrados aglomerados, aumento do tamanho da célula e da área transversal das células. Já as análises das imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura (Figura 8) permitiram identificar mudanças da superfície lisa nas células cultivadas sem enriquecimento do meio, em comparação com aquelas cultivadas em meio enriquecido com selenito de sódio (60, 120 e 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$), onde as superfícies das células apresentaram bastante rugosidade e até alteração no formato.

Com a obtenção dos resultados do teste de tolerância, a adaptação das leveduras chegou até 246 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio adicionado ao meio de cultivo, e a medida que esse sal foi adicionado, as leveduras começaram a apresentar diferentes características como a diminuição do número de células, rugosidade, odor intenso de sulfeto de hidrogênio e aumento na intensidade da coloração marrom avermelhada. Estes resultados estão semelhantes aqueles citados pela literatura, como a pesquisa realizada por Suhajda et al. (2000), onde foi feito o enriquecimento da *Saccharomyces cerevisiae* usando também o selenito de sódio, e obtendo uma coloração avermelhada nas células de levedura.

Figura 7 – Microscopia óptica de leveduras crescidas em meio YEPD, sob 30°C, após 48 horas de incubação, com aumento de 400x. (A) T1- Enriquecimento do meio com 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio; (B) Tratamento T16 – Enriquecimento do meio com 156 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio.

Com o aumento da concentração de selenito de sódio adicionado ao mosto, as leveduras apresentaram intensa tonalidade marrom avermelhado. Infere-se que uma possível explicação para essa mudança possa ser a biotransformação que acontece dentro da célula, pois quando o selenito é reduzido ao selênio amorfo, as células passam a adquirir cor avermelhada em função da cor natural já existente nessa substância (KONETZKA, 1977). Também foi observada mudanças no odor das colônias, as quais começaram apresentar semelhança ao cheiro de sulfeto de hidrogênio. Fato que pode ser atribuído a substituição que ocorre do enxofre pelo selênio nas enzimas, conforme já relatado por Suhajda et al. (2000). Isso acontece devido à grande semelhança entre o enxofre e o selênio, os compostos de selênio seguem as mesmas vias metabólicas e os metabolitos são análogos.

No trabalho de Bierla et al. (2013) eles investigaram a substituição e o grau de substituição do enxofre pelo selênio em metionina e cisteína em leveduras ricas em selênio a partir da espectrometria de massa plasmática acoplada indutivamente por HPLC capilar (ICP-MS), empregada em paralelo ao capHPLC-ESI MS. Como resultado a substituição do enxofre de cisteína é três vezes menos frequente que a do enxofre de metionina. Levando em consideração as quantidades de metionina e cisteína disponíveis nas células de levedura, os autores chegaram à conclusão que a estimativa da concentração de selenocisteína em leveduras ricas em selênio foi de 15 a 30% da selenometionina. Birringer et al. (2002) demonstraram que as pequenas quantidades de compostos orgânicos de selênio nas plantas, leveduras, bactérias ou animais são isólogos de compostos de enxofre e as enzimas envolvidas no metabolismo e na via da trans-sulfuração normalmente não discrimina entre os compostos de enxofre e selênio.

De acordo com os estudos de Nagodawithana et al., Kaur et al. (2006), Marinescu et al. (2011) e Stabnikova et al. (2008) a diminuição do número de células de levedura está diretamente relacionado com o aumento da concentração de selenito de sódio ao meio de cultura, isso porque as maiores quantidades de selenito de sódio no meio de cultura tem um forte efeito inibitório sobre o crescimento da levedura. Segundo a literatura, a desaceleração no crescimento de leveduras pode ser resultado da ocorrência de estresse oxidativo causado pela presença de selênio no meio de cultura, o que pode levar a outro fenômeno chamado de nível de peroxidação lipídica (KIELISZEK et al. (A), 2019).

A mudança morfológica das leveduras de acordo com o aumento da concentração de selenito de sódio ao meio de cultivo, também foi encontrada no trabalho de Rajashree et al. (2013), em que o grupo controle sem adição do selenito de sódio) possuía células de levedura com superfície e borda lisa, enquanto os tratamentos que apresentavam selenito de sódio no meio de cultivo, adquiriram rugosidade na superfície das células de levedura. Através da microscopia eletrônica de varredura, ele identificou danos na parede celular das leveduras, e associou à alta concentração de selenito de sódio, o que pode ser a causa da redução do número de células de levedura. Segundo Kieliszek et al. (2016), a adição do sal, vai aumentar a pressão osmótica do meio e reduzir a pressão da célula, e a parede que não foi destruída, fica mais enrugada, devido à formação de sulcos, formando assim a rugosidade identificada.

O selênio altera as características morfológicas da levedura, como por exemplo, alterando a estrutura do complexo da parede e membrana da célula. No trabalho de Kieliszek et al. (B) (2019), a suplementação de selênio aumentou a participação de ácidos insaturados, como ácido linoleico e ácido linolênico, na biomassa de *Candida utilis* (ATCC 9950) e *Saccharomyces cerevisiae* (MYA-2200). Como a biossíntese desses ácidos pode estar associada ao aumento da atividade da dessaturase e à peroxidação lipídica, esses processos podem estar diretamente ligados às alterações na morfologia das células de levedura. Algumas alterações já mencionadas na literatura são: aumento no tamanho das células, diminuição do número das leveduras, espessamento do citoplasma ou alteração na estrutura do vacúolo (Kieliszek, 2016).

Os resultados das imagens da microscopia óptica (Figura 7) corroboram com aqueles do estudo do Kieliszek et al. (2016), onde a análise das imagens microscópicas das leveduras da espécie *Candida utilis* (TCC 9950), demonstrou que a presença de selênio de sódio (20, 30 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) nos meios experimentais, causou um aumento significativo da célula, da área transversal das células por conta de aglomerações entre as mesmas e de vacúolos, quando comparadas às células cultivadas no meio YPD de controle. Comparando ainda com outros resultados semelhantes, Rajashree et al. (2013) também identificou a mudança na superfície das leveduras na microscopia eletrônica de varredura. A superfície lisa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) do controle, contrastaram com a superfície rugosa das

leveduras cultivadas em meio enriquecido com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, enquanto as cultivada em $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram parcialmente danificadas.

O fato do processo de adaptação permitir com que as células de leveduras se desenvolvessem até $246 \mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, no meio de cultivo, pode ser devido uma propriedade singular de aumento da tolerância aos metais tóxicos e, portanto, as células de levedura podem adquirir tolerância ao estresse e novas alterações metabólicas. Habilidade que pode ser adquirida quando expostas à pressão de seleção apropriada (WHITE, 1987). Segundo Bronzetti et al. (2001), a adição de altas concentrações de selenito de sódio ao meio de cultivo, demonstrou um efeito mutagênico nas células de levedura da espécie *Saccharomyces cerevisiae* D7, gerando diminuição de 70% na sobrevivência celular quando compara com o grupo controle.

As mudanças em todas essas características com o aumento da concentração de selenito de sódio demonstra como as leveduras sofreram modificações e/ou adaptações para conseguir sobreviver ao estresse causado pelo enriquecimento do meio de cultivo, o que pode induzir a crer que tenha ocorrido evolução adaptativa das células de leveduras.

Figura 8 – Microscopia eletrônica de varredura da leveduras *Saccharomyces cerevisiae* cultivadas em meio YEPD, magnitude 10.00 KX, sob 30°C, após 48 horas, (A) Controle – Sem enriquecimento; (B) T1 – Enriquecimento do meio com 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, (C) T10 – Enriquecimento do meio com 120 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio e (D) T31 - Enriquecimento do meio com 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio.

2.5 Conclusão

A concentração máxima de selenito de sódio tolerada pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*, linhagem Y904, durante o crescimento em meio de cultivo, obtido a partir do meio YEPD, foi de 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O processo de adaptação das leveduras ao selenito de sódio, permite realizar o cultivo da levedura Y904 em substrato com até 246 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio.

O processo de adaptação das leveduras às altas concentrações de selenito de sódio pode promover modificações morfofisiológicas nas células, tais como: as colônias de leveduras deixam a de apresentar coloração bege brilhantes e adquirem a coloração de vermelha alaranjada intensa, adquirindo rugosidade nas bordas e diminuindo a velocidade de crescimento e o número de colônias em meio de cultivo enriquecido no nutriente.

Em análise por MEV é possível verificar que as leveduras adaptadas às altas concentrações de selenito de sódio no meio apresentam aumento de rugosidade na superfície. Além disso, algumas ranhuras, semelhantes à fissuras, na superfície das células.

Referências

AMANULLAH, M.; ZAMAN, G. S.; RAHMAN, J.; RAHMAN, S. S. Lipid peroxidation and the levels of antioxidant enzymes in hypertension. **Free Radicals and Antioxidants**, Philadelphia, v. 2, n. 2, p. 12-18, 2012.

ARTHUR, J. R.; MCKENZIE, R. C.; BECKETT, G. J. Selenium in the immune system. **The Journal of nutrition**, v. 133, n. 5, p. 1457S-1459S, 2003.

BELLUCO, A. E. de S. **Obtenção de leveduras vivas enriquecidas para suplementação nutricional e probiótico**. 2008. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

BERNARDI, G. et al. Concepções prévias dos alunos dos anos iniciais sobre microrganismos. **Revista Ciências & Ideias ISSN: 2176-1477**, v. 10, n. 1, p. 55-69, 2019.

BIERLA, K. et al. A comparative study of the Se/S substitution in methionine and cysteine in Se-enriched yeast using an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS)-assisted proteomics approach. **Journal of proteomics**, v. 87, p. 26-39, 2013.

BIRINGER, M.; PILAWA, S.; FLOHÉ, L. Trends in selenium biochemistry. **Natural product reports**, v. 19, n. 6, p. 693-718, 2002.

BRONZETTI, G. et al. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 496, n. 1-2, p. 105-115, 2001.

CANHOS, V. P.; MANFIO, G. P. Recursos microbiológicos para Biotecnologia. URL: [http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias% 20_Vanderlei% 20Fina_.pdf](http://www.mct.gov.br/Temas/biotec/Tendencias%20Vanderlei%20Fina_.pdf), 2001.

CASEIRO, C. A produção e o consumo de biocombustíveis no mundo atual: questões-chave para analisar a sua sustentabilidade. **CAMPO TERRITÓRIO: revista de geografia agrária**, v. 6, n. 12, p. 6-31, 2011.

DESMONTS, R. Tecnologia da produção dos fermentos secos de destilaria. **Boletim Inform. da Ass. Paul. Med**, v. 8, p. 1-7, 1966.

EUA devem destinar recorde de 145,6 mi t de milho para etanol em 2018/19, diz Datagro. Nova cana. Disponível em: <<https://www.novacana.com/n/internacional/eua-destinar-recorde-145-6-mi-t-milho-etanol-2018-19-datagro-070818>>. Acesso em: 22ago. 2019.

ICIDCA. Instituto Cubano de Pesquisa dos Derivados da Cana-de-açúcar. Manual dos derivados da cana-de-açúcar: diversificação, matérias-primas, derivados do 122 bagaço, derivados do melaço, outros derivados, resíduos, energia. Brasília: ABIPTI, 1999. p. 49-55, 267-271, 297-301.

FALEIRO, F. G.; DE ANDRADE, S. R. M. Biotecnologia: uma visão geral. **estado da arte e aplicações na agropecuária**, p. 13, 2011.

LEITE, R. C. de C., LEAL, M. R. LV. O biocombustível no Brasil. **Novos estudos CEBRAP**, n. 78, p. 15-21, 2007.

KIELISZEK, M. et al. Effects of selenium on morphological changes in Candida utilis ATCC 9950 yeast cells. **Biological trace element research**, v. 169, n. 2, p. 387-393, 2016.

KIELISZEK, M. et al. (A) Effect of selenium on growth and antioxidative system of yeast cells. **Molecular biology reports**, v. 46, n. 2, p. 1797-1808, 2019.

KIELISZEK, M. et al. (B) Effect of selenium on lipid and amino acid metabolism in yeast cells. **Biological trace element research**, v. 187, n. 1, p. 316-327, 2019.

KONETZKA, W. A. Microbiology of metal transformations. In: WEINBERG. E. D. (Ed). Microorganisms and Minerals. New York: Marcel Dekker, 1977. p. 317-337.

MARTINIANO, S. E. **Produção de leveduras enriquecidas com selênio a partir de resíduos vegetais**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2007.

MEHDI, Y., HORNICK, J. L., ISTASSE, L., DUFRASNE, I. Selenium in the Environment, Metabolism and Involvement in Body Functions. *Molecules*, 18(3), pp. 3292-3311. 2013.

MUSSATTO, S. I. et al. Technological trends, global market, and challenges of bio-ethanol production. **Biotechnology advances**, v. 28, n. 6, p. 817-830, 2010.

GOES, T.; MARRA, R. Biocombustíveis: uma alternativa para o mundo, uma oportunidade para o Brasil. **Área de Informação da Sede-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2008.

GOLDEMBERG, J. Biomass and energy. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 582-587, 2009. NELSON, David L.; COX, Michael M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. ArtmedEditora, 2014.

PEDRERO, Z.; MADRID, Y. Novel approaches for selenium speciation in foodstuffs and biological specimens: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, n. 2, p. 135-152, 2009.

Produção de etanol na safra 2019/2020 deve aumentar 7,1%. UNICA. Disponível em:

<https://agenciabrasil.ebc.com.br/economia/noticia/2019-12/producao-de-etanol-na-safra-20192020-deve-aumentar-71-diz-unica>

RAJASHREE, K.; MUTHUKUMAR, T. Preparation of selenium tolerant yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Microbiology and Biotechnology Research**, v. 3, n. 3, p. 46-53, 2013.

ROEPCKE, C. B. S; VANDENBERGHE, L. P. S.; SOCCOL, C. R. Optimized production of *Pichia guilliermondii* biomass with zinc accumulation by fermentation. **Animal Feed Science and Technology**, V. 163, p. 33-42, 2011.

SANTOS, C., FONSECA, J. Selênio: fisiopatologia clínica e nutrição. Associação Portuguesa de Nutrição Entérica e Parentérica, 7(1), pp. 2-9. 2013.

STOLZ, J. F. et al. Arsenic and selenium in microbial metabolism. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 60, p. 107-130, 2006.

SUHAJDA, A. et al. Preparation of selenium yeasts I. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 14, n. 1, p. 43-47, 2000.

TINGGI, U. Essentiality and toxicity of selenium and its status in Australia: a review. **Toxicology Letters**. 137 p. 2003.

WANG, Z.; ZHANG, L.; TAN, T. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS2 for selenium-enriched yeast production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 6, p. 1836-1840, 2010.

WHITE, C.; GADD, G. M. The uptake and cellular distribution of zinc in *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbiology**, v. 133, n. 3, p. 727-737, 1987.

ZEYL, C. Budding yeast as a model organism for population genetics. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 773-784, 2000.

3. FERMENTAÇÃO COM LEVEDURA Y904 ADAPTADAS EM MEIO ENRIQUECIDO COM SELÊNIO

Resumo

O selênio (Se) é considerado um mineral essencial à saúde humana, devido as suas diversas funções, principalmente como antioxidante através da formação de selenoproteínas como glutathione peroxidase. Com o intuito de gerar um produto rico nas diversas formas de selênio (inorgânica, orgânica e selenoproteínas) para contribuir para o desenvolvimento de alimentos nutracêuticos que possam auxiliar na redução da deficiência desse micronutriente que existe em algumas regiões do mundo, leveduras foram utilizadas como via para enriquecimento em diferentes concentrações de selênio. Isto porque esses microrganismos são capazes de absolver selênio inorgânico transformando-os em orgânico através da ligação com aminoácidos (metionina ou cisteína), podendo assim produzir as selenoproteínas. Desta forma o objetivo do trabalho foi realizar fermentações em mostos com altas concentrações de selênio, utilizando leveduras adaptadas aos altos teores desses micronutrientes. Os parâmetros avaliados foram: viabilidade celular, biomassa, desprendimento de CO₂, concentração de células, teor alcoólico, produtividade, rendimento, teor de açúcares, glicerol e selênio inorgânico. Os teores de açúcares e glicerol foram determinados com o auxílio de um cromatógrafo de íons (IC) e selênio inorgânico pelo ICP-OES (espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado). Após o ensaio fermentativo os tratamentos T2 e T3 (enriquecidos com 60 e 150 µg mL⁻¹ de selenito de sódio) obtiveram os melhores resultados tanto nos parâmetros fermentativo (viabilidade celular, biomassa, desprendimento de CO₂ e teor alcoólico) quanto nas análises de açúcares (glicose, frutose e sacarose), glicerol e selênio inorgânico. Os resultados demonstraram que as leveduras submetidas ao tratamento T3 apresentaram maiores concentrações de selênio inorgânico (± 5.562 mg L⁻¹), portanto, espera-se uma transformação em selênio orgânico para formação das selenoproteínas, mais elevada neste tratamento do que nos outros tratamentos. Conclui-se que o melhor tratamento para enriquecer as leveduras em selênio através da fermentação em meio líquido foi de 150 µg mL⁻¹ de selenito de sódio, pois observa-se maior acúmulo de selênio inorgânico na biomassa, além da confirmação através dos outros parâmetros analisados.

Palavras-chave: Selenoproteínas, Aminoácidos, Antioxidante, Selenito de sódio

Abstract

Selenium (Se) is considered an essential mineral for human health, due to its diverse functions, mainly as an antioxidant through the formation of selenoproteins such as glutathione peroxidase. In order to generate a product rich in various forms of selenium (inorganic, organic and selenoproteins) to contribute to the development of nutraceutical foods that can help reduce the deficiency of this micronutrient that exists in some regions of the world, yeasts were used as a route for enrichment in different selenium concentrations. This is because these microorganisms are able to absorb inorganic selenium transforming them into organic through the connection with amino acids (methionine or cysteine), thus being able to produce selenoproteins. Thus, the objective of the work was to carry out fermentations in musts with high concentrations of selenium, using yeasts adapted to the high levels of these micronutrients. The parameters evaluated were: cell viability, biomass, CO₂ shedding, cell concentration, alcohol content, productivity, yield, sugar content, glycerol and inorganic selenium. The contents of sugars and glycerol were determined with the aid of an ion chromatograph (IC) and inorganic selenium by ICP-OES (coupled plasma atomic emission spectrometry). After the fermentation test, the T2 and T3 treatments (enriched with 60 and 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of sodium selenite) obtained the best results both in the fermentative parameters (cell viability, biomass, CO₂ shedding and alcohol content) and in the analysis of sugars (glucose, fructose and sucrose), glycerol and inorganic selenium. The results showed that the yeasts submitted to the T3 treatment presented higher concentrations of inorganic selenium ($\pm 5,562 \text{ mg L}^{-1}$), therefore, a transformation in organic selenium is expected to form selenoproteins, higher than in the other treatments. It is concluded that the best treatment for enriching yeasts in selenium through fermentation in liquid medium was 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of sodium selenite, as there is a greater accumulation of inorganic selenium in the biomass, in addition to confirmation by others analyzed parameters.

Keywords: Selenoproteins, Amino acids, Antioxidant, Sodium selenite

3.1 Introdução

O selênio é um micronutriente essencial ao organismo dos animais e seres humanos. Presente na natureza nas formas inorgânica (selenito e selenato) e orgânica ligado a um aminoácido (selenocisteína e selenometionina). Esse nutriente desempenha importantes funções, atuando: no combate a radicais livres através das selenoproteínas, conversão dos hormônios da tireoide T4 (estado inativo) em T3 (estado ativo), protege o organismo contra metais tóxicos e xenobióticos, pode prevenir doenças crônicas e não transmissíveis como diabetes, Parkinson e Ausaímer. Está envolvido em processos biológicos importantes como a produção de ubiquinona e ATP mitocondrial. Além disso, ao nível celular, o selênio facilita a regeneração das células, inibe a proliferação de células cancerígenas e tem um efeito positivo no funcionamento do sistema circulatório (KIELISZEK (A), 2019).

Como o selênio é um mineral que entra na cadeia alimentar através dos vegetais, sua concentração depende do solo onde está sendo desenvolvido o vegetal. Em algumas regiões do mundo que são vulcânicas, com solo ácido, apresentam baixas concentrações de selênio, isso acaba refletindo na disponibilidade desse nutriente para a população, a qual passa a apresentar deficiência desse mineral no organismo.

Para suprir e ajudar a superar a deficiência desse oligoelemento, as leveduras são utilizadas como via de enriquecimento em selênio, pois esses microrganismos têm a capacidade de absorver o selênio na forma inorgânica do meio de crescimento e transformá-lo na forma orgânica, podendo aumentar a atividade das enzimas antioxidantes (selenoproteínas) como a glutathione peroxidase (WANG, 2011).

Portanto, o objetivo do trabalho foi investigar fermentações realizadas em mosto com altas concentrações de selênio, utilizando leveduras, da linhagem Y904, adaptadas aos altos teores desses micronutrientes e verificar a capacidade de enriquecer essas leveduras em selênio inorgânico.

3.2 Revisão da literatura

O selênio (Se) é um oligoelemento pertencente ao grupo 16 (VI A) da tabela periódica, pode se apresentar sob 4 estados de oxidação: selenato, selenito, selênio elementar e seleneto (ASSUNÇÃO, 2011). Este nutriente é essencial aos animais e

seres humanos, pode ser encontrado em diversos alimentos, como: Castanha-do-pará, atum, fígado bovino, galinha, arroz e ovo (FERREIRA, 2002). Atualmente, a dose diária recomendada de selênio é estipulada em 55 µg/dia para homens e mulheres adultos e saudáveis (Decreto-Lei n.º 54/2010) (NÓBREGA, 2015).

Embora seja um mineral essencial, o Se também apresenta uma vertente de toxicidade, sendo a diferença entre os níveis essenciais e tóxicos bastante estreita (ALEXANDER, 2015). A dose máxima admissível está fixada em 300 - 400 µg dia⁻¹ e a dose letal média varia entre os valores de 1,5 e 6 mg kg⁻¹ de peso corporal (NÓBREGA, 2015).

O Se está distribuído de forma bem diversificada pelo mundo, algumas regiões com solo rico no micronutriente e outras com áreas de baixíssimas concentrações do elemento, isso resulta em uma variação substancial no seu teor em alimentos de diferentes países e regiões. O Se existe na natureza em duas formas químicas, incluindo selênio inorgânico (selenito, selenato, nanopartículas elementares de Se, Se (SeNPs)) e Se orgânico (selenocisteína, selenometionina, selenoproteínas, etc.) (Biswas et al., 2011).

Algumas plantas e microrganismos são capazes de substituir o enxofre (S) dos aminoácidos cisteína e metionina por Se inorgânico, transformando-os em fontes orgânicas como: a selenocisteína (SeCis) e selenometionina (SeMet), que podem ser incorporadas em proteínas, gerando as chamadas selenoproteínas. No corpo humano, as selenoproteínas estão envolvidas no metabolismo do hormônio tireoidiano, na função imunológica, proteção contra distúrbios cardiovasculares, câncer e nas defesas antioxidantes, com propriedades anti-inflamatórias, quimio-preventivas e antivirais.

Existem 25 genes que codificam para selenoproteínas. A família das selenoproteínas, em humanos, inclui os seguintes membros: glutathione peroxidases (GPX1 - GPX4 e GPX6), tioredoxina redutase (TXNRD1-2), tioredoxina-glutathione redutase (TXNRD3), iodotironina desiodinases (DIOFOFOSFO- 3), Selenoproteína de 15 kDa (SELENOF) entre outras. O baixo teor de Se na dieta pode resultar em deficiência de selenoproteínas, levando a doenças humanas como a doença de Keshan, doença de Kashin-Beck, cretinismo endêmico mixedematoso e infertilidade masculina (Nóbrega, 2015).

Em leveduras e plantas não há incorporação da selenocisteína e selenometionina e, portanto, não possuem selenoproteínas naturalmente. As

mesmas precisam absorver o Se na forma de selenato ou selenito para então sintetizarem o selênio na forma orgânica, gerando posteriormente as selenoproteínas. Considera-se que a absorção de compostos Se nas células ocorre através de transportadores de ânions. Independentemente da forma como o Se é recebido, ele deve ser metabolizado em Se orgânico para ser incorporado nas selenoproteínas (ZOIDIS, 2018).

A primeira selenoenzima identificada foi a glutathione peroxidase (GPX), que catalisa a oxidação da glutathione citosólica (GSH) pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A GPX foi descoberta nos eritrócitos, onde remove H_2O_2 formado pela dissociação da oxihemoglobina em O_2 e metemoglobina. A falta de equilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) ou nitrogênio (RNS) e a ação de sistemas antioxidantes protetores é definida como estresse oxidativo. Em condições normais, existe um equilíbrio entre a geração de radicais livres e a proteção antioxidante na célula. No entanto, o aumento da geração de ROS e RNS ou o comprometimento da capacidade de proteção antioxidante levam ao estresse oxidativo (PERSSON et al, 2014; RAMOUTAR et al, 2010; SCHACTER, 1986 e ZOIDS, 2018).

A GPX pode agir de três formas, a primeira é por prevenção, impedindo a formação de radicais livres. Isto porque inativa catalisadores ou remove precursores de radicais livres. A segunda é a interceptação de defesa antioxidante. Consiste em antioxidantes de quebra de cadeia e a última é reparação dos danos que os radicais livres podem causar.

Além da atuação contra os radicais livres, o Se vai ajudar no metabolismo dos hormônios tireoidianos. Desempenhando um papel vital no funcionamento do organismo humano, a tireoide é uma glândula endócrina situada na região anterior e inferior do pescoço (VARTANIAN, 2013). A sua principal função é a produção dos hormônios T4 e T3, que estimulam o metabolismo e afetam a taxa funcional de muitos outros sistemas do corpo. O Se vai ajudar na conversão do hormônio T4 na sua forma inativa para T3 (forma ativa) (SEELEY et al., 2008). Outra importante atuação do Se é no sistema imunológico, vários órgãos do corpo humano como fígado, baço e gânglios que se encontram envolvidos no sistema imune contém concentrações significativas de Se. O sistema imune é bastante suscetível aos danos provocados pelo estresse oxidativo. Sendo assim, o selênio pode auxiliar na

proteção e/ou redução dos danos por ele provocados (The British Nutrition Foundation, 2001).

Diante da importância deste micronutriente e como em algumas regiões do mundo existem populações com deficiência do mesmo, muitos alimentos têm sido desenvolvidos com a suplementação de Se e até geração de probióticos a partir das leveduras.

As leveduras são organismos eucariotos unicelulares que são utilizados pela indústria alimentícia, farmacêutica e na geração de etanol. Por apresentarem elevado teor de aminoácidos, as leveduras são excelentes fontes de lisina, um aminoácido essencial. Além de serem uma fonte de proteínas, esses microrganismos são capazes de incorporar microelementos em biomoléculas, acumulando-se em concentrações elevadas, sendo frequentemente utilizados como veículos de suplementos minerais (ROEPCKE; VANDENBERGHE, SOCCOL, 2011).

No setor sucroenergético as leveduras são muito utilizadas para a produção de etanol combustível pelo processo de fermentação alcoólica, um processo de geração de energia que ocorre sem a presença de gás oxigênio. Onde a partir do mosto açucarado com ajuda das leveduras é gerado o etanol. Levando em consideração que o setor sucroenergético pode apresentar o excedente de aproximadamente 20 kg de leveduras por m³ de etanol produzido, o qual pode ser retirado na forma de sangria, após o tratamento ácido do fermento (DESMONTS, 1966), essa indústria apresenta grande potencial disponível, cerca de 600.000.000 de quilos de leveduras por ano, o qual pode ser utilizado para finalidades especiais. Por isso, o presente trabalho propôs investigar possibilidades de utilizar esse excedente. Para tanto, realizando-se fermentação, em meio enriquecido em diferentes concentrações de selênio, visando obter leveduras ricas em selênio nas suas diversas formas, principalmente nas selenoproteínas (que atuam principalmente no combate a radicais livres). Além disso, verificar se podem ser usadas posteriormente como suplementação animal e geração de probióticos.

3.3 Material e métodos

3.3.1 Local dos ensaios

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Tecnologia Sucroenergética e Bioenergia (LTSBio), Setor de Açúcar e Álcool, Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição, da ESALQ/USP.

3.3.2 Ensaio de fermentação alcoólica utilizando mosto enriquecido com selênio

Os ensaios de fermentação alcoólica foram conduzidos para avaliar os tratamentos descritos na Tabela 2. Os tratamentos variaram entre si em relação a concentração de selenito de sódio adicionado ao mosto. Cada tratamento foi realizado com 5 repetições.

Tabela 2 - Descrição dos tratamentos do ensaio fermentativo.

Tratamento	[] de selenito de sódio adicionada ao mosto
T1	0 $\mu\text{g mL}^{-1}$
T2	60 $\mu\text{g mL}^{-1}$
T3	150 $\mu\text{g mL}^{-1}$

As leveduras, linhagem Y904, utilizadas para a fermentação passaram por um processo prévio de adaptação em meio YEPD, sendo posteriormente submetidas ao processo de fermentação alcoólica, sob as concentrações de 0, 60 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio no mosto. O esquema ilustrativo do preparo do mosto e condução do ensaio pode ser observado nas Figuras 9 e 10.

Figura 9 - Esquema do preparo do mosto para fermentação alcoólica: (A) Tratamento 1; (B) Tratamento 2 e (C) Tratamento 3.

Figura 10 - Ilustração da condução do ensaio de fermentação alcoólica: (A) Tratamento 1; (B) Tratamento 2 e (C) Tratamento 3. Todos contendo 5 repetições cada.

O xarope utilizado no preparo do mosto, foi inicialmente clarificado, juntamente com o selenito de sódio. Para tal, o xarope foi diluído com a água destilada e o teor de solido solúveis foi ajustado para 16°Brix. Em seguida, foi aquecido até a fervura e mantido nesta condição durante 15 minutos. Na sequência, a solução de xarope foi centrifugada a 4000 rpm durante 10 min para retirar o sobrenadante. Posteriormente, para cada 2 litros de xarope diluído fervido, foram adicionados 5 g de fosfato de sódio monobásico ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$) e a concentração de selenito de

sódio correspondente a cada tratamento. Em seguida, foi realizada a esterilização desse material em autoclave, sob temperatura de 120°C, 1 atm e durante 15 min.

A fermentação alcoólica foi conduzida utilizando Erlenmeyers de 250 mL, contendo 125 mL de mosto. Os meios de cultivos contidos nesses reatores foram inoculados com a leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (4% m v⁻¹), linhagem Y904, que havia sido anteriormente adaptada com a respectiva concentração de selênio para cada tratamento, conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Condição de cultivo para a adaptação que as leveduras de cada tratamento sofreu antes do processo fermentativo.

Tratamento	Adaptação
T1	As leveduras não sofreram adaptação anteriormente
T2	As leveduras foram adaptadas até a [] de 60 µg mL ⁻¹ de <u>selenito de sódio</u>
T3	As leveduras foram adaptadas até a [] de 150 µg mL ⁻¹ de <u>selenito de sódio</u>

A inoculação da levedura no mosto (contendo 16 g L⁻¹ de ART), bem como, todo o processo, foi feito em câmara de fluxo laminar, a fim de minimizar a possibilidade de contaminação bacteriana. As avaliações da viabilidade celular, foram feitas através da coleta de amostras a cada 2 horas, durante todo o processo de fermentação. O processo foi mantido sob agitação de 120 rpm, em Shaker, sob a temperatura 30 ± 3°C, acompanhado por meio do desprendimento de CO₂ dos reatores. Sendo considerado o término da fermentação, quando os pesos dos reatores estabilizaram.

Ao final das fermentações, as amostras de vinhos, obtidas dos diferentes tratamentos, foram centrifugadas, utilizando centrífuga da marca Thermo Fisher Scientific modelo Sorvall ST 40R, a 3925 g durante 10 minutos. A partir dessa centrifugação foram obtidas amostras de vinho delevedurado e leveduras, as quais foram armazenadas em freezer, sob temperatura de -20°C para posterior análises.

3.3.3 Análise de viabilidade celular das leveduras

A análise de viabilidade celular da população de leveduras foi determinada através da coloração diferencial das células pela solução de azul de metileno 0,1% e as contagens das células vivas e mortas, em câmaras de Neubauer, por microscopia ótica, de acordo com metodologia descrita por Pierce (1970). Esta análise foi realizada a cada duas horas durante toda a fermentação.

Para as análises foi coletado 0,5 mL de mosto com leveduras a cada 2 horas de cada um dos reatores e adicionados a 9,5 mL de água destilada com tween. Em seguida, dessa solução foi transferido 0,3 mL para um tubo de ensaio e adicionado 0,3 mL da solução de azul de metileno 0,1%. O material foi agitado e 0,1 mL da amostra obtida foi transferida para a câmara de Neubauer. Com o auxílio do microscópio óptico, em aumento de 40X x 10X. As células incolores (foram consideradas ativas) e das coradas com azul de metileno (consideradas inativas). A viabilidade celular foi calculada por meio da Equação 1:

$$V(\%) = \frac{\text{número de células incolores}}{\text{número de células incolores} + \text{número de células coradas}} \times 100$$

(Eq. 1)

3.3.4 Biomassa

A biomassa de levedura inicial foi pesada para então ser adicionada ao mosto. Já para o cálculo da biomassa final, 100 mL de vinho foram centrifugados à 2917,90 g, durante 10 minutos. Ao término da centrifugação, com a utilização de tubos graduados (em 100 mL), foram medidos os volumes de biomassa (úmido), que foi relacionado com o volume total da amostra. De modo que, se obteve resultados em mL mL⁻¹.

3.3.5 Desprendimento de CO₂

A verificação da evolução das fermentações, foi avaliada pelo desprendimento de CO₂ nas fermentações, conforme os tratamentos de interesse. Para tanto, a determinação do desprendimento do CO₂ foi realizada pela pesagem

dos frascos Erlenmeyers, a cada hora de fermentação, através do uso da balança semi-analítica.

3.3.6 Concentração de leveduras

A cada 2 horas de processo fermentativo, foi medido o volume de leveduras presente no reator. Em seguida, as amostras foram centrifugadas sob 3925 g por 10 minutos. Ao término dessa etapa foi medido o volume do sobrenadante e por diferença foi encontrado o volume de sedimento (creme de levedura). A partir desses dados foi calculada a concentração de leveduras % v v⁻¹ (Equação 2) relacionada a porcentagem de volume e a concentração em grama de matéria seca, por litro de suspensão pela Equação 3 (KOSHIMIZU et al., 1982).

$$X = \frac{V_s}{V_T} \times 100$$

(Eq. 2)

Onde:

X: Concentração de leveduras na suspensão, % v v⁻¹

V_s: Volume ocupado pelo sedimento, mL

V_T: Volume total, mL

$$Y = 0,01 + 3,02 \times X$$

(Eq. 3)

Onde:

X: Concentração de leveduras na suspensão, % v v⁻¹

Y: Concentração de leveduras na suspensão, g L⁻¹

3.3.7 Teor alcoólico

Em cada unidade experimental, foram coletadas amostras de 25 mL de vinho. Estas alíquotas foram destiladas, utilizando o destilador para álcool, modelo TE-10, marca Tecnal. A destilação foi conduzida até que o volume de 25 mL fosse coletado em um balão volumétrico colocado na válvula de saída do condensado do destilador.

Em densímetro digital, modelo SH 5000, da marca Schmidt Haensch, devidamente estabilizado, em temperatura de trabalho de 20°C com desvio de 0,05°C, e calibrado, com a injeção de ar e água, respectivamente. As amostras provenientes do destilador foram transferidas as alíquotas de amostra no tubo

receptor de amostra, tomando-se o cuidado para não haver formação de bolhas de ar dentro do tubo de leitura.

Completado o tubo com a amostra, foi realizada a leitura, a qual foi expressa como percentual em volume de álcool puro existente no volume da mistura (% v v⁻¹), correspondente ao °GL (ZAGO et al., 1996).

3.3.8 Rendimento fermentativo

O rendimento fermentativo foi calculado considerando a concentração de açúcares redutores totais e a concentração de álcool no vinho delevedurado. Com base na relação estequiométrica da fermentação alcoólica, foi considerado que 100% de rendimento ocorre quando há formação de 51,11 g (64,75 mL) de etanol a partir de 100 g de açúcares redutores totais.

3.3.9 Produtividade de etanol

Com base na concentração alcoólica do vinho ao final da fermentação, por volume de vinho, e no tempo de fermentação, foi calculada a produtividade, em gramas de álcool por hora (g L h⁻¹).

3.3.10 Teores de açúcares (Açúcares redutores e açúcares redutores totais)

Para a determinação das concentrações de glicose, frutose, sacarose e glicerol, foi empregada a cromatografia iônica, com o auxílio de um cromatógrafo de Íons, modelo IC 930, da marca Metrohm® conforme descrito por EITH et al. (2006).

Para a análise foi utilizado coluna cromatográfica, modelo Metrosep Carb 1 – 150/4.0 e detector amperométrico. A solução de eluente foi preparada com hidróxido de sódio 200 mM, com fluxo de 1,0 mL min⁻¹. A temperatura da coluna cromatográfica foi mantida constante sob 35 °C. As amostras de mosto de ambos os tratamentos foram diluídas 300 vezes e as de vinho, 10 vezes. Ambas as amostras foram filtradas em unidades filtrantes Durapore de 0,45µm. Foram injetados 0,25 µL de amostra e o tempo da corrida cromatográfica foi de 9 minutos.

3.3.11 Selênio inorgânico

As análises de selênio inorgânico foram realizadas por Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplada indutivamente (ICP OES) no mosto inicial, mosto final, levedura inicial e leveduras final de todos os tratamentos.

Antes das amostras serem detectadas e quantificadas pelo ICP OES, as mesmas foram submetidas ao processo de digestão, com adição de 6mL de ácido nítrico 20% e 2mL de peróxido de hidrogênio 30%, com auxílio de forno micro-ondas para análise químicas (sistema de alta pressão), de acordo com a metodologia descrita por Catarino et al., 2010. Em seguida, para a construção da curva de calibração foi utilizada água de alta pureza (resistividade 18,2 M cm) obtida por um sistema de purificação de água MilliQ®. Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico-reagente.

Recipientes de plástico e vidrarias foram limpas com imersão em solução de ácido nítrico, 1,4 mol L⁻¹, durante 24 h. Na sequência, esses recipientes e as vidrarias foram lavados com água de alta pureza, secos e armazenados em uma câmara de fluxo laminar, da classe 100.

Solução padrão de estoque de selênio, em concentração de 1000 mg L⁻¹, foi preparada para então ser diluída e se construir a curva de calibração. Posteriormente, as amostras já digeridas, foram diluídas 15 vezes em tubos Falcon para serem lidas pelo espectrômetro. Os parâmetros operacionais utilizados para o uso do ICP-OES foram conforme descritos por Silva et al., 2009.

3.3.12 Análises estatísticas

O delineamento experimental utilizado para as duas etapas do experimento foi o inteiramente casualizado. Os resultados obtidos nas duas etapas deste projeto foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao Teste de comparação de média de Tukey ($p < 0,05$). Essas análises foram realizadas com o uso do programa SAS (HERZBERG, 1990).

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Ensaio de fermentação alcoólica enriquecida com selênio

A fermentação foi realizada em mosto de xarope com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* em duas modalidades, sem um pré-enriquecimento com selênio, referente ao tratamento 1 e pré-enriquecidas com 60 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, referentes aos tratamentos 2 e 3, respectivamente.

O ensaio da fermentação alcoólica foi iniciado com a inoculação da suspensão de células de leveduras pré-enriquecidas e adaptadas, com selênio e sem selênio, em Erlenmeyer de 250 mL, contendo 125 mL de mosto. As fermentações submetidas às condições dos Tratamentos T2 e T3, tiveram duração de 14 horas, ao passo que, as fermentações submetidas ao Tratamento T1, tiveram, duração de 10 horas.

3.4.2 Viabilidade celular das leveduras

Os resultados das análises de viabilidade celular das leveduras no início da fermentação, mostraram-se diferentes entre eles, de acordo com a Tabela 4. As leveduras utilizadas para os ensaios de fermentação foram provenientes do mesmo lote, as leveduras dos tratamentos T2 e T3 já vinham sendo adaptadas e multiplicadas à 3 meses (de acordo com suas respectivas concentrações) para então chegarem ao processo fermentativo. A viabilidade inicial do T1 foi de 98%, enquanto que T2 apresentou 69% e T3 73%.

Tabela 4 - Viabilidade celular antes do processo fermentativo.

Viabilidade Celular 0h	% de viabilidade celular inicial	Desvio Padrão	Teste de Tukey (p<0,05)
T1	98,00	0,00	C
T2	69,00	0,00	A
T3	73,00	0,00	B
C. V. (%)	0,0		

T: Tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas do desvio padrão e letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Após 10 horas de fermentação, as leveduras submetidas ao tratamento T1 concluíram a fermentação, e novamente os tratamentos continuam sem semelhanças entre si. De acordo com a Tabela 5 o Tratamento T1 chega ao final do

processo com viabilidade 56% enquanto o T2 com 79% e T3 86% ainda continuam no processo fermentativo. Esta queda na viabilidade do T1 possivelmente se deve por causa do esgotamento dos teores de nutrientes e a formação de inibidores durante a fermentação. Outra possível explicação para essa diferença de viabilidade entre os tratamentos, seria a adaptação ocorrida nas leveduras dos tratamentos T2 e T3 na fase latente ou lag, fase caracterizada pela adaptação, onde pode ocorrer aumento da massa das células, mas não de multiplicação das mesmas. Então, estando melhor adaptadas a esta fase, as leveduras teriam um melhor desenvolvimento e mais chances de sobrevivência.

Tabela 5 - Viabilidade celular após 10 horas de processo fermentativo

Viabilidade Celular 10h	% de viabilidade celular final	Desvio Padrão	Teste de Tukey (p<0,05)
T1	56,00	0,03	A
T2	79,00	0,02	B
T3	86,00	0,01	C
C.V. (%)	2,78		

T: Tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas do desvio padrão e letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Com 14 horas de fermentação os tratamentos T2 e T3 finalizam o processo com 84% de viabilidades em ambos os tratamentos. Nesse momento os tratamentos T2 e T3 mostram-se semelhantes como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6 - Viabilidade celular após 14 horas de processo fermentativo.

Viabilidade Celular 14h	% de viabilidade celular final	Desvio Padrão	Teste de Tukey (p<0,05)
T1	-	-	-
T2	84,00	0,04	A
T3	84,00	0,02	A
C.V. (%)	4,29		

T: Tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas do desvio padrão e letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre si submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Na Figura 11 pode-se verificar a evolução de todos os tratamentos com relação a sua viabilidade durante o processo fermentativo e de como os tratamentos T2 e T3 se destacam em relação ao tratamento T1. A viabilidade dos tratamentos T2

e T3 aumentam exponencialmente de 69% e 73% respectivamente, para 84%, no decorrer da fermentação e mantém-se alta mesmo chegando ao fim. No final da fermentação os tratamentos T2 e T3 apresentam uma viabilidade cerca de 28% maior do que o T1, o que demonstra como o acúmulo de selênio nas células de levedura ou o selênio presente no meio interferiu na viabilidade. Alguns trabalhos existentes na literatura não apresentam diferença significativa na viabilidade celular com adição de selênio ao meio, como em Perez-Corona et al. (2011) onde eles inoculam cerca de 2×10^6 de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces bayanus*) em 50 mL de diferentes meios (solução de YEPD, suco de uva e suco de uva com 250 µg de selênio. Como o resultado das viabilidades foram semelhantes para ambas as leveduras nos diferentes meios, incluindo os que contém selênio inorgânico, isso significa que a presença de selênio no mosto não prejudicou a fermentação. Em Pankiewicz et al. (2007) culturas de *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas ao efeito do PFE (campo elétrico de pulso) e uma fonte de selenito de sódio, porém nenhum aumento adicional na concentração de selênio teve efeito significativo na viabilidade das células de levedura.

Sendo assim, como os melhores resultados foram referentes aos tratamentos T2 e T3, pode ser observado como o selenito de sódio adicionado em ambos os tratamentos interfere na viabilidade celular da levedura, possibilitando a mesma uma maior carga de nutriente necessário para o seu desenvolvimento.

Figura 11- Comportamento da viabilidade das células de levedura submetidas aos tratamentos T1, T2 e T3.

3.4.3 Biomassa

Foi inoculado em cada tratamento 4% de levedura (base seca), referente a 5g de inóculo. Na Tabela 7, encontram-se os resultados das massas de biomassa inicial e final das leveduras, expressas em g 125ml⁻¹, referentes ao ensaio de fermentação, nas condições dos três tratamentos avaliados.

Tabela 7 – Análise de Biomassa inicial e final do ensaio fermentativo.

Tratamento	Biomassa (g 125ml ⁻¹)	
	Inicial	Final
T1	5,20 (± 0,12) A	9,73 (±0,22) A
T2	5,38 (± 0,13) A	10,90 (±1,69) A
T3	5,28 (± 0,26) A	10,57 (±1,74) A
C.V. (%)	3,44	13,55

T: tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre se submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios de cada tratamento.

Por outro lado, na Figura 12, faz-se a comparação da biomassa inicial e final das leveduras submetidas ao processo fermentativo, conforme as condições definidas nos Tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente. As leveduras submetidas aos T2 e T3 obtiveram maior produção com 102,60% e 100,19% de aumento, respectivamente, de biomassa em relação as leveduras submetidas ao tratamento T1 com 87,11%. Contudo, ao se comparar a formação de biomassa entre as leveduras submetidas ao T2 (10,9 g) e T3 (10,57 g), verifica-se que as diferenças foram pouco significativa. Porém, mesmo assim, o tratamento T2 adquiriu uma maior produção de biomassa, com 3,12% maior do que o tratamento T3.

Na literatura semelhantes resultados são encontrados. No trabalho desenvolvido por Zhou et al. (2015) tem-se respostas positivas sobre o aumento de biomassa com relação ao uso do selênio. Com o objetivo de determinar a concentração ótima de selenito de sódio sob a qual a reprodução da levedura e sua capacidade fermentativa fossem melhores, eles utilizam concentrações de 0 á 1,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio para enriquecer o meio de desenvolvimento das leveduras: *Saccharomyces cerevisiae* e *Zygosaccharomyces rouxii*. A concentração de 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, gerou a melhor concentração de biomassa com aumento de 15% da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e 11% da *Zygosaccharomyces rouxii* quando comparadas ao grupo controle com adição de 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio.

Em outros estudos, a adição de selênio ao meio de cultivo não altera o rendimento de biomassa. Freitas (2002), ao avaliar o efeito da adição de selenito de sódio (0, 40 e 80 mg L^{-1}) na produção de biomassa, no cultivo da *Saccharomyces cerevisiae* (linhagem produtoras de H_2S), verificou que não houve alteração da concentração de biomassa. Também em Oraby et al. (2015) o cultivo de células de *Saccharomyces cerevisiae* em melaço com diferentes concentrações de selênio não diferiram no rendimento de biomassa, quando comparadas as leveduras cultivada em meio livre de selênio.

Já no estudo do Kaur (2006), a inoculação da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio YEPD com várias concentrações do selenito de sódio (19, 39, 57 μM), teve uma diminuição significativa ($p < 0,001$) no crescimento da célula de levedura em termos de biomassa, a medida que a dose de selenito de sódio era aumentada.

Figura 12- Comparação da biomassa inicial e final de todos os tratamentos (T1, T2 e T3) do ensaio fermentativo.

3.4.4 Desprendimento de CO₂

O desprendimento de CO₂ ocorre no decorrer da fermentação, e apresenta uma relação direta com a produção de etanol, sendo que quando cessa a formação de CO₂ também ocorre o término da produção de etanol, através da fermentação alcoólica. A Tabela 8, mostra as quantidades totais de CO₂ desprendido nas fermentações submetidas aos três tratamentos. Os resultados demonstraram que as quantidades de CO₂ desprendidas durante as fermentações foram semelhantes entre si. Sendo observado os seguintes resultados: $10,10 \pm 0,57$; $10,21 \pm 0,21$ e $10,28 \pm 1,07$ g/reator, nos tratamentos T1, T2 e T3, respectivamente.

Tabela 8 – Análise do desprendimento total de CO₂ após ensaio fermentativo.

Tratamento	Desprendimento de CO ₂ (g)
T1	10,10 (±0,57) A
T2	10,21 (±0,21) A
T3	10,28 (±1,07) A
C.V. (%)	7,03

T: tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre se submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios de cada tratamento.

A Figura 13 demonstra que a velocidade de desprendimento do CO₂ foi mais rápida nas fermentações submetidas ao tratamento T1 do que naquelas submetidas aos tratamentos T2 e T3. Nas fermentações realizadas sob as condições do tratamento T1, onde não houve enriquecimento com selenito de sódio, a fermentação foi concluída em 10 horas após início do processo. Por outro lado, as fermentações submetidas aos tratamentos T2 e T3 apresentaram menor velocidade de desprendimento do CO₂ e os tempo para finalizar as fermentação foram de 14 horas para ambos. Isso indica que apesar das leveduras apresentarem habilidade de tolerar às altas concentrações de selenito de sódio no mosto e continuarem produzindo biomassa e etanol, o tempo para a formação de biomassa e de produto é maior do que naquelas leveduras que não são submetidas ao substrato enriquecido em selenito de sódio.

Figura 13 – Velocidade de desprendimento do CO₂ durante as fermentações submetidas aos tratamentos T1, T2 e T3.

3.4.5 Concentração de células de leveduras

A análise e estatística da concentração de células a cada 2 horas, durante todo o processo fermentativo, pode ser observada na Tabela 9.

Tabela 9 – Análise da concentração de células a cada 2 horas durante todo o processo fermentativo.

Tratamentos	Concentração de 10^8 células.mL ⁻¹							
	0h - Media	2h	4h	6h	8h	10h	12h	14h
T1	0,58 ($\pm 0,15$) AB	1,32 ($\pm 0,04$) C	1,84 ($\pm 0,15$) B	2,04 ($\pm 0,23$) B	1,90 ($\pm 0,10$) A	1,98 ($\pm 0,08$) A	-	-
T2	0,38 ($\pm 0,13$) A	0,56 ($\pm 0,17$) A	1,24 ($\pm 0,17$) A	1,18 ($\pm 0,24$) A	2,10 ($\pm 0,00$) A	1,96 ($\pm 0,87$) A	1,54 ($\pm 0,27$) A	1,26 ($\pm 0,11$) A
T3	0,66 ($\pm 0,15$) B	0,90 ($\pm 0,12$) B	1,06 ($\pm 0,05$) A	1,38 ($\pm 0,36$) A	2,14 ($\pm 0,24$) A	1,78 ($\pm 0,04$) A	1,44 ($\pm 0,05$) A	1,24 ($\pm 0,11$) A
C.V. (%)	26,62	13,22	9,72	18,52	7,36	26,61	16,02	11,17

T: Tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre se submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios de cada tratamento.

É possível verificar na Tabela 9 os resultados da população de células de leveduras durante o processo fermentativo, onde as amostras de leveduras submetidas ao tratamento T1 atingiram a população máxima de células de $2,04 \cdot 10^8$ células mL⁻¹ após 6 horas do início da fermentação. Por outro lado, as leveduras submetidas aos tratamentos T2 e T3 atingiram a máxima concentração de células $2,10 \cdot 10^8$ células mL⁻¹ e $2,14 \cdot 10^8$ células mL⁻¹, respectivamente, após as 8 horas do início da fermentação.

Ainda em análise à Tabela 9, pode ser verificado que ao final da fermentação, o tratamento sem enriquecimento de Se (T1) obteve maior número de células de leveduras por unidade de volume de vinho ($2,04 \cdot 10^8$ células mL⁻¹) ao final da fermentação, do que as leveduras submetidas aos tratamentos T2 com $1,26 \cdot 10^8$ células mL⁻¹ e T3 com $1,24 \cdot 10^8$ células mL⁻¹, o que não tem relação com o rendimento fermentativo, já que os tratamentos T2 e T3 obtiveram as maiores viabilidades (Figura 11). Em seguida, a Figura 14 mostra o comportamento das populações de leveduras submetidas aos tratamentos e que os tratamentos T2 e T3

obtiveram as maiores concentrações de células. Alguns trabalhos na literatura também relatam semelhantes resultados quando utilizam o selenio, seja para suplementar o meio de leveduras ou suplementar dieta de animais.

Figura 14 - Comportamento das populações de leveduras submetidas aos tratamentos T1, T2 e T3, durante as fermentações.

Apesar de existir vários trabalhos de pesquisa sobre as aplicações de leveduras enriquecidas com Se, poucas tentativas foram feitas para determinar a concentração de selênio inorgânico que pode promover o crescimento do fermento.

3.4.6 Teor alcoólico, produtividade e rendimento

Na Tabela 10, pode-se verificar que o teor alcoólico e o rendimento mostraram-se semelhantes entre os tratamentos. Por outro lado, as produtividades médias foram: T1 (7,03 g L⁻¹ h⁻¹), T2 (5,05 g L⁻¹ h⁻¹) e T3 (5,31 g L⁻¹ h⁻¹). Estes resultados demonstram que a produtividade do Tratamento T1 foi maior do que nos tratamentos T2 e T3. Contudo, os resultados observados nas fermentações submetidas aos tratamentos T2 e T3 são semelhantes entre si.

O ART do fim da fermentação foi subtraído do valor inicial para calcular o rendimento fermentativo. Comparando o teor alcoólico e a produção em g.L⁻¹ do T1 tem-se a exatidão dos valores, porem, a diferença desses parâmetros no T2 e T3,

pode ser justificada pelas pequenas variações de açúcares no início da fermentação que se torna irrelevante após o cálculo do rendimento.

No trabalho desenvolvido por Borges (2008), em que ele otimiza a dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada, utilizando a levedura *Sacharomyces cerevisiae* em um fermentador de 5L, ele comenta que o processo de fermentação atingiu rendimentos entre 81 a 84,3%. Em Ferrari (2013) ao avaliar a cinética do processo fermentativo, também de fermentação alcoólica por batelada alimentada utilizando a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ele obteve rendimentos fermentativos variando de 73,2% a 87% e Walter et al. (2015), mencionou que valores industriais de rendimento alcoólico para fermentações de 16-17% de ART, pode chegar a 91% de rendimento, logo, todos os tratamentos realizados neste trabalho (com ou sem adição do selenito de sódio) obtiveram valores superiores ao que a literatura relata.

Tabela 10 – Resultados de teor alcoólico, rendimento e produtividade das fermentações submetidas

Tratamento	Teor alcoólico (v v ⁻¹)	ART (g L ⁻¹)	Rendimento nominal (g L ⁻¹)	Rendimento real (g L ⁻¹)	Rendimento fermentativo (%)	Produtividade g L ⁻¹ h ⁻¹
T1	7,03 (±0,16) A	144,78	74,00	70,30	95%	7,03
T2	6,96 (±0,09) A	138,35	70,71	69,60	98%	5,05
T3	6,99 (±0,37) A	145,56	74,40	69,90	94%	5,31
C. V. (%)	3,42					

T: tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre se submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios de cada tratamento.

O teor de etanol está relacionado com o teor de açúcares presentes no mosto e com a capacidade fermentativa das leveduras em converter esse açúcar em etanol. A Figura 15 revela que o teor alcoólico inicial foi inexistente e que ao término da fermentação os resultados foram semelhantes com variação máxima entre um tratamento e outro de 0,25%, ou seja, a adição de selenito de sódio ao mosto nos tratamentos T2 e T3 não obtiveram diferença significativa do T1 (grupo controle).

Alguns trabalhos encontrados na literatura obtiveram resultados diferentes, no estudo desenvolvido por Assunção (2011), o enriquecimento com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ selenito de sódio no meio de desenvolvimento das espécies *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii* para a realização da fermentação, obteve-se diferença entre os tratamentos, onde o vinho obtido pela levedura *S. cerevisiae* foi o que apresentou uma menor concentração de açúcares redutores finais e consequentemente um maior teor alcoólico.

Comparando com outros relatos sobre a utilização da leveduras *S. cerevisiae* e seu rendimento, Moreirá (2013) fez um estudo sobre linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, onde foram isoladas e comparadas com a levedura padrão CAT-1 na produção de etanol e obteve teores semelhantes entre os tratamentos. Por outro lado, Ribeiro (1999), também analisando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* (sendo duas floculantes, das quais uma não produtora de sulfeto de hidrogênio) para a produção de etanol e observou que a levedura floculante (LF) mostrou-se superior às demais, em termos de produtividade de etanol ($3,40 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$).

Figura 15 - Teor alcoólico de todos os tratamentos (T1, T2 e T3) antes e após o processo fermentativo.

3.4.7 Análises de açúcares e glicerol

Na Tabela 11 são demonstrados os resultados dos açúcares: Glicose, frutose, sacarose, açúcares redutores totais (ART) e glicerol no mosto de fermentação,

encontrados nos Tratamento T1, T2 e T3 (T1 – com 0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio adicionado ao mosto; T2 – com 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio adicionado ao mosto e T3 – 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio adicionado ao mosto).

Observa-se que os teores de glicose e frutose iniciais são semelhantes apenas entre os tratamentos T2 e T3. Já a sacarose inicial possui semelhança do T2 com ambos os tratamentos. Para os valores finais de glicose, frutose e sacarose, não foi detectado pelo equipamento, com isso pode-se dizer que os microrganismos presentes em todos os tratamentos foram capazes de consumir todo o açúcar presente no mosto, garantindo a realização da fermentação. Os teores de ART assim como o glicerol mostraram-se semelhante entre todos os tratamentos. Para o calculo do ART no mosto leva-se em conta a soma dos açúcares na forma de açúcares redutores em que a sacarose é desdobrada em açúcar invertido. Considerando a estequiometria da inversão da sacarose em glicose e frutose, para cada 100 g de sacarose produz-se 105 g de açúcares redutores. Dessa forma, o ART entre os mostos dos tratamentos não diferiram estatisticamente.

Tabela 11 – Teores de glicose, frutose, sacarose, glicerol e ART no início e no final dos processos fermentativos.

Tratamento	Açúcares redutores totais e glicerol (g.L^{-1})								
	Glicerol inicial	Glicerol final	Glicose inicial	Glicose final	Frutose inicial	Frutose final	Sacarose inicial	Sacarose final	ART estimado
T1	0,23 ($\pm 0,02$) A	5,66 ($\pm 1,50$) A	29,54 ($\pm 2,32$) B	N. D.	30,53 ($\pm 4,11$) B	N. D.	80,67 ($\pm 1,74$) A	N. D.	144,78 ($\pm 5,18$) A
T2	0,27 ($\pm 0,00$) A	3,66 ($\pm 0,90$) A	21,11 ($\pm 2,02$) A	N. D.	21,42 ($\pm 1,36$) A	N. D.	91,26 ($\pm 4,58$) AB	N.D.	138,35 ($\pm 1,42$) A
T3	0,22 ($\pm 0,01$) A	3,79 ($\pm 1,46$) A	23,15 ($\pm 2,01$) A	N. D.	22,66 ($\pm 2,22$) A	N. D.	95,00 ($\pm 6,91$) B	N.D.	145,56 ($\pm 11,39$) A
C.V. (%)	19,36	30,10	8,63	-	11,29	-	5,50	-	5,09

T: tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre se submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%. Entre parênteses encontram-se os desvios de cada tratamento.

Na Figura 16 nota-se que houve um aumento na formação de glicerol nas fermentações submetidas para todos os tratamentos, apresentando semelhança entre eles, porem, com porcentagem de menos de 1% m v^{-1} de glicerol ao final da

fermentação de cada tratamentos, como citado por Ponce et al. (2016) em seu trabalho. Ao se utilizar a *Saccharomyces cerevisiae* para fermentação tem-se como principal produto o etanol, mas nesse processo a produção de outro subprodutos e o mais abundante deles é o CO₂, seguido pelo glicerol, o qual é uma resposta primaria da levedura a osmotolerância, que está relacionado ao aumento da atividade das enzimas glicerol-3-fosfato desidrogenase e glicerol-3-fosfato fosfatase (JONES; GADD, 1990; MELO, 2006). Em alguns trabalhos é encontrado possíveis explicações para o aumento do glicerol, como no trabalho do Cherubin (2003), em que durante a fermentação alcoólica a contaminação na ordem 10⁷UFC mL⁻¹ elevou a formação de glicerol de 10,9% a 14,7%, ou D'Aamore et al. (1988) que descrevem que em fermentação com mais de mais de 20% de açúcares pode influenciar o aumento de produção do glicerol. O que não se aplica a esta trabalho, já que não houve contaminação nem o uso de açúcares acima de 20%.

Figura 16 - Concentração de ART (glicose, frutose e sacarose) e glicerol de todos os tratamentos (T1, T2 e T3) antes e após o processo fermentativo.

3.4.8 Selênio inorgânico

As médias das concentrações de selênio inorgânico tanto da levedura quanto do mosto, além de análise estatística, pode ser encontrada na Tabela 12.

Tabela 12 - Análise de selênio inorgânico no mosto e na levedura, antes e após ensaio fermentativo.

	[] de selênio inorgânico (mg L ⁻¹)			
Tratamento	Mosto inicial - Média	Mosto final	Levedura inicial	Levedura final
T1	0,07 (±0,02) A	0,06 (±0,01) A	0,12 (±0,01) A	0,53 (±0,39) A
T2	85,63 (±1,04) B	63,56 (±6,16) C	804,98 (±1,08) B	1.970,41 (±787,31) B
T3	219,08 (±2,02) C	48,88 (±10,64) B	1.611,12 (±6,96) C	5.562,68 (±666,47) C
C. V. (%)	1,25	18,93	0,50	23,72

T: tratamento;

C.V.: Coeficiente de variação.

Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes, na mesma coluna, diferem estatisticamente entre se submetidas ao Teste de Tukey, ao nível de significância de 5%.

Entre parênteses encontram-se os desvios de cada tratamento.

Nas análises de selênio inorgânico por ICP-OES, nos mostos referentes aos tratamentos T1, T2 e T3 (Figura 17), observa-se uma concentração bem menor de selênio no tratamento T1, o que já era esperado, pois neste tratamento não houve enriquecimento com selênio. Ainda na Figura 17, é observado que em todos os mostos ocorreu uma diminuição da concentração de selênio inorgânico, em torno de 15% em T1, 25% em T2 e 75% em T3, após a fermentação, ou seja, as leveduras provavelmente absorveram ou adsorveram o selênio que se encontrava no mosto. Sendo assim, aumentando as chances de formação do selênio orgânico e geração das selenoproteínas (PÉREZ-CORONA et al., 2011).

Comparando os resultados obtidos nos diferentes tratamentos, observa-se que o T3 foi aquele que apresentou os menores resultados de concentração de selênio inorgânico, tendo uma média inicial de 219,08g chegando à 48,88g no mosto final, ou seja, uma diminuição de 75%. Desta forma, infere-se que, dentro do limite de tolerância das leveduras ao selênio, quanto maior for a concentração de selênio adicionada ao mosto, maiores foram as possibilidades das leveduras absorverem ou adsorverem esse nutriente.

Assunção (2011) comparou em seu trabalho o enriquecimento de duas espécies de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae* e *Torulaspora delbrueckii*) com selenito de sódio, e verificou que a evolução da fermentação parece ter influência na concentração final de selênio no meio, uma vez que o mosto com a levedura

Saccharomyces cerevisiae em que houve uma fermentação mais rápida foi o que apresentou uma maior concentração de selênio inorgânico. Por outro lado, Hart (2011), trabalhando com o comportamento de selênio no trigo, realizou aplicações de fertilizantes de selênio em uma colheita de trigo de alto rendimento no Reino Unido e analisou o selênio total através da espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS). A relação entre a quantidade de selênio aplicada na colheita e a quantidade de selênio existente na farinha e no pão era aproximadamente linear, indicando perda mínima de selênio durante o processamento de grãos e produção de pão. Em média, aplicação de selênio a 10 kg ha⁻¹ aumentou o selênio total no pão branco e integral em 155 e 185 ng g⁻¹, respectivamente, equivalente a 6,4 e 7,1g de selênio por fatia média de pão branco e integral, respectivamente.

Comparando com outros trabalhos, pode ser encontrado que o selênio, foi capaz de aumentar a concentração de outros compostos, não só aqueles em que ele faz parte da composição. Segundo Saffaryazdi (2012), as doses de selenito adicionadas ao solo, aumentaram os teores de Ca nos rebentos de plantas de espinafre, em torno de 75% em comparação ao tratamento sem selênio. Já Boldrin (2013) relatou a aplicação no solo de 0,75 mg Kg⁻¹ de selênio ao arroz como selenato e selenito de sódio, que resultou no aumento acentuado nos teores de magnésio, em comparação com o tratamento de 0 mg Kg⁻¹ de selênio.

Outros autores, já vem utilizando a levedura enriquecida com selênio como forma de suplemento na dieta de rotíferos e obtendo resultados positivos no aumento da concentração de selênio nos rotíferos, chegando a 138 mg de selênio por kg (peso seco) (PENGLASE, 2011).

Figura 17 - Concentração de selênio inorgânico no mosto antes e após o processo fermentativo.

Na Figura 18, o tratamento T1 se destacou pela baixa concentração de selênio inorgânico nas leveduras, tanto no início da fermentação ($0,12 \text{ mg L}^{-1}$) quanto ao término da fermentação ($0,53 \text{ mg L}^{-1}$). O tratamento T3 foi o que apresentou concentrações mais altas de selênio inorgânico, cerca de 180% maior do que o tratamento T2, ou seja, diante das duas Figuras (17 e 18), quanto mais selenito de sódio adicionado ao mosto, maiores são as chances das leveduras absorverem ou adsorverem esse nutriente. Por consequência, infere-se que maiores podem ter sido as oportunidades para a geração de metabolitos como as selenoproteínas.

De forma semelhante aos resultados dessa pesquisa, Kaur (2006) mencionou que após a suplementação de selênio como selenito de sódio em várias concentrações no meio de crescimento, foi observado o aumento contínuo na atividade da glutathione peroxidase e no conteúdo de selênio. Em pesquisa realizada por Pérez-Corona et al. (2011), utilizando a fermentação de vinho na presença de concentrações crescentes de selênio inorgânico (quantidades variando de 50 a 1000 μg de sal de selenito de sódio) para analisar a absorção do selênio inorgânico com formação de selenoproteína e se a adição do mesmo mantinha as mesmas as propriedades de produção do vinho. Teve como resultado que a fermentação alcoólica para produção de vinho branco é compatível com a presença de selênio

inorgânico em concentrações de até 500 μg em 50 mL e o vinho selenizado pode ser considerado uma fonte adequada de selenometionina.

Ainda confrontando com outros trabalhos descritos na literatura, em Gharipour et al. (2017), o selênio foi mais biodisponível quando fornecido como levedura do que como suplemento purificado de selenometionina, isso porque a levedura é rica em vitaminas do complexo B e em minerais que funcionam como cofatores de antioxidantes endógenos em plantas e animais, como: ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn) e manganês (Mn).

Figura 18 - Concentração de selênio inorgânico nas leveduras antes e após o processo fermentativo.

3.5 Conclusão

Em leveduras enriquecidas com 60 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de selenito de sódio, ocorreu efeito positivo sobre o aumento da viabilidade das leveduras. De modo que ao final da fermentação, a viabilidade foi de 84%.

Em relação a concentração de biomassa, foi observado a produção semelhante de 5,38 e 5,28 g L^{-1} , nas leveduras submetidas ao T2 e T3, respectivamente.

No que concerne ao rendimento fermentativo, as fermentações submetidas aos mostos enriquecidos com o selênio promove o aumento do rendimento fermentativo. Por outro lado, a produtividade das fermentações por leveduras que

não enriquecidas apresentam melhor resposta do que aquelas submetidas aos mostos enriquecidos com selenito sódio.

Conclui-se que as leveduras com enriquecimento de selenito de sódio mantêm o rendimento fermentativo e aumentam o acúmulo de selênio inorgânico na célula, porém as leveduras sem enriquecimento tiveram uma melhor produtividade na fermentação.

Referências

ASSUNÇÃO, M. A. da S. **Avaliação da tolerância ao selênio de diferentes espécies de leveduras em ensaios de fermentação**. Tese de Doutorado. ISA/UTL. 2011.

BOLDRIN, P. F., FAQUIN, V., RAMOS, S. J., BOLDRIN, K. V., ÁVILA, F. W., GUILHERME, L. R. G., Soil and foliar application of selenium in rice biofortification. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 31, n. 2, p. 238-244, 2013.

BORGES, P. C. S. **Otimização dinâmica da fermentação alcoólica no processo em batelada alimentada**. (2008). Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia/MG, 2008.

CATARINO, S.; TRANCOSO, I. M.; BRUNO DE SOUZA, R.; CURVELO-GARCIA, A. S. Grape must mineralization by high pressure microwave digestion for trace element analysis: development of a procedure. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, p. 87-93, 2010.

CHEN, F., ZHU, L., QIU, H. Selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae* improves growth, antioxidant status and selenoprotein gene expression in Arbor Acres broilers. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, v. 101, n. 2, p. 259-266, 2017.

CHERUBIN, R. A. **Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica**. 124 p. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2003.

CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of Recycled Laboratory Backset on Fermentation of Wheat Mash. 1993. **Journal Agriculture Food and Chemistry**, v. 41, n. 7, p. 1158-1163, 1993.

D'AMORE, T.; PANCHAL, C. J.; RUSSEIL, I.; STEWART, G. G. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 2, n. 6, p. 365-372, jan. 1988.

EITH, C.; KOLB, M.; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. Práticas em cromatografia de íons: uma introdução. 142 p. Metrohm, 2006.

EL-BAYOUMY, K., DAS, A., RUSSELL, S., WOLFE, S., JORDAN, R., RENGANATHAN, K., SOMIARI, R. The effect of selenium enrichment on baker's yeast proteome. **Journal of proteomics**, 75.3: 1018-1030. 2012.

FERRARI, F. C. S. **Fatores operacionais e cinética do processo fermentativo para otimização da produção de etanol em escala industrial**. 57 p. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2013.

FERREIRA, K. S., GOMES, J. C., BELLATO, C. R., JORDÃO, C. P. Concentrações de selênio em alimentos consumidos no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 11, p. 172-177, 2002.

FREITAS, F. P. P. Efeito do selenito no cultivo descontínuo de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, produtoras e não produtoras de H₂S. Diss. Universidade de São Paulo, 2002.

GHARIPOUR, M., SADEGHI, M., BEHMANESH, M., SALEHI, M., NEZAFATI, P., GHARPOUR, A., Selenium homeostasis and clustering of cardiovascular risk factors: a systematic review. **Acta Bio Medica Atenei Parmensis**, v. 88, n. 3, p. 263-270, 2017.

HART, D. J. FAIRWEATHER-TAIT, S. J. BROADLEY, M. R. DICKINSON, S. J., FOOT, I., KNOTT, P., STROUD, J. L., Selenium concentration and speciation in biofortified flour and bread: Retention of selenium during grain biofortification, processing and production of Se-enriched food. **Food Chemistry**, 126.4: 1771-1778. 2011.

HERZBERG, P. A. **How SAS works: a comprehensive introduction to the SAS system**. Springer-Verlag, 1990.

JONES, R. P.; GADD, G. M. Ionic nutrition of yeast--physiological mechanisms involved and implications for biotechnology. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 12, p. 402-418, 1990.

KAUR, T.; BANSAL, M. P. Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. **Nutricion hospitalaria**, v. 21, n. 6, p. 704-708, 2006.

KITAJIMA, E. W.; LEITE, B. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**, 2a. Ed. Piracicaba. NAP/MEPA ESALQ. 48 p. 1999.

KOSHIMIZU, L. H. Avaliação da Concentração de Leveduras Suspensas em um Meio Aquoso pela Medida do Volume Ocupado pelas Células. **Saccharum**. São Paulo: v, 4 (18). p.14 – 16. 1982.

MELO, H. F. **Resposta ao estresse ácido em leveduras da fermentação alcoólica industrial**. (2006). 110 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, 2006.

MOREIRÁ, B. L. D., PARAZZI, C., PAPIN, L. F., Estudo de linhagens de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* oriundas da biodiversidade ambiental na fermentação alcoólica. **Bioscience Journal**, v. 29, n. 5, 2013.

NOBRE, T. P. **Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica**. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

NÓBREGA, P. T. **Selênio e a importância para o organismo humano: benefícios e controvérsias**. 2015. Tese de Doutorado.

ORABY, M. M.; ALLABABIDY, T.; RAMADAN, E. M. The bioavailability of selenium in *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Agricultural Sciences**, v. 60, n. 2, p. 307-315, 2015.

PANKIEWICZ, U., JAMROZ, J. The effect of pulse electric field on accumulation of selenium in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 17, n. 7, p. 1139-1146, 2007.

PENGLASE, S., HAMRE, K., SWEETMAN, J. W., NORDGREEN, A. A new method to increase and maintain the concentration of selenium in rotifers (*Brachionus* spp.). **Aquaculture**, 315(1-2), p. 144-153. 2011.

PÉREZ-CORONA, M. T., SÁNCHEZ-MARTINEZ, M., VALDERRAMA, M. J., RODRIGUEZ, M. E., CÁMARA, C., MADRID, Y. Selenium biotransformation by *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* during white wine manufacture: laboratory-scale experiments. **Food chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1050-1055, 2011.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2014, 2014.

PIERCE, J. S. Institute of brewing: analysis committee measurement of yeast viability. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 76, p. 442-443, 1970.

PONCE DE LEÓN, C. A., BAYÓN, M. M., PAQUIN, C., CARUSO, J. A. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. **Journal of applied microbiology**, 92.4: 602-610. 2002.

PUCCINELLI, M.; MALORGIO, F.; PEZZAROSSA, B. Selenium enrichment of horticultural crops. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 933, 2017.

RAMOUTAR, R. R.; BRUMAGHIM, J. L. Antioxidant and anticancer properties and mechanisms of inorganic selenium, oxo-sulfur, and oxo-selenium compounds. **Cell biochemistry and biophysics**, 58.1: 1-23. 2010.

RIBEIRO, C. A. F.; BLUMER, S. A. G.; HORII, J. **Apostila Fundamentos de Tecnologia Sucroalcooleira**. 1999. Disponível em:

<https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4053798/mod_resource/content/1/

SAFFARYAZDI, A.; LAHOUTI, M., GANJEALI, A., BAYAT, T., Impact of selenium supplementation on growth and selenium accumulation on spinach (*Spinacia oleracea* L.) plants. **Notulae Scientia Biologicae**, v. 4, n. 4, p. 95-100, 2012.

SCHACTER, L. P. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide by erythrocytes from individuals with sickle trait or normal haemoglobin. **European journal of clinical investigation**, 16.3: 204-210. 1986.

SHI, L., XUN, W., YUE, W., ZHANG, C., REN, Y., SHI, L., LEI, F. Effect of sodium selenite, Se-yeast and nano-elemental selenium on growth performance, Se concentration and antioxidant status in growing male goats. **Small Ruminant Research**, 96.1: 49-52. 2011.

SILVA, E. L.; DOS SANTOS ROLDAN, P.; GINÉ, M. F. Simultaneous preconcentration of copper, zinc, cadmium, and nickel in water samples by cloud point extraction using 4-(2-pyridylazo)-resorcinol and their determination by inductively coupled plasma optic emission spectrometry. **Journal of Hazardous Materials**, v. 171, n. 1-3, p. 1133-1138, 2009.

WALTER, A.; GALDOS, M. V.; SCARPARE, F. V.; VERDE LEAL, M. R. L.; SEABRA, J. E. A.; CUNHA, M. P. DA; PICOLI, M. C. A.; OLIVEIRÁ, C. O. F. de. Brazilian Sugarcane Ethanol: Developments so far and Challenges for the Future, **Advances in Bioenergy**. Oxford, UK: John Wiley & Sons, Ltd, p. 373-394. 2015.

WANG, Z.; ZHANG, L.; TAN, T. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS2 for selenium-enriched yeast production. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 27, n. 6, p. 1836-1840, 2010

ZAGO, E. A.; SILVA, L. F. L. F.; BERNADINO, C. D.; AMORIM, H.V. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool e açúcar**. 2ed. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ/USP, 194p. 1996.

ZHOU, N., LI, D., WU, S., HE, S., CHEN, Y., BAI, Y., WANG, C. Acceleration effect of sodium selenite on yeast growth and fermentative capability. **The Journal of general and applied microbiology**, 61(1), 27-30. 2015.