

PHILLIPPI ANDRÉ ZEPEDA SEREÑO

**ENRIQUECIMENTO, DISTRIBUIÇÃO E ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO EM
COGUMELOS DE *Pleurotus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de Magister Scientiae.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2016**

T

Zepeda Sereño, Phillippi, 1988-
Z57e Enriquecimento, distribuição e especiação de selênio em cogumelos
2016 de Pleurotus spp. / Phillippi Zepeda Sereño. - Viçosa, MG, 2016.
x, 43f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Maria Catarina Megumi Kasuya.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Pleurotus. 2. Cogumelos. 3. Selênio. 4. Micronutrientes. 5. Proteínas . I.
Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-
graduação em Microbiologia Agrícola. II. Título.


CDD 22. ed. 635.8

PHILLIPPI ANDRÉ ZEPEDA SEREÑO

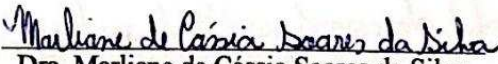
**ENRIQUECIMENTO, DISTRIBUIÇÃO E ESPECIAÇÃO DE SELÊNIO EM
COGUMELOS *Pleurotus* spp.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 29 de fevereiro de 2016.



Prof. Leonardus Vergutz
(Coorientador)



Dra. Marliane de Cássia Soares da Silva
(Coorientadora)



Profa. Monique Renon Eller



Profa. Maria Catarina Megumi Kasuya
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Microbiologia pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

À Organização dos Estados Americanos (OEA) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da Bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à CAPES pelo apoio financeiro.

À professora Maria Catarina Megumi Kasuya, por todos os ensinamentos, boa disposição, compreensão e alegria, que foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Marliane de Cassia de Souza da Silva pela sua grande ajuda, pelos ensinamentos, bons momentos vividos e carinho.

Ao professor Leonardus Vergutz, pela coorientação e sugestões feitas durante a pesquisa.

Aos pesquisadores do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (LNLS/CNPEM), em especial ao Dr. Carlos Alberto Perez e Dr. Dalton Belchior Abdala, por toda assistência e colaboração durante a realização das análises no μ -XRF e XANES.

Ao Mateus Nunes, pela valiosa contribuição neste trabalho e pela companhia em dias de Síncrotron. Ao Dr. Luiz Francisco da Silva Souza Filho, pelo auxílio nas análises dos espectros de XANESⁱ

Aos professores do Departamento de Microbiologia, pela contribuição na minha formação acadêmica.

Aos amigos do Laboratório de Associações Micorrízicas, em especial ao grupo dos Cogumelos e à Lidiane, pelas conversas, pelos cafés e pela boa convivência.

A todos os funcionários, pelo apoio e boa disposição.

Aos amigos e companheiros de mestrado Andrés, Thamar, Alan e Lucas pelos bons/sofridos momentos de estudo e diversão passados juntos. Em especial a minhas

queridas amigas Aneli, Samantha e Thyara pelo carinho, pelas conversas e amizade, que estaram sempre presente comigo.

Aos meus amigos, Gabriel, Gabi, Duda, Laís, Lira, Isis e Otto, pela amizade, conversas, pela divisão de casa e pelos bons momentos vividos.

À minha mãe e irmãs, pelo apoio e amor incondicional que nos une.

Às minhas amadas amigas, Natalia, Pai e Josefa que, apesar da distância, estão sempre comigo.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para realização deste trabalho, muito obrigado!

BIOGRAFIA

PHILLIPPI ANDRÉ ZEPEDA SEREÑO, filho de Carmen Gloria Sereño Padilla e Jaime Iván Zepeda Coletti, nasceu no dia 8 de julho de 1988, em São Paulo, SP.

Em 2009, ingressou na Universidad de Chile, em Santiago, Chile, graduando-se em 2013, em Licenciatura en Ciencias con mención en Biología.

Em 2014, ingressou como discente de mestrado no Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola, na Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se a defesa de dissertação em 29 de fevereiro de 2016.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Cogumelos e enriquecimento	1
2. Importância do selênio	2
3. Síncrotron: distribuição e especiação do selênio	6
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9

CAPITULO I

Produção de cogumelos do gênero *Pleurotus* enriquecidos com selênio

RESUMO	17
ABSTRACT	18
1. INTRODUÇÃO	19
2. MATERIAL E MÉTODOS	20
2.1 Microrganismos e condições de cultivo	20
2.2 Enriquecimento dos cogumelos com selênio	20
2.3 Quantificação do teor de selênio nos cogumelos	21
2.3.1 Preparo da amostra para determinação de selênio.....	21
2.3.2 Determinação de selênio.....	21
2.4 Análise estatística	22
3. RESULTADOS	22
4. DISCUSSÃO	22
5. CONCLUSÕES	27
6. REFERÊNCIAS	28

CAPITULO II

Distribuição e especiação de selênio em cogumelos de *Pleurotus spp.*

RESUMO	31
ABSTRACT	31
1. INTRODUÇÃO	32
2. MATERIAL E MÉTODOS	34
2.1 Cultivo e enriquecimento de cogumelos com selênio	34
2.2 Quantificação do teor de selênio nos cogumelos	34
2.2.1 Preparo da amostra para determinação de selênio	34
2.2.2 Determinação de selênio	35
2.3 Distribuição e especiação do selênio: μ -XRF e XANES	35
2.3.1 Preparação de amostras	35
2.3.2 Análises de μ -XRF e XANES	36
3. RESULTADOS	36
4. DISCUSSÃO	39
5. CONCLUSÕES	40
6. REFERÊNCIAS	41
CONCLUSÃO GERAL	43

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- 1 - Exemplo do espectro obtido por meio da técnica de XAS.7

CAPÍTULO I

- 1 - Cogumelos de *P. ostreatus*, *P. cornucopiae* e *P. djamor* enriquecidos com Se nas concentrações: 0,0; 12,5 e 25 (mg kg^{-1}). 23
- 2 - Eficiência biológica (EB) da produção de cogumelos de *P. ostreatus*, *P. djamor* e *P. cornucopiae* cultivados em bagaço de cana e enriquecidos com diferentes doses de Se. Barras seguidas pela mesma letra, dentro de uma mesma espécie de cogumelo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). 24

CAPÍTULO II

- 1 - Cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus djamor* enriquecidos com selênio, intactos e suas partes (píleo e lâmina), observados sob microscópio estereoscópico (A, C, E, G) e seus respectivos mapas μ -XRF de Se (B, D, F, H), mostrando, em vermelho, a presença de selênio. *Pleurotus ostreatus* e suas partes (A-D) e *Pleurotus djamor* e suas partes (E-H). p: píleo, l: lâmina, e: estipe. 37
- 2 - Espectros obtidos por meio da técnica de XANES para os compostos de Se usados como padrões de referência. 38
- 3 - Espectros de XANES para cogumelos de *Pleurotus* enriquecidos em diferentes doses de Se e alguns padrões de referência. De cima pra baixo: selenocisteína, Se-metil selenocisteína, 2 espectros pertencentes a *P. djamor*, 2 espectros pertencentes a *P. ostreatus*. 38

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- 1 - Programa de aquecimento utilizado no GF-AAS para quantificação de selênio..... **22**
- 2 - Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca) e tempo e incubação (dias) dos cogumelos de *Pleurotus* spp. cultivados em substrato bagaço-de-cana de açúcar adicionados com diferentes doses de Se (média = SD), e resultados da ANOVA de duas vias avaliando a concentração de enriquecimento e os fungos utilizados, MS = quadrado da média; F = F estatístico; P = nível de significância. **24**
- 3 - Selênio adicionado ao substrato, quantidade total absorvida pelo cogumelo e a porcentagem do Se absorvida pelas espécies de *Pleurotus* spp. **25**

RESUMO

SERENO, Phillippi Zepeda, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2016. **Enriquecimento, distribuição e especiação de selênio em cogumelos de *Pleurotus* spp.** Orientadora: Maria Catarina Megumi Kasuya. Coorientadores: Marliane de Cássia Soares Da Silva e Leonardus Vergutz.

O selênio (Se) é um micronutriente essencial que é requerido para a atividade biológica de diversas proteínas, as quais são conhecidas como selenoproteínas. Elas encontram-se envolvidas em diversas funções como a redução de peróxidos, a regulação da atividade dos hormônios tireoidianos, participação na atividade antioxidante, dentre outras. Cogumelos comestíveis, além de apresentarem um alto valor nutricional, possuem grande capacidade de absorver e acumular minerais presentes no substrato onde crescem. Ganha destaque o gênero *Pleurotus*, que pode ser cultivado com facilidade em diferentes substratos lignocelulolíticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a absorção de Se por fungos do gênero *Pleurotus* e também conhecer em que partes do cogumelo e em que formas ele se encontra. Foram enriquecidas com Se três espécies de fungos: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cornucopiae* e *Pleurotus djamor*. As três espécies avaliadas mostraram ser eficientes na absorção desse elemento, sendo capazes de acumular entre 69,91 e 142,90 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se na massa seca. *Pleurotus djamor*, quando cultivado em substrato enriquecido com 25 mg kg^{-1} de Se é o cogumelo que apresentou maior concentração deste micronutriente (142,9 $\mu\text{g g}^{-1}$) e maior eficiência de absorção (7,31%), sendo a espécie mais indicada para produção de cogumelos enriquecido com Se. A distribuição e especiação de Se em cogumelos de *Pleurotus* enriquecidos com este micronutriente foram avaliadas utilizando as técnicas de $\mu\text{-XRF}$ e XANES, as quais permitiram observar que houve um maior acúmulo de Se nas lâminas que em outras estruturas do cogumelo e que o Se se encontra principalmente em formas provavelmente orgânicas. Conclui-se que as três espécies são eficientes em acumular Se e que a técnica de $\mu\text{-XRF}$ mostrou-se eficiente e prática na detecção de Se nas diferentes partes do cogumelo. Entretanto, a especiação de Se pela técnica de XANES deve ser aprimorada para permitir a diferenciação das formas de Se incorporadas no cogumelo.

ABSTRACT

SEREÑO, Phillippi Zepeda, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, February 2016.
Enrichment, distribution and speciation of selenium in *Pleurotus* spp. mushrooms.
Adviser: Maria Catarina Megumi Kasuya. Co-advisers: Marliane de Cássia Soares Da Silva and Leonardus Vergutz.

Selenium (Se) is an essential nutrient for biological activity of several proteins, they are known as selenoproteins. They are involved in various functions such as the reduction of peroxides, regulating the activity of the thyroid hormone, participation in the regeneration of antioxidant activity, among others. The goal of improving the consumption of selenium in the population is that mushroom have been fortified with Selenium. Edible mushrooms have a high nutritional value and great ability to absorb and accumulate minerals present in the substrate where they grow, especially the *Pleurotus* genus, which is cultivated easily in different lignocellulolytic substrates. The goal of this work was to evaluate the ability of the fungi of *Pleurotus* genus to absorb selenium, and know in which part of the mushroom, and in the forms of Se is present in it. Three species of fungi were enriched: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cornucopiae* and *Pleurotus djamor*. All the three species proved to be efficient in absorb this element, being able to accumulate between 69.91 and 142.90 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se dw. The distribution and speciation of selenium in *Pleurotus* Se-enriched mushrooms, using the techniques of μ -XRF and XANES, allowed to observe that there was a greater accumulation of selenium in the gills than in other part of mushroom, and this selenium is probably in organic forms. We conclude that the three species are efficient in accumulating selenium and the μ -XRF technique proved to be efficient and practical for the detection of selenium in different parts of the mushroom. However, the speciation of selenium by the XANES technique should be improved to allow the differentiation of different forms of selenium.

INTRODUÇÃO GERAL

1. Cogumelos e enriquecimento

Cogumelos comestíveis são fonte de alimentos recomendável para uma dieta saudável por serem baixos em calorias e ricos em proteínas, minerais, fibras e vitaminas, especialmente as do complexo B (HELENO et al., 2009; CHEUNG, 2010; BELUHAN & RANOGAJEC, 2011; REIS et al., 2012). Além disso, também apresentam baixos teores de sódio e altos de glutamato (ROUPAS et al., 2014), que faz dos cogumelos candidatos ideais de serem incorporados na dieta.

Dentre os fungos filamentosos produtores de cogumelos comestíveis existem os chamados fungos de podridão branca, como os fungos do gênero *Pleurotus* ou *Lentinula*. Esses fungos possuem uma série de enzimas que lhes permitem degradar resíduos lignocelulolíticos (ELISASHVILI et al., 2008; SÁNCHEZ, 2009). Assim, esses fungos têm sido cultivados em diversos resíduos agroindustriais, como: folha de bananeira, casca de café, serragem de eucalipto, sabugo de milho, sisal, resíduo de soja, palha de trigo e bagaço de cana de açúcar (BONATTI et al., 2004; SÁNCHEZ, 2010; MEMBRILLO, 2011; DA LUZ et al., 2012; SILVA et al., 2012; NUNES et al., 2012; BHATIA et al., 2013). A combinação da utilização desses resíduos com a produção de alimentos altamente nutritivos faz deles uma excelente alternativa de cultivo.

Atualmente são conhecidas mais de quatorze mil espécies de fungos produtores de cogumelos, das quais 200 são experimentalmente cultivadas, 60 comercialmente cultivadas e apenas 10 produzidas em escala industrial (CHANG et al., 2012). Entre as espécies mais produzidas comercialmente estão: *Agaricus bisporus*, *Lentinula edodes* e *Pleurotus ostreatus* (BERNÁŠ et al., 2006). Em especial espécies do gênero *Pleurotus* têm sido cultivadas pela sua facilidade de cultivo e pelo fato de requer pouco tempo de crescimento, quando comparado a outros cogumelos comestíveis. (BONATTI, 2004).

Além do seu alto valor nutricional, os cogumelos comestíveis apresentam propriedades medicinais, sendo relacionados com a prevenção de problemas que afetam a saúde de humanos, como, doenças cardiovasculares (GUILLAMÓN et al., 2010), formação de tumores (WASSER, 2002) ou danos oxidativos (FERREIRA et al., 2009), dentre outros. Em conjunto, as propriedades nutricionais e medicinais dos cogumelos comestíveis possuem efeitos aditivos e sinérgicos que os fazem ser considerados promotores de saúde (BARROS et al., 2008; FERREIRA et al., 2009).

Outra característica interessante dos cogumelos é a capacidade de absorver nutrientes presentes nos substratos nos quais eles se desenvolvem (FALANDISZ, 2013). Essa propriedade é muito maior do que em plantas superiores (TUZEN, 2003), por isto tem sido estudada por diversos autores com o propósito de obter cogumelos enriquecidos com certos minerais essenciais para a saúde humana (ALONSO et al., 2003; SILVA et al., 2012; NUNES et al., 2012).

No processo de fortificação ou enriquecimento de alimentos são adicionados um ou mais nutrientes essenciais, com objetivo de reforçar o conteúdo nutritivo do alimento. Segundo a Food and Drug Administration (FDA) os alimentos considerados enriquecidos com um nutriente devem conter pelo menos 10 % a mais do valor requerido diariamente para esse nutriente se comparado a um alimento do mesmo tipo que não esteja enriquecido (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION).

A demanda dos consumidores por alimentos enriquecidos tem aumentado nos últimos anos devido a que os consumidores acreditam que eles contribuem diretamente para sua saúde, assim como à esperança e qualidade de vida (SIRÓ et al., 2008).

Frente a isso, cogumelos enriquecidos são uma excelente alternativa de consumo para saúde humana (GANECKA et al., 2015). Uma ingestão regular de cogumelos, ou produtos fúngicos poderia nos ajudar a melhorar nossa dieta diária, a ser mais saudáveis e mais felizes (CHANG, 2012).

2. Importância do selênio

O selênio (Se) é um microelemento essencial requerido em níveis traços para a manutenção da saúde humana (PONNAMPALAM et al., 2009; CHEN, 2012). Os efeitos benéficos desse elemento como um micronutriente foram reconhecidos pela primeira vez em 1950 pelo químico Berzelius (SCHARZ e FOLTZ, 1957). Este elemento é essencial para o ser humano, já que é necessário na biossíntese de importantes proteínas. As proteínas contendo Se como parte integral da sua cadeia são definidas como selenoproteínas (PAPP et al., 2007). As selenoproteínas com atividade catalítica são chamadas de selenoenzimas, sendo descoberta a primeira delas em 1971 (ROTRUCK et al., 1972). Existem mais de 30 selenoproteínas identificadas em mamíferos e destas estima-se que mais de 25 estejam presentes em humanos (Castellano

et al., 2005), incluindo Glutathione peroxidase, Iodotironina deiodinase, Tioredoxina redutase, Selenoproteína P e Selenoproteína W. Dentre as funções dessas proteínas estão: redução de proteínas oxidadas, regulação da atividade dos hormônios tireoidianos, participação na atividade antioxidante, armazenamento e transporte de Se, dentre outras (PAPP et al., 2009, RAYMAN et al., 2012).

O Instituto de Medicina (IOM), recomenda a ingestão, para adultos, de 55 µg Se por dia para adultos. De modo geral, a ingestão de Se raramente excede o necessário para a expressão de selenoproteínas. Em contraste, a deficiência na ingestão desse micronutriente, que corresponde à ingestão de menos de 40 µg de Se por dia por pessoa, é mais comum, afetando a milhões de pessoas em diferentes regiões, como na Nova Zelândia, (COMBS, 2001). Sendo assim, o aumento da ingestão desse elemento em populações onde ele é consumido em baixas quantidades poderia ser uma opção para melhorar o nível de Se e poderia resultar no melhoramento da saúde pública. (BHATIA, 2013, WITKOWSKA, 2014).

Diversas doenças têm sido atribuídas a deficiência de Se. No nordeste da China, a deficiência de Se é a causa de uma cardiomiopatia progressiva que ocasiona uma extensiva fibrose e mudanças degenerativas, conhecida com Doença de Keshan (CHEN, 2012; LOSCALZO, 2014). Na Europa, baixas concentrações de Se têm sido relacionadas com aumento na incidência de câncer colorretal (HUGUES et al., 2015). Também foram observados efeitos positivos, relacionados à suplementação com Se, no tratamento de problemas que afetam a saúde humana como na doença de Kashin Beck (YAO, 2011). Outro efeito positivo foi observado na administração de Se em pessoas com Orbitopatia de Graves, a suplementação com Se testada em pacientes mostrou ser eficiente, diminuindo a progressão da doença e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (MARCOCCI et al., 2011).

A suplementação medicamentosa direta com Se feita durante tratamentos clínicos apresentou efeitos adversos. Nesse sentido, a utilização de alimentos enriquecidos pode trazer grandes benefícios para a população, principalmente naquelas que apresentam baixo consumo desse elemento (WITKOWSKA, 2014). As leveduras enriquecidas, por exemplo, estão comercialmente disponíveis como suplementos (MASEKO et al., 2013). Além disso, alimentos enriquecidos com Se são mais efetivos

em aumentar a atividade das enzimas, como a glutathione peroxidase, quando comparados à ingestão de outras formas de Se (BERMIMNGHAM, 2014).

Frente a isso diversos pesquisadores têm trabalhado no enriquecimento de diversas espécies de fungos com diferentes formas químicas de Se. No trabalho de Silva e colaboradores (2012), o fungo *Pleurotus ostreatus* foi enriquecido com selenito de sódio em solução quando cultivado em casca de café. Foi observado que *P. ostreatus* é capaz de acumular até 858 μg de Se g^{-1} de cogumelo seco quando eram adicionados 100 mg kg^{-1} de Se no substrato. Este trabalho mostrou também que os maiores valores da eficiência biológica, que corresponde à quantidade de substrato que é convertido em biomassa, foram obtidos quando *P. ostreatus* foi cultivado em casca de café contendo 12,8 mg kg^{-1} de Se. Outro fato importante nesse trabalho é que a quantidade de Se encontrada nos cogumelos foi proporcional à quantidade de selenito de sódio adicionado ao substrato. Situação semelhante foi observada no trabalho de Zhao e colaboradores (2004) no crescimento de cogumelos enriquecidos da espécie *Ganoderma lucidum*. Bhatia e colaboradores (2013) cultivaram cinco cepas do gênero *Pleurotus* em palha de trigo, obtendo como resultado fungos enriquecidos com Se concentrados até 13 vezes.

Além da concentração em que o Se se encontra em alimentos enriquecidos, outra característica importante a se considerar são as formas químicas do Se, as quais determinam não só a biodisponibilidade, mas também a distribuição, acumulação e a toxicidade deste mineral (FALANDYSZ, 2008). O Se pode ser encontrado em formas inorgânicas como selenito ou selenato, mas também em formas orgânicas como selenometionina ou selenocisteína. Os fungos são capazes de absorver formas de Se inorgânico a partir do substrato e convertê-las em compostos orgânicos (DA SILVA et al., 2010; ASSUNÇÃO et al., 2014), os quais são menos tóxicos e estão mais biodisponíveis para absorção por humanos (RAYMAN et al., 2008; MADSEN et al., 2014).

A importância de conhecer as formas e a biodisponibilidade em que o Se se encontra pode ser ilustrada no caso da província de Hebei na China, onde em áreas com altas concentrações de Se foram observados casos da doença de Keshan que, como mencionado anteriormente, é atribuída a uma carência desse elemento. A causa disto é

devido às formas em que o Se é encontrado nessa área, as quais são pouco biodisponíveis (FORDYCE, 2013).

O Se orgânico foi associado à atividade antioxidante, protegendo componentes celulares como, membranas, lipídeos e lipoproteínas contra o dano oxidativo de espécies reativas de oxigênio, como os radicais livres (MASEKO et al., 2013). Também, experimentos realizados em ratos têm mostrado os efeitos anticancerígenos associados ao Se orgânico (HUDSON et al., 2011).

Os cogumelos enriquecidos com Se como possível fonte deste mineral na dieta requerem um entendimento da biodisponibilidade e especiação do Se acumulado neles a partir de diferentes substratos (BHATIA, 2013). Como os cogumelos enriquecidos com Se produzidos em diferentes substratos mostram diferentes propriedades, é necessário uma caracterização das diferentes formas de Se orgânico para assim entender seus potenciais efeitos na saúde (MASEKO, 2013). Silva e colaboradores (2010) mostraram que o Se incorporado em cogumelos se encontra mais biodisponível que o Se incorporado na dieta na forma inorgânica.

Em cogumelos têm sido identificados vários selenocompostos: selenito, selenato, selenometionina e selenocisteína (FALANDISZ, 2008, SILVA et al., 2010; ASSUNÇÃO et al., 2014). Os resultados obtidos por Muñoz e colaboradores (2006) mostraram que *P. ostreatus* acumula Se principalmente em estruturas que contêm quitina na parede celular. Nos fungos produtores de cogumelos comestíveis *L. edodes* e *G. lucidum* foi demonstrado que o Se é incorporado principalmente na fração proteica do fungo (OGRA et al., 2004; ZHAO et al., 2004). Gergely e colaboradores (2006) encontraram selenometionina, selenocisteína, metilselenocisteína e Se inorgânico em *L. edodes* e *A. bisporus*. Cogumelos do gênero *Agaricus* obtidos comercialmente e enriquecidas com Se, apresentaram quantidades significativas de selenometionina e de espécies desconhecidas de Se (HUERTA et al., 2006). Assunção e colaboradores (2014) observaram um aumento significativo tanto nos teores totais de Se como na fração protéica de cogumelos *P. ostreatus* e *L. edodes* enriquecidos, encontrando cinco formas de Se: selenocisteína, selenometionina, selenometioninacisteína, selênio IV e selênio VI. No caso de *L. edodes* o acúmulo de Se foi principalmente na forma de selênio IV e no caso de *P. ostreatus* a principal forma acumulada foi selenometionina. Estes casos

representam bons exemplos do potencial para obter biomassa proteica com alta concentração de selenometionina em escala industrial.

Frente a isto é que se faz necessário conhecer o potencial de novas espécies de cogumelos de acumular Se e conhecer em que formas este mineral se encontra acumulado.

3. Síncrotron: distribuição e especiação do Se

Nos últimos anos novas técnicas vêm sendo usadas com intuito de conhecer a composição dos elementos que estão presentes em diversos tipos de amostras. Entre elas, temos a luz síncrotron.

A luz síncrotron é gerada por meio de uma radiação electromagnética que é emitida quando elétrons giram a uma velocidade próxima à velocidade da luz e são forçados a mudar de direção por meio de uso de magnetos (LOMBI & SUSINI, 2009). A luz emitida por meio dessa técnica é 11 vezes maior que a emitida por fontes mais tradicionais, como os tubos de raios X (SARRET et al., 2013). Outra vantagem do uso deste tipo de luz é o amplo espectro de luz que é emitido, que abrange desde luz infravermelha até os raios X (LOMBI & SUSINI, 2009). Existem mais de 50 fontes de luz síncrotron no mundo usadas em diversas áreas

Duas técnicas baseadas na luz síncrotron podem ser utilizadas na análise da absorção de Se, elas são: X-ray absorption spectrometry (XAS), para analisar a especiação química dos elementos e X-ray fluorescence (XRF, ou S-XRF por synchrotron XRF), que é utilizada para obter imagens da distribuição de elementos em amostras (ZHAO et al., 2014). XAS baseia-se no aumento da energia do raio incidente é aumentada constantemente mantendo a amostra num mesmo ponto (Figura 1). Coletando os dados da fluorescência é possível obter informações detalhadas de elementos que se encontram numa matriz complexa (SARRET et al., 2013; ZHAO et al., 2014). O espectro obtido como resultado é dividido em duas técnicas: X-ray absorption near-edge structure (XANES) e Extended X-ray absorption fine structure (EXAFS). A parte do espectro que corresponde a XANES vá desde a região de pré borda até 50 eV após a borda (LOMBI & SUSINI, 2009). Por meio dessa técnica é

possível saber os estados de oxidação dos elementos e a eletronegatividade das ligações. A outra parte do espectro é conhecida como EXAFS, da qual é possível obter dados da coordenação química dos elementos, como a sua identidade ou a distância interatômica (ZHAO et al., 2014).

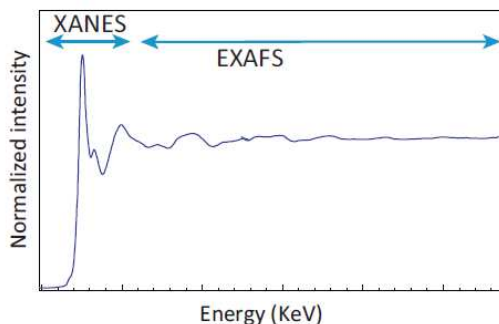


Figura 1: Exemplo do espectro obtido por meio da técnica de XAS (ZHAO et al., 2014).

Outra técnica baseada na luz síncrotron é a técnica de XRF, por meio da qual é possível obter um mapa da distribuição espacial dos elementos presentes numa determinada amostra com uma alta sensibilidade (LOMBI & SUSINI, 2009).

Uma das principais vantagens do uso do síncrotron é que não requer, ou requer pouco tratamento das amostras, como é requerido no caso de outras técnicas como por exemplo no HPLC-ICP-MS (CAREY, 2012; SARRET ET AL., 2013).

Frente a isto é cada vez mais recorrente o uso dessas técnicas para analisar tanto distribuição como a especiação de alguns elementos. Com este intuito, foi utilizada a técnica de XANES com objetivo de investigar a especiação in situ do Se em raízes e folhas hidratadas de trigo (*Triticum aestivum*) e arroz (*Oryza sativa* L.) suprido com Se IV ou Se VI. Como resultado deste enriquecimento, o Se VI foi reduzido quase totalmente a compostos de Se orgânico, isto principalmente nas raízes, e nas folhas o Se VI permanece principalmente não complexado. No caso do Se IV ele foi convertido em grande parte em compostos de Se orgânico, tanto em folhas como nas raízes (WANG et al, 2015). Em outro trabalho, foi investigada a concentração, distribuição e especiação de Se em diferentes partes da planta de trigo (*T. aestivum*) e mostarda indiana (*Brassica juncea*), crescidas em áreas seleníferas em Punjab, Índia. Os resultados deste trabalho mostram altos teores de Se nas plantas estudadas (133 – 931 mg kg⁻¹ na massa seca),

acumulado principalmente na parte superior das plantas, nas formas de selenato e formas orgânicas de Se (EICHE et al., 2015). Wang e colaboradores (2013) utilizaram as técnicas de XANES e μ -XRF para examinar *Vigna unguiculata* quando exposta a níveis tóxicos de Se para a planta (20 μ M), por 24 horas. O Se foi quase totalmente convertido em formas orgânicas, sendo acumulado principalmente na parte apical das raízes. Em alho (*Allium cepa* L.) quando exposto a uma solução de Se IV (126,6 μ M) por 48 horas, foi encontrado usando a técnica de μ -XANES, que todo o selenito foi convertido em formas orgânicas e no caso do selenato só 26% foi convertido (BULSKA et al., 2006). Com o intuito de analisar as formas de Se em arroz enriquecido foram utilizadas duas técnicas: HPLC-ICP-MS e XANES, onde foi possível observar, em ambas as técnicas, que a selenometionina era a principal forma de Se no arroz, mas também houve uma pequena porcentagem de selenometilselenocisteína que foi detectada por meio da técnica de XANES, mas não por meio da outra técnica (LI et al., 2010). Os autores atribuem este fato a que uma fração da amostra não foi isolada durante o processo de extração por HPLC, mostrando a importância de utilização de diferentes técnicas para um processo de especificação mais detalhada.

Em outros organismos, além de plantas, também tem sido utilizada esta técnica. Misra e colaboradores (2012) alimentaram o peixe *Oncorhynchus mycus* com uma dieta rica em selenometionina (40 μ g g^{-1}) e, utilizando a técnica de XANES, observaram que esse mineral é acumulado principalmente na forma de selenometionina e selenocisteína, e estão distribuídas nos tecidos, em diferentes proporções. Órgãos como o fígado e o rim, que estão envolvidos no metabolismo de Se, acumularam alta porcentagem de selenocisteína. Em outro trabalho, desta vez utilizando quironómidos provenientes de um lago que recebe resíduos de minérios, utilizando as técnicas de XRF e XAS foi analisada a bioacumulação de Se nestas espécies. Conseguindo observar as partes do organismo que apresentam maiores teores de Se (de 7 a 80 mg kg^{-1}) e conseguindo também identificar espécies orgânicas, como selenocisteína ou selenometionina (JUSTIN et al., 2012). No caso de fungos, tem sido estudada em leveduras enriquecidas com Se, e em produtos derivados desta, a especificação deste mineral por meio da técnica de XAS com objetivo de introduzir uma forma direta e rápida de saber as selenoespécies que são bioacumuladas. Os resultados deste estudo mostraram que as leveduras enriquecidas acumularam principalmente espécies de Se orgânico (YU-FENG et al., 2010).

Em cogumelos, o uso da luz síncrotron não têm sido referenciada para observar as espécies minerais que se encontram nas diferentes partes do cogumelo. Além disso, por meio de uso de outras técnicas também existem poucos trabalhos onde tenha sido relatada a distribuição de minerais em diferentes estruturas do cogumelo (estipe, píleo, entre outras). Latiff e colaboradores (1996) relataram a distribuição de diversos minerais em diferentes espécies de cogumelos, dando ênfase na diferente distribuição deles no píleo e no estipe. Neste trabalho foi demonstrado que alguns minerais estão distribuídos nas duas estruturas, enquanto outros são encontrados exclusivamente no píleo, como potássio, ferro e cromo, e outros no estipe, como o lantânio. Também foi verificado que a distribuição dos diferentes minerais depende da espécie de fungo estudada. Já no cogumelo *Pleurotus tuber-regium*, separado em diferentes partes, o conteúdo total de proteínas foi maior no píleo que em outras regiões. Entretanto, o potássio, o mais abundante nutriente mineral presente, foi encontrado em maior concentração no estipe (AKINDAHUNSI & OYETAYO, 2006).

Nesse contexto, conhecer o potencial de diferentes espécies de cogumelos de absorver Se e saber a especiação e formas em que este elemento se encontra, se faz necessário quando consideramos a possibilidade de introduzi-los como uma nova fonte alimentar enriquecida.

REFERÊNCIAS

- AKINDAHUNSI, A. A. & OYETAYO, F. L. Nutrient and antinutrient distribution of edible mushroom, *Pleurotus tuber-regium* (fries) singer. **LWT-Food Science and Technology**, v. 39, p. 548-553, 2006.
- ALONSO, J.; GARCÍA, M. A.; PÉREZ-LÓPEZ, M., MELGAR, M. J. The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 0180-0188, 2003.
- ASSUNÇÃO, L., SILVA, M., FERNANDEZ, M., GARCÍA-BARRERA, T., GOMÉZ-ARIZA, J. L., BAUTISTA, J., & KASUYA, M. Speciation of selenium in *Pleurotus ostreatus* and *Lentinula edodes* mushrooms. **Journal of Biotechnology Letters**, v. 5, p. 079-086, 2014.
- BARROS, L., CRUZ, T.; BAPTISTA, P.; ESTEVINHO, L. M.; FERREIRA, I. C. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 2742-2747, 2008.

- BELUHAN, S. & RANOGAJEC, A. Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1076-1082, 2011.
- BERMINGHAM, E. N.; HESKETH, J. E.; SINCLAIR, B. R.; KOOLAARD, J. P.; ROY, N. C. Selenium-Enriched Foods Are More Effective at Increasing Glutathione Peroxidase (GPx) Activity Compared with Selenomethionine: A Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 6, p. 4002-4031, 2014.
- BERNAŚ, E.; JAWORSKA, G.; LISIEWSKA, Z. Edible mushrooms as a source of valuable nutritive constituents. **ACTA Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 5, p. 5-20, 2006.
- BHATIA, P.; AURELI, F.; D'AMATO, M.; PRAKASH, R.; CAMEOTRA, S. S.; NAGARAJA, T. P.; CUBADDA, F. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified Pleurotus mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. **Food Chemistry**, v. 140, p. 225-230, 2013.
- BONATTI, M.; KARNOPP, P.; SOARES, H. M.; FURLAN, S. A. Evaluation of Pleurotus ostreatus and Pleurotus sajor-caju nutritional characteristics when cultivated in different lignocellulosic wastes. **Food Chemistry**, v. 88, p. 425-428, 2004.
- BULSKA, E.; WYSOCKA, I. A.; WIERZBICKA, M. H.; PROOST, K.; JANSSENS, K.; FALKENBERG, G. In Vivo Investigation of the Distribution and the Local Speciation of Selenium in Allium cepa L. by Means of Microscopic X-ray Absorption Near-Edge Structure Spectroscopy and Confocal Microscopic X-ray Fluorescence Analysis. **Analytical Chemistry**, v.78, p. 7616-7624, 2006.
- CAREY, A. M.; LOMBI, E.; DONNER, E., DE JONGE, M. D.; PUNSHON, T., JACKSON, B. P.; GUERINOT M.L.; PRICE A. H., MEHARG, A. A. A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 402, p. 3275-3286, 2012.
- CHANG, S. T. & WASSER, S. P. The role of culinary-medicinal mushrooms on human welfare with a pyramid model for human health. **International Journal of Medicinal Mushrooms**, v. 14, p. 95-134, 2012.
- CHEN, J. An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 21, p. 320, 2012.
- CHEUNG, P. C. K. The nutritional and health benefits of mushrooms. **Nutrition Bulletin**, v. 35, p. 292-299, 2010.
- COMBS, JR. GF. Biomarkers of selenium status. **Nutrients**, v. 7, p. 2209-2236, 2015.
- COMBS, JR. GF. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 05, p. 517-547, 2001.
- EICHE, E.; BARDELLI, F.; NOTHSTEIN, A. K.; CHARLET, L.; GÖTTLICHER, J.; STEININGER, R.; DHILLON K.M.; SADANA, U. S. Selenium distribution

- and speciation in plant parts of wheat (*Triticum aestivum*) and Indian mustard (*Brassica juncea*) from a seleniferous area of Punjab, India. **Science of the Total Environment**, v. 505, p. 952-961, 2015.
- ELISASHVILI, V.; KACHLISHVILI, E.; PENNINGCKX, M. Lignocellulolytic enzymes profile during growth and fruiting of *Pleurotus ostreatus* on wheat straw and tree leaves. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 55, p. 157-168, 2008.
- FALANDYSZ, J. & BOROVIČKA, J. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 477-501, 2013.
- FALANDYSZ, J. Selenium in edible mushrooms. **Journal of Environmental Science and Health Part C**, v. 26, p. 256-299, 2008.
- FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; ABREU, R. Antioxidants in wild mushrooms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 1543-1560, 2009.
- FINLEY, J W. Increased intakes of selenium - enriched foods may benefit human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1620-1629, 2007.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Are foods that contain added nutrients considered "enriched"? Disponível em: <http://www.fda.gov/AboutFDA/Transparency/Basics/ucm194348.htm>. Acesso em: 6 de fevereiro de 2016.
- FORDYCE, F. M. Selenium deficiency and toxicity in the environment. **Springer Netherlands**, p. 375-416, 2013.
- GAŚECKA, M.; MLECZEK, M., SIWULSKI, M.; NIEDZIELSKI, P. Phenolic composition and antioxidant properties of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus eryngii* enriched with selenium and zinc. **European Food Research and Technology**, p.1-10, 2015.
- GERGELY, V.; KUBACHKA, K. M.; MOUNICOU, S.; FODOR, P.; CARUSO, J. A. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, p. 94-102, 2006.
- GUILLAMÓN, E.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; LOZANO, M.; ROSTAGNO, M. A.; VILLARES, A.; MARTÍNEZ, J. A. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. **Fitoterapia**, v. 81, p. 715-723, 2010.
- HELENO, S. A.; BARROS, L.; SOUSA, M. J.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. **Microchemical Journal**, v. 93, p.195-199, 2009.
- HUDSON, T. S.; CARLSON, B. A.; HOENEROFF, M. J.; YOUNG, H. A.; SORDILLO, L.; MULLER, W. J.; HATFIELD D. L.; GREEN, J. E.

- Selenoproteins reduce susceptibility to DMBA-induced mammary carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 33, p. 1225-1230, 2012.
- HUERTA, V. D.; SÁNCHEZ, M. L. F.; SANZ-MEDEL, A. Qualitative and quantitative speciation analysis of water soluble selenium in three edible wild mushrooms species by liquid chromatography using post-column isotope dilution ICP–MS. **Analytica Chimica Acta**, v. 538, p. 99-105, 2005.
- HUGHES, D.; FEDIRKO V.; JENAB, M., SCHOMBURG, L., MEPLAN, C.; FREISLING, H.; BUENO-DE-MESQUITA, B; HYBSIER, S.; BECKER N. ; CZUBAN M.; TJONNELAND, A.; OUTZEN M.; BOUTRON-RUAULT, M.; RACINE, A.; BASTIDE, N.; KUHN, T.; KAAKS, R.; TRICHOPOULOS, D.; TRICHOPOULOU A.; LAGIOU, P.; PANICO S; PEETERS, P. H. WEIDERPASS, E.; SKEIE, G.; DAGRUN E.; CHIRLAQUE M. D.; SANCHEZ M. J.; ARDANAZ, E; LJUSLINDER, I; WENNBERG, M; BRADBURY, K. E; VINEIS, P.; NACCARATI, A.; PALLI, D.; BOEING, H; OVERVAD, K.; DORRONSORO, M.; JAKSZYN, P.; CROSS, A. J.; QUIROS J. R; STEPIEN, M.; KONG, S. J.; DUARTE-SALLES, T.; RIBOLI, E.; HESKETH, J. E. Selenium status is associated with colorectal cancer risk in the European prospective investigation of cancer and nutrition cohort. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 1149-116, 2015.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Dietary reference for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, DC. National Academy Press 2000. 506p
- JOHNSON, C. C.; FORDYCE, F. M.; RAYMAN, M. P. Symposium on ‘Geographical and geological influences on nutrition’ Factors controlling the distribution of selenium in the environment and their impact on health and nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, p. 119-132, 2010.
- JUSTIN, J. T.; GALLEGO-GALLEGOS, M.; FRANZ, E. D.; LIBER, K.; PICKERING, I. J. Selenium speciation and localization in chironomids from lakes receiving treated metal mine effluent. **Chemosphere**, v. 89, p. 274-279, 2012.
- KRYUKOV, G. V.; CASTELLANO, S.; NOVOSELOV, S. V.; LOBANOV, A. V.; ZEHTAB, O.; GUIGÓ, R.; GLADYSHEV, V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, p. 1439-1443, 2003.
- LATIFF, L. A.; DARAN, A. B. M.; MOHAMED, A. B. Relative distribution of minerals in the pileus and stalk of some selected edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 56, n. 2, p. 115-121, 1996.
- LI, H. F., LOMBI, E.; STROUD, J. L.; MCGRATH, S. P.; ZHAO, F. J. Selenium speciation in soil and rice: influence of water management and Se fertilization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p. 11837-11843, 2010.

- LOMBI, E. & SUSINI, J. Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. **Plant and Soil**, v. 320, p. 1-35, 2009.
- LOSCALZO, J. Keshan disease, selenium deficiency, and the selenoproteome. **New England Journal of Medicine**, v. 370, p. 1756-1760, 2014.
- LUZ, J. M. R., NUNES, M. D., PAES, S. A., TORRES, D. P., SILVA, M. D. C. S., e KASUYA, M. C. M. Lignocellulolytic enzyme production of *Pleurotus ostreatus* growth in agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1508-1515, 2012.
- MADSEN, J. L., SJÖGREEN-GLEISNER, K.; ELEMA, D. R.; SØNDERGAARD, L. R.; RASMUSSEN, P.; FUGLSANG, S.; LJUNGBERG M.; DAMGAARD, M. Gamma camera imaging for studying intestinal absorption and whole-body distribution of selenomethionine. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 547-553, 2014.
- MARCOCCI, C.; KAHALY G. J; KRASSAS, G.E.; BARTALENA, L.; PRUMMEL M.; STAHL, M.; ALTEA, M.A.; NARDI, M.; PITZ, S.; BOBORIDIS,K., SIVELLI P.; VON ARX G.; MOURITS, M.P.; BALDESCHI, L.; BENCIVELLI, W.; WIERSINGA, W. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 1920-1931, 2011.
- MASEKO, T.; CALLAHAN, D. L.; DUNSHEA, F. R.; DORONILA, A.; KOLEV, S. D.; NG, K. Chemical characterisation and speciation of organic selenium in cultivated selenium-enriched *Agaricus bisporus*. **Food Chemistry**, v.141, p.3681-3687, 2013
- MASEKO, T.; DUNSHEA, F. R.; HOWELL, K.; CHO, H. J.; RIVERA, L. R.; FURNESS, J. B.; NG, K. Selenium-enriched *Agaricus bisporus* mushroom protects against increase in gut permeability ex vivo and up-regulates glutathione peroxidase 1 and 2 in hyperthermally-induced oxidative stress in rats. **Nutrients**, v. 6, p. 2478-2492, 2014.
- MEMBRILLO, I.; SÁNCHEZ, C.; MENESES, M.; FAVELA, E.; LOERA, O. Particle geometry affects differentially substrate composition and enzyme profiles by *Pleurotus ostreatus* growing on sugar cane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1581-1586, 2011.
- MISRA, S.; PEAK, D.; CHEN, N.; HAMILTON, C.; NIYOGI, S. Tissue-specific accumulation and speciation of selenium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to elevated dietary selenomethionine. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 155, p. 560-565, 2012.
- MUÑOZ S., A. H.; KUBACHKA, K.; WROBEL, K.; GUTIERREZ-CORONA, J. F.; YATHAVAKILLA, S. K.; CARUSO, J. A.; WROBEL, K. Se-enriched mycelia of *Pleurotus ostreatus*: distribution of selenium in cell walls and cell

membranes/cytosol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3440-3444, 2006.

NUNES R.G.F.L., LUZ J.M.R., FREITAS R.B., HIGUCHI A., KASUYA M.C.M.; VANETTI M.C.D. Selenium Bioaccumulation in Shiitake Mushrooms: A Nutritional Alternative Source of this Element. **Food Science**, v. 77, p. 983-986, 2012

OGRA, Y.; ISHIWATA, K.; ENCINAR, J. R.; ŁOBIŃSKI, R.; SUZUKI, K. T. Speciation of selenium in selenium-enriched shiitake mushroom, *Lentinula edodes*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, p. 861-866, 2004.

PAPP, L. V.; LU, J., HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 9, p. 775-806, 2007.

PAPPA, E. C.; PAPPAS, A. C.; SURAI, P. F. Selenium content in selected foods from the Greek market and estimation of the daily intake. **Science of the Total Environment**, v. 372, p. 100-108, 2006.

PONNAMPALAM, E.; JAYASOORIYA, D.; DUNSHEA, F. R.; GILL, H.; WERRIBEE, V. Nutritional strategies to increase the selenium and iron content in pork and promote human health. **Co-operative Research Centre for an Internationally Competitive Pork Industry, Pork CRC, Australian Government**, 2009.

RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, p. 1256-1268, 2012.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v. 100, p. 238-253, 2008.

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 191-197, 2012.

ROMÁN, M. D.; BOA, E.; WOODWARD, S. Wild-gathered fungi for health and rural livelihoods. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 65, p. 190-197, 2006.

ROUPAS, P.; KRAUSE, D.; TAYLOR, P. **Mushrooms and Health 2014: Clinical and Nutritional Studies in Humans**, 2014.

ROTRUCK JT, POPE AL, GANTHER HE. Prevention of oxidative damage to rat erythrocytes by dietary selenium. **Journal of Nutrition**, v. 102, p. 689-696, 1972.

SÁNCHEZ, C. Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 85, p. 1321-1337, 2010.

- SÁNCHEZ, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. **Biotechnology Advances**, v. 27, p. 185-194, 2009.
- SARRET, G.; PILON SMITS, E. A. H.; CASTILLO MICHEL, H.; ISAURE, M. P.; ZHAO, F. J.; TAPPERO, R. Use of synchrotron-based techniques to elucidate metal uptake and metabolism in plants. **Advances in Agronomy**, v.119, p. 1-82, 2013.
- SCHARZ K & FOLTZ CM. Selenium as an integral part of Factor 3 against dietary necrotic liver degeneration. **Journal of the American Chemical Society**, v.79, p. 3292–3293, 1957.
- SILVA, M. C.; NAOZUKA, J.; DA LUZ, J. M. R.; DE ASSUNÇÃO, L. S.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C.; BAZZOLLI D.M.S.; KASUYA, M. C. Enrichment of Pleurotus ostreatus mushrooms with selenium in coffee husks. **Food Chemistry**, v.131, p.558-563, 2012.
- SILVA, M. C.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C.; BAZZOLLI, D. M., COSTA, N. M.; KASUYA, M. C. In vivo bioavailability of selenium in enriched Pleurotus ostreatus mushrooms. **Metallomics**, v. 2, p.162-166, 2010.
- SIRÓ, I.; KAPOLNA, E., KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.
- TINGGI, U. Selenium: its role as antioxidant in human health. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 13, p. 102-108, 2008.
- TÜZEN, M. Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 74, p. 289-297, 2003.
- WANG, P.; MENZIES, N. W.; LOMBI, E.; MCKENNA, B. A.; JAMES, S.; TANG, C., KOPITTKER, P. M. Synchrotron-based X-ray absorption near-edge spectroscopy imaging for laterally resolved speciation of selenium in fresh roots and leaves of wheat and rice. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-12, 2015.
- WASSER, S. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 258-274, 2002.
- WITKOWSKA A. M., Selenium-Fortified Mushrooms - Candidates for Nutraceuticals? **Austin Therapeutics**, v. 1, p. 1-4, 2014.
- YAO, Y.; PEI, F.; KANG, P. Selenium, iodine, and the relation with Kashin-Beck disease. **Nutrition**, v. 27, p. 1095-1100, 2011.
- YU-FENG, L.; XIAOYAN, W.; LIMING, W.; BAI, L., YUXI, G.; CHUNYING, C. Direct quantitative speciation of selenium in selenium-enriched yeast and yeast-based products by X-ray absorption spectroscopy confirmed by HPLC-

ICP-MS. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 25, p. 426-430, 2010.

ZHAO, F. J.; MOORE, K. L., LOMBI, E.; ZHU, Y. G. Imaging element distribution and speciation in plant cells. **Trends in Plant Science**, v. 19, p. 183-192, 2014.

ZHAO, L.; ZHAO, G.; ZHAO, Z.; CHEN, P.; TONG, J., HU, X. Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus *Ganoderma*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3954-3959, 2004.

CAPÍTULO I

Produção de cogumelos do gênero *Pleurotus* enriquecidos com selênio

RESUMO

Cogumelos comestíveis apresentam capacidade de absorver e acumular minerais presentes no substrato onde crescem. Nesse contexto o gênero *Pleurotus*, é cultivado em diferentes substratos lignocelulolíticos. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade de três espécies de fungos do gênero *Pleurotus* em absorver selênio (Se), quando adicionado ao substrato na forma de selenito de sódio. Para o enriquecimento e cultivo dos cogumelos foi utilizado como substrato bagaço de cana-de-açúcar, previamente tratada com cal e centrifugado. Amostras de 300 g foram acondicionadas em sacos de polipropileno e inoculadas com 100 g de semente-inóculo das espécies *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cornucopiae* ou *Pleurotus djamor*. Após inoculação, foram adicionados 10 mL de solução de selenito de sódio (Na_2SeO_3) de maneira que as concentrações finais no substrato fossem de 0 (controle), 12,5 ou 25 mg kg^{-1} de Se. Após incubação a 25 °C por 20 dias as três espécies demonstraram ser eficientes na absorção desse elemento, sendo capazes de acumular entre 69,91 e 142,90 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se na massa seca de cogumelo. *P. djamor* enriquecido com 25 mg kg^{-1} de Se foi o cogumelo que apresentou maior concentração de Se (142,90 $\mu\text{g g}^{-1}$) e maior eficiência de absorção (7,31%) sendo a espécie mais indicada para produção de cogumelos enriquecidos com Se. A concentração de Se utilizada não inibiu o crescimento micelial nem a formação dos corpos de frutificação, além de não causar qualquer alteração morfológica visível. Este estudo mostra a eficiência de se enriquecer com Se cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* os quais poderiam ser uma alternativa a uma dieta deficiente nesse micronutriente, especialmente em populações que apresentam baixa ingestão deste mineral.

Palavras chaves: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cornucopiae*, *Pleurotus djamor*, biofortificação.

ABSTRACT

Edible mushrooms have great ability to absorb and accumulate minerals present in the substrate where they are grown, especially the genus *Pleurotus*, which is cultivated easily in different lignocellulolytic substrates. The goal of this study was to evaluate the ability of three species of the *Pleurotus* genus to absorb selenium, when grown in substrate added of Se, as sodium selenite. A sugarcane bagasse substrate pre-treated in lime and centrifuged was used to enrich and cultivate the mushrooms. Samples of 300 g of substrate were put into polypropylene bags and then inoculated with 100 g of spawn of the species *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cornucopiae* or *Pleurotus djamor*. After inoculation, 10 ml of sodium selenite solution (Na_2SeO_3) were added, in order to have final substrate concentrations of zero (control), 12.5 or 25 mg kg^{-1} . Then, the bags were incubated at 25 °C for 20 d. Three species evaluated proved to be efficient in the absorption of this element, being able to accumulate between 69.91 and 142.90 g dw. *P. djamor* enriched with 25 mg kg^{-1} of Se was the mushroom with most high concentration of Se (142.90 $\mu\text{g g}^{-1}$) and efficiency of absorption (7.31%), showing to be the species most suitable for production of Se-enriched mushrooms. Se concentration used did not inhibit mycelial growth or formation of fruiting bodies, and does not cause any visible morphological change. This study shows the efficiency of enrich edible *Pleurotus* mushrooms with selenium and that they could be an alternative to be used in a region where there is a deficiency in this micronutrient, especially in populations with low intake of this mineral.

Keys words: *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cornucopiae*, *Pleurotus djamor*, biofortification, enrichment.

INTRODUÇÃO

O selênio (Se) é um microelemento essencial requerido em níveis traços para a manutenção da saúde humana (PONNAMPALAM et al., 2009; CHEN, 2012). Este mineral é necessário na biossíntese de importantes proteínas, as chamadas selenoproteínas (PAPP et al., 2007), alguns exemplos destas são a Glutathione peroxidase, Iodotironina deiodinase ou a Tioredoxina redutase. Elas possuem funções relacionadas à redução de peróxidos, regulação da atividade do hormônio tireoide, participação na regeneração da atividade antioxidante, dentre outras. (PAPP et al., 2007, RAYMAN et al., 2012).

De modo geral, em circunstâncias normais, a ingestão de Se raramente excede o necessário para a expressão de selenoproteínas. Em contraste, a sua deficiência, menos de 40 µg de Se por dia por pessoa, é mais comum. A ingestão abaixo da recomendação é uma realidade que afeta a bilhões de pessoas (COMBS, 2001). O aumento da ingestão desse elemento em populações onde ele é consumido em baixas quantidades poderia ser uma opção para melhorar o nível de Se e resultar na melhora da saúde pública e redução dos custos desta (BHATIA et al., 2013, WITKOWSKA, 2014). Além disso, doses maiores que as recomendadas podem ajudar a reduzir o risco de câncer, especialmente no caso de câncer de próstata (FINLEY, 2007; PONNAMPALAM, 2009).

Uma alternativa interessante para suprir a deficiência deste mineral tem sido observada no caso de enriquecimento de cogumelos comestíveis com Se (ZHAO et al., 2004; NUNES et al., 2012; da SILVA et al., 2012; BHATIA et al., 2013, ASSUNÇÃO et al., 2014). Estes cogumelos são fontes de alimento nutritivo e recomendável em uma dieta saudável por serem baixos em calorias e ricos em proteínas (HELENO et al., 2009; CHEUNG, 2010; BELUHAN & RANOGAJEC, 2011; REIS et al., 2012).

Além disso, os cogumelos também apresentam outras características interessantes, como a capacidade de absorver minerais presentes no substrato onde crescem (FALANDISZ, 2013). No caso do Se, eles são capazes de absorver formas desse elemento inorgânico a partir do substrato e convertê-los em compostos orgânicos contendo Se, os quais são menos tóxicos e estão mais biodisponíveis para absorção por humanos (RAYMAN et al., 2008; DA SILVA et al., 2010; MADSEN et al., 2014; ASSUNÇÃO et al., 2014). O que faz dos cogumelos excelentes candidatos para enriquecimento com Se.

Com o intuito de produzir cogumelos comestíveis enriquecidos como uma forma eficiente de incorporar Se na nossa dieta, o objetivo deste trabalho foi enriquecer com esse micronutriente três espécies de fungos formadores de cogumelos do gênero *Pleurotus* utilizando como substrato bagaço de cana-de-açúcar.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Associações Micorrízicas, do Departamento de Microbiologia (DMB), do Instituto de Biotecnologia Aplicada e Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

2.1 Microrganismos e condições de cultivo

Foram utilizadas três espécies de fungos do gênero *Pleurotus*: *P. ostreatus* (Plo 02), *P. djamor* (Plo 13) e *P. cornucopiae* (Plo Cor). Obtidos da coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas / DMB / BIOAGRO / UFV.

Os isolados fúngicos da coleção foram mantidos em tubos inclinados contendo meio de cultura ágar batata dextrose (BDA, Merck®) a 4 °C e são transferidos para novos tubos contendo BDA semestralmente.

Cada um dos fungos utilizados foi transferido para placas de Petri contendo 20 mL de meio BDA, pH 5,5, e foi incubado por dez dias a 25 °C. Em seguida, cada placa foi dividida em quatro partes e cada uma delas foi utilizada para inocular um frasco de 250 mL contendo sorgo cozido e autoclavado duas vezes em intervalo de 48 h, que foi utilizado como inóculo-semente. Os frascos inoculados foram incubados a temperatura ambiente pelo período de 15 dias.

2.2 Enriquecimento dos cogumelos com Se

O substrato utilizado para este experimento foi bagaço de cana-de-açúcar seco e fragmentado (cerca de 2 cm), previamente tratado por 16 h em uma solução de óxido de cálcio (cal) a 2 % e centrifugado a 1500 g por 5 min. Amostras de 300 g do substrato foram acondicionadas em sacos de polipropileno. Cada pacote foi inoculado com 100 g de semente-inóculo de um dos três isolados fúngicos em teste. Após inoculação foram adicionados 10 mL de solução de selenito de sódio (Na_2SeO_3) de maneira que as

concentrações finais fossem de 0 (controle), 12,5 ou 25 mg de Se kg⁻¹ no substrato. A definição dessas concentrações foi baseada nos trabalhos de Da Silva e colaboradores (2012 e 2013). Os pacotes foram preparados em triplicata e incubados a 25 °C por 15 d. Após esse período foram submetidos a um choque térmico pela transferência desses pacotes para uma geladeira com temperatura de 4 °C por 24 h, para induzir a frutificação (o aparecimento dos primórdios dos cogumelos). Em seguida, os pacotes foram transferidos para uma sala de frutificação a 25 °C e umidade do ar de 70%.

Os cogumelos foram colhidos e a massa fresca determinada para avaliação da eficiência biológica (EB) segundo a seguinte fórmula:

$$EB = (\text{massa fresca dos cogumelos} / \text{massa seca do substrato}) \times 100 \text{ (Wang et al., 2001)}$$

Posteriormente, parte dos cogumelos foi armazenado em ultrafreezer a -86 °C, e a outra parte desidratada.

2.3. Quantificação do teor de selênio nos cogumelos

2.3.1 Preparo da amostra para determinação de selênio

As amostras de 500 mg de cogumelos, secos e moídos, foram colocadas dentro de um tubo fechado adicionado de 6 mL de ácido nítrico (HNO₃) e posicionados em um bloco de grafite (marca DigiPREP MS) aquecido a 65 °C overnight. Após esse período, foram adicionados 3 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a temperatura do bloco de grafite foi elevada a 120 °C. O conteúdo resultante da digestão foi transferido a novos tubos e o volume final foi completado para 10 mL utilizando água ultra pura (Milli-Q Millipore 18.2 MΩ cm⁻¹).

2.3.2 Determinação de Se

Para determinação do teor de Se foi utilizada a técnica de espectrometria de absorção atômica acoplada ao tubo de grafite (GF-AAS-Spectra 220FS).

A calibração do instrumento foi realizada de forma automática pelo aparelho utilizando uma solução de referência de 1000 mg Se L⁻¹. Os pontos de calibração utilizados foram 100, 250, 500, 750 e 1000. Para determinação da concentração de Se nas amostras digeridas foram introduzidas alíquotas de 15 µL da solução preparada e 7

μL do modificador químico (500 mg L^{-1} de Pd). O programa utilizado para determinação dos resultados está descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Programa de aquecimento utilizado no GF-AAS para quantificação de Se.

Etapa	T (°C)	Tempo (s)	Fluxo de gás (L min^{-1})	Comando de leitura
1	115	10	3	Não
2	125	40	3	Não
3	150	10	3	Não
4	1000	5	3	Não
5	1000	1	3	Não
6	1000	2	0	Não
7	2600	0,8	0	Sim
8	2600	2	0	Sim
9	2600	2	3	Não

2.4 Análises estatísticas

O experimento foi conduzido segundo o Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), representando três concentrações para o selenito de sódio e três espécies de fungos, com três repetições. Os resultados foram expressos como valores de médias com desvio padrão. Os dados de EB, tempo de incubação e concentração de Se nos cogumelos entre as espécies de fungos e concentrações de Se adicionadas ao substrato foram analisadas pela análise de variância de duas vias (“Two-way” ANOVA). As médias que apresentaram diferenças foram comparadas pelo teste de Tukey em nível de 5 % de significância.

3. RESULTADOS

A solução de selenito de sódio adicionada não inibiu o crescimento micelial, a formação dos corpos de frutificação e não alterou a morfologia dos cogumelos (Figura 1).

O enriquecimento com Se diminuiu os valores de EB nos cogumelos de *P. ostreatus* e *P. cornucopiae* só na concentração de 25 mg kg^{-1} e em *P. djamor* apenas na concentração $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ (Figura 2).

O aumento da concentração de selenito de sódio no substrato acarretou em um aumento de absorção de Se pelos cogumelos de forma similar entre as espécies estudadas (Tabela 2).

Além disso, o tempo médio de incubação para produção de cogumelos por *P. djamor* e *P. cornucopiae* aumentou quando em presença enquanto o tempo de incubação de *P. ostreatus* não foi afetado nas concentrações testadas (Tabela 2).

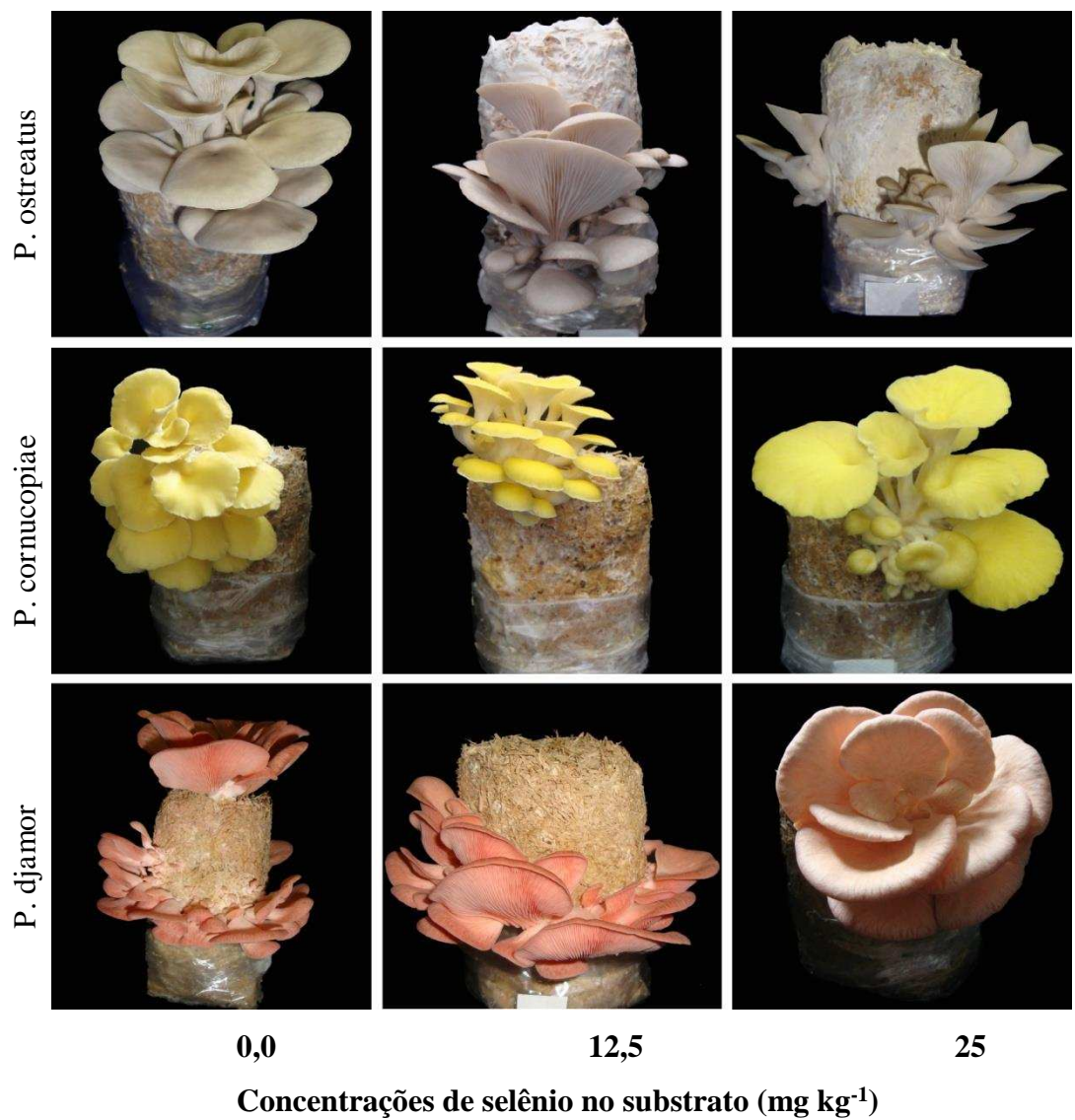


Figura 1 – Cogumelos de *P. ostreatus*, *P. cornucopiae* e *P. djamor* enriquecidos com selênio nas concentrações: 0,0; 12,5 e 25 (mg kg⁻¹).

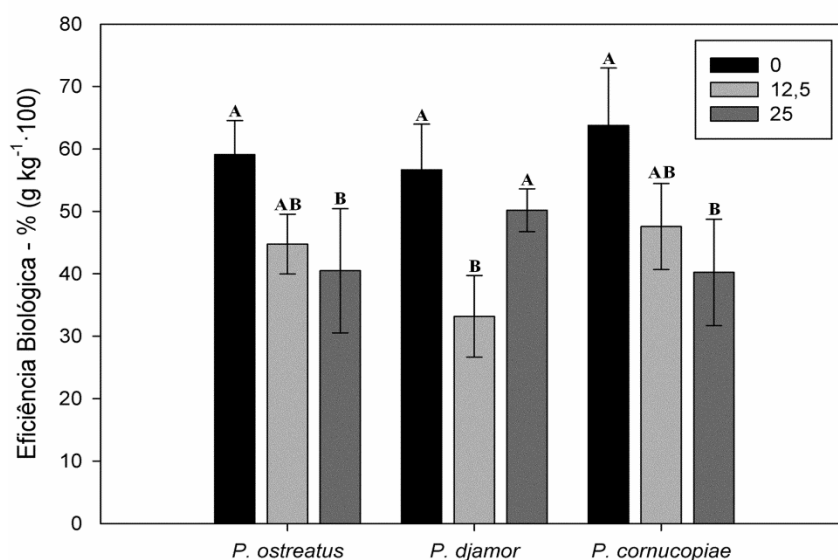


Figura 2 – Eficiência biológica (EB) da produção de cogumelos de *P. ostreatus*, *P. djamor* e *P. cornucopiae* cultivados em bagaço de cana e enriquecidos com diferentes doses de Se. Barras seguidas pela mesma letra, dentro de uma mesma espécie de cogumelo, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). EB = (massa do cogumelo fresco/massa do substrato seco)*100.

Tabela 2 - Concentração de Se ($\mu\text{g g}^{-1}$ massa seca) e tempo e incubação (dias) dos cogumelos de *Pleurotus* spp. cultivados em substrato bagaço-de-cana de açúcar adicionados com diferentes doses de Se.

Fungos	Concentrações de Se no substrato (mg kg^{-1})		
	0	12,5	25
	Concentração de Se no cogumelo		
<i>P. ostreatus</i>	0,00* ^C	86,45 ± 9,91 ^B	119,30 ± 12,83 ^A
<i>P. djamor</i>	0,00* ^C	69,91 ± 6,18 ^B	142,90 ± 31,40 ^A
<i>P. cornucopiae</i>	0,00* ^C	97,44 ± 1,39 ^B	114,36 ± 1,62 ^A
	Tempo de incubação necessário para produção de cogumelo		
<i>P. ostreatus</i>	23,35 ± 3,10 ^A	24,19 ± 4,07 ^A	26,06 ± 4,61 ^A
<i>P. djamor</i>	28,86 ± 4,69 ^B	49,19 ± 5,92 ^A	47,94 ± 6,76 ^A
<i>P. cornucopiae</i>	26,18 ± 2,04 ^B	31,67 ± 4,29 ^A	31,22 ± 4,82 ^A

* abaixo do limite de detecção.

Médias seguidas de diferentes letras dentro das linhas, para cada fungo, são significativamente diferentes pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Os cogumelos de *P. ostreatus* e *P. cornucopiae* enriquecidos com Se na concentração de 12,5 mg kg⁻¹ absorveram uma maior porcentagem de Se do substrato que quando foram enriquecidos com uma dose maior (25 mg kg⁻¹) (Tabela 3). O efeito oposto foi observado em cogumelos de *P. djamor*.

Tabela 3 Selênio adicionado ao substrato, quantidade total absorvida pelo cogumelo e a eficiência de absorção pelas espécies de *Pleurotus* spp. em bagaço de cana-de-açúcar.

Fungo	Se no Substrato (mg kg ⁻¹)	Se nos Cogumelos	
		Total (mg)	Eficiência de absorção (%)
<i>P. ostreatus</i>	0	0	-
	12,5	0,31	7,90
	25,0	0,38	4,92
<i>P. djamor</i>	0	0	-
	12,5	0,18	4,73
	25,0	0,57	7,31
<i>P. cornucopiae</i>	0	0	-
	12,5	0,37	9,45
	25,0	0,36	4,69

Eficiência de absorção (%) = 1 - (Massa de Se adicionada ao substrato – Massa de Se no cogumelo) *100

4. DISCUSSÃO

O selenito de sódio, nas concentrações testadas, não afeta a morfologia ou aspecto comercial dos fungos (Figura 1), indicando que fungos enriquecidos não enfrentariam problemas de aceitação pelo consumidor. Doses mais elevadas de Se podem afetar não só a morfologia como também o odor dos cogumelos produzidos (Da Silva et al., 2012).

O Se afetou diferentemente a EB de cada espécie de fungo. Maiores concentrações de Se diminuíram a EB nos cogumelos de *P. ostreatus* e *P. cornucopiae* (Figura 2), enquanto que para *P. djamor* a redução da EB foi mais pronunciada na concentração de 12,5 mg kg⁻¹ e um aumento desta na concentração de 25 mg kg⁻¹ que não diferiu do controle. No caso de *P. ostreatus*, a EB obtida difere dos dados de Da Silva e colaboradores (2012), que utilizando diversas doses (3,2 - 12,8 mg kg⁻¹)

observaram um aumento da EB, indicando que diferenças nas formas em que são cultivados os cogumelos, como por exemplo o substrato utilizado, afetam os valores de EB.

Pleurotus djamor enriquecido com 25 mg kg⁻¹ de Se foi o que apresentou a maior EB dentre os cogumelos que receberam o tratamento com Se (Figura 2) e também o que acumulou a maior concentração de Se (142,90 mg kg⁻¹) (Tabela 2), o que permite sugerir que este cogumelo, seria o mais indicado, nas condições relatadas, para fins de enriquecimento de cogumelos com este micronutriente.

A adição de Se retardou o tempo de incubação da produção de cogumelos de *P. djamor* e *P. cornucopiae* e não foi possível obter mais de uma colheita dos mesmos (Tabela 2). Porém, no caso de *P. ostreatus* não foram observadas diferenças no tempo de incubação destes cogumelos ($p > 0,05$). Isto difere do trabalho de Da Silva e colaboradores (2012) que observaram aumento o tempo de incubação de *P. ostreatus* quando cultivado em casca de café, o que pode dever-se ao fato de que as doses de Se utilizadas para o enriquecimento nesse trabalho foram maiores (3,2 – 101,8 mg kg⁻¹), o que provavelmente permitiu demonstrar o efeito de aumento no tempo de incubação similar ao que foi observado em *P. djamor* e *P. cornucopiae*.

O enriquecimento com Se foi obtido com sucesso para as três espécies de fungos produtores de cogumelos utilizados, os quais foram capazes de acumular Se na faixa de 69,91 até 142,90 mg kg⁻¹ de Se na massa seca (Tabela 2). Isto devido a grande capacidade que os cogumelos possuem de absorver elementos do substrato onde são cultivados (FALANDISZ, 2013). Estes resultados mostram a eficiência de uma suplementação com selenito de sódio (Na₂SeO₄) no substrato onde são cultivados fungos do gênero *Pleurotus*, o que poderia ser de grande interesse em regiões onde a população apresenta deficiência desse micronutriente. Além disso, considerando que esses cogumelos poderiam ser consumidos in natura, verifica-se que nas concentrações de Se testadas não houve qualquer alteração morfológica nos cogumelos formados (Figura 1).

É interessante observar que a espécie do fungo, a forma e a concentração do Se utilizada o para enriquecimento, bem como o modo de produção e o substrato utilizado afetam a concentração de Se nos cogumelos.

Considerando a dose de Se recomendada, 55 µg Se por dia (IOM, 2000), todos os cogumelos enriquecidos neste trabalho poderiam ser uma boa fonte deste

micronutriente, precisando de menos de um grama de cogumelo seco para suprir a dosagem recomendada. Os resultados obtidos com *P. djamor* mostraram que este cogumelo é quem foi capaz de absorver maiores quantidades de Se alcançando até 142,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se, quando cultivado em substrato bagaço de cana enriquecido com 25 mg kg^{-1} de Se (Tabela 2). Essas altas concentrações de Se obtidas são interessantes para obtenção de um produto fúngico derivado desse cogumelo, no intuito de produzir suplementos contendo Se.

No presente trabalho os cogumelos de *Pleurotus* foram capazes de absorver de 4,69% até 9,45% da solução de Se inorgânico utilizada (Tabela 3). *P. cornucopiae* enriquecido com 12,5 mg kg^{-1} de Se, foi o que absorveu maior porcentagem de Se do substrato (9,45%) mostrando melhor aproveitamento do Se utilizado no enriquecimento. Por outro lado, foi possível observar que na dose de 25 mg kg^{-1} , a absorção de Se diminuiu quase pela metade (4,69%), o que faz desta concentração pouco interessante no caso do cultivo deste fungo em larga escala. Resultado similar foi observado no cogumelo de *P. ostreatus*, onde foi possível observar que a porcentagem de absorção de Se também decaiu na concentração de 25 mg kg^{-1} . Entretanto, cogumelo de *P. djamor* foi capaz de absorver uma maior quantidade de Se quando a concentração de enriquecimento aumentou (Tabela 3). Novos experimentos devem ser realizados com este fungo com objetivo de saber se este cogumelo é capaz de absorver doses maiores e em que formas se encontra o Se absorvido.

Não foi possível detectar Se nos cogumelos utilizados como controle, provavelmente porque esse mineral não estivesse presente no bagaço de cana-de-açúcar, pois Mattila e colaboradores (2001) observaram que em *P. ostreatus*, coletados da natureza, contém 0,15 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se de massa seca, enquanto Da Silva e colaboradores (2012) reportaram concentrações de 0,12 $\mu\text{g g}^{-1}$ de Se de massa seca também para *P. ostreatus*, quando cultivado em casca de café não enriquecido.

5. CONCLUSÕES

Pleurotus ostreatus, *P. djamor* e *P. cornucopiae* são capazes de acumular Se quando cultivados em bagaço de cana-de-açúcar enriquecido com Se.

O selenito de sódio aumenta o tempo incubação para produção dos cogumelos *P. djamor* e *P. cornucopiae*, mas não de *P. ostreatus* para as doses testadas.

Pleurotus djamor, é o cogumelo que apresentou maior concentração de Se (142,9 $\mu\text{g g}^{-1}$) e maior eficiência de absorção (7,31%), sendo a espécie mais indicada para produção de cogumelos enriquecidos com Se.

6. REFERÊNCIAS

- ASSUNÇÃO, L.S.; SILVA, M.C.S.; FERNANDEZ, M.G.; GARCÍA-BARRERA, T.; GOMÉZ-ARIZA, J.L.; BAUTISTA, J.; KASUYA, M.C.M. Speciation of Selenium in Pleurotus ostreatus and Lentinula edodes Mushrooms. **Journal of Biotechnology Letters**, v. 5, p. 079-086, 2014.
- BELUHAN, S. & RANOGAJEC, A. Chemical composition and non-volatile components of Croatian wild edible mushrooms. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1076-1082, 2011.
- BHATIA, P.; AURELI, F.; D'AMATO, M.; PRAKASH, R.; CAMEOTRA, S. S.; NAGARAJA, T. P.; CUBADDA, F. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified Pleurotus mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. **Food Chemistry**, v. 140, p. 225-230, 2013.
- CHEN, J. An original discovery: selenium deficiency and Keshan disease (an endemic heart disease). **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 21, p. 320, 2012.
- CHEUNG, P. C. K. The nutritional and health benefits of mushrooms. **Nutrition Bulletin**, v. 35, p. 292-299, 2010.
- COMBS, JR. GF. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 05, p. 517-547, 2001.
- DA SILVA, M. C., NAOZUKA, J., OLIVEIRA, P. V., VANETTI, M. C., BAZZOLLI, D. M., COSTA, N. M., KASUYA, M. C. In vivo bioavailability of selenium in enriched Pleurotus ostreatus mushrooms. **Metallomics**, v. 2, p.162-166, 2010.
- DA SILVA, M. C.; NAOZUKA, J.; DA LUZ, J. M. R.; DE ASSUNÇÃO, L. S.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C.; BAZZOLLI D.M.S.; KASUYA, M. C. Enrichment of Pleurotus ostreatus mushrooms with selenium in coffee husks. **Food Chemistry**, v.131, p.558-563, 2012.
- DA SILVA, M. D. C. S., NUNES, M. D., DA LUZ, J. M. R., & KASUYA, M. C. M. Mycelial growth of Pleurotus spp in Se-enriched culture media. **Advances in Microbiology**, v. 3, p. 11-18, 2013.
- FALANDYSZ, J. & BOROVIČKA, J. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 477-501, 2013.

- FINLEY, J W. Increased intakes of selenium-enriched foods may benefit human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1620-1629, 2007.
- GERGELY, V.; KUBACHKA, K. M.; MOUNICOU, S.; FODOR, P.; CARUSO, J. A. Selenium speciation in *Agaricus bisporus* and *Lentinula edodes* mushroom proteins using multi-dimensional chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1101, p. 94-102, 2006.
- HELENO, S. A.; BARROS, L.; SOUSA, M. J.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. Study and characterization of selected nutrients in wild mushrooms from Portugal by gas chromatography and high performance liquid chromatography. **Microchemical Journal**, v. 93, p.195-199, 2009.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Dietary reference intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, DC. National Academy Press. 2000. 506p.
- MADSEN, J. L., SJÖGREEN-GLEISNER, K.; ELEMA, D. R.; SØNDERGAARD, L. R.; RASMUSSEN, P.; FUGLSANG, S.; LJUNGBERG M.; DAMGAARD, M. Gamma camera imaging for studying intestinal absorption and whole-body distribution of selenomethionine. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 547-553, 2014.
- MATILTA, P.; KÖNKÖ, K.; EUROLA, M.; PIHLAVA, J. M., ASTOLA; J., VAHTERISTO, L.; HIETANIEMI, V.; KUMPULAINEN, J; VALTONEN M.; PIIRONEN, V. Contents of vitamins, mineral elements, and some phenolic compounds in cultivated mushrooms. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2343-2348, 2001.
- NUNES, R. G. F. L., LUZ, J. M. R. D., FREITAS, R. D. B., HIGUCHI, A., KASUYA, M. C. M., & VANETTI, M. C. D. Selenium bioaccumulation in shiitake mushrooms: a nutritional alternative source of this element. **Journal of Food Science**, v. 77, p. C983-C986, 2012.
- PAPP, L. V.; LU, J., HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 9, p. 775-806, 2007.
- PONNAMPALAM, E.; JAYASOORIYA, D.; DUNSHEA, F. R.; GILL, H.; WERRIBEE, V. Nutritional strategies to increase the selenium and iron content in pork and promote human health. **Co-operative Research Centre for an Internationally Competitive Pork Industry, Pork CRC, Australian Government**, 2009.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, p. 1256-1268, 2012.

RAYMAN, M. P.; INFANTE, H. G.; SARGENT, M. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation. **British Journal of Nutrition**, v. 100, p. 238-253, 2008.

REIS, F. S.; BARROS, L.; MARTINS, A.; FERREIRA, I. C. Chemical composition and nutritional value of the most widely appreciated cultivated mushrooms: an inter-species comparative study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 191-197, 2012.

WITKOWSKA A. M., Selenium-Fortified Mushrooms - Candidates for Nutraceuticals? **Austin Therapeutics**, v. 1, p. 1-4, 2014.

ZHAO, L.; ZHAO, G.; ZHAO, Z.; CHEN, P.; TONG, J., HU, X. Selenium distribution in a Se-enriched mushroom species of the genus Ganoderma. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 3954-3959, 2004.

CAPÍTULO II

Distribuição e especiação de selênio em cogumelos de *Pleurotus* spp.

RESUMO

O enriquecimento de cogumelos com diferentes minerais tem demonstrado ser uma forma eficiente de combater a deficiência alimentar de alguns micronutrientes. Entre eles temos o selênio (Se), o qual é essencial para o funcionamento de diversas selenoproteínas, as quais realizam importantes funções no organismo. Diante do exposto, objetivo deste trabalho foi avaliar distribuição e especiação de Se em cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus djamor* enriquecidos com este micronutriente. Assim, os cogumelos enriquecidos com Se foram analisados por meio das técnicas de μ -XRF e XANES, as quais são baseadas na luz síncrotron. Por meio do mapeamento realizado, foi possível observar que houve uma maior acumulação de Se nas lâminas que em outras estruturas do cogumelo. A análise de XANES permitiu mostrar que o Se acumulado se encontra principalmente em formas reduzidas. A técnica de μ -XRF mostrou-se eficiente e prática na detecção de Se nas diferentes partes do cogumelo. Entretanto, a especiação de Se pela técnica de XANES deve ser aprimorada para permitir a diferenciação das diferentes formas de Se.

Palavras chaves: Síncrotron, enriquecimento, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor*.

ABSTRACT

Mushrooms enrichment with different minerals have been shown to be an effective way to combat food deficiency in some micronutrients. Among them, we have selenium, which is essential for the functioning of various selenoproteins and perform important functions for the humans. The aim of this study was to evaluate the distribution and speciation of selenium in *Pleurotus* genus of mushrooms enriched with this micronutrient. Thus, *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus djamor* mushrooms enriched with selenium, they were analyzed using the techniques of μ -XRF and XANES, which are based on synchrotron light. Through the mapping done, it was observed that there was a greater accumulation of selenium in the gills than other

mushroom structures. The XANES analysis allows showing that the Se was accumulated mainly in reduced forms. The μ -XRF technique proved efficient and practical in the detection of Se in different parts of the mushroom. However, the speciation of selenium by the XANES technique should be improved to allow the differentiation of different forms of Se.

Key words: Synchrotron, enrichment, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus djamor*.

1. INTRODUÇÃO

O Selênio (Se) é um micronutriente essencial, requerido para o funcionamento de diversas proteínas, as quais são conhecidas como selenoproteínas, dentre as mais estudadas temos a Glutathione peroxidase, Iodotironina deiodinase, Tioredoxina redutase, Selenoproteína P e Selenoproteína W. As quais estão envolvidas em funções como a redução de peróxidos, a regulação da atividade do hormônio tireoideo, participação na regeneração da atividade antioxidante, dentre outras (PAPP et al., 2007, RAYMAN et al., 2012).

A ingestão de Se abaixo da dose recomendada, 55 $\mu\text{g Se d}^{-1}$ para adultos (IOM, 2000), é uma realidade que afeta a bilhões de pessoas (COMBS, 2001). Em algumas regiões, como no nordeste da China, a falta de Se no solo acarreta baixos teores deste mineral em alimentos e como consequência baixa ingestão desse elemento pela população, problema que é causativo de uma cardiomiopatia juvenil (doença de Keshan) e também de uma condrodistrofia (doença de Kashin – Beck). Aumento da ingestão desse elemento nessas populações poderia resultar no melhoramento da saúde pública e redução dos custos desta (BHATIA, 2013, WITKOWSKA, 2014).

Por outro lado, foram observados efeitos positivos, relacionados à suplementação com Se, no tratamento de problemas que afetam à saúde humana como na Orbitopatia de Graves. Neste caso, a suplementação com Se testada em pacientes, mostrou ser eficiente, diminuindo a progressão da doença e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (MARCOCCI et al., 2011).

Além disso, doses maiores que as requeridas devem ajudar a reduzir o risco de câncer, especialmente no caso de câncer de próstata (FINLEY, 2007; PONNAMPALAM, 2009).

Alimentos enriquecidos com Se são mais efetivos em aumentar a atividade das enzimas, como a glutathione peroxidase, quando comparados à ingestão de outras formas de Se (BERMIMNGHAM, 2014). Com esse intuito é que diversos autores têm trabalhado com o enriquecimento com Se de fungos produtores de cogumelos (ALONSO et al., 2003; DA SILVA et al., 2010; DA SILVA et al., 2012; NUNES et al., 2012; ASSUNÇÃO et al., 2014). Os quais têm demonstrado uma maior capacidade de absorver nutrientes do solo quando comparado com plantas (TÜZEN, 2003; FALANDISZ, 2013).

Tão importante quanto conhecer as concentrações em que o Se se encontra em determinados alimentos é o conhecimento das formas químicas em que se encontra esse micronutriente, já que é fundamental para poder conhecer sua biodisponibilidade e toxicidade (BHATIA, 2013).

O Se existe em muitas formas diferentes, ele pode ser encontrado em formas inorgânicas como selenito ou selenato, mas também em formas orgânicas como selenometionina ou selenocisteína. Os fungos são capazes de absorver formas de Se inorgânico a partir do substrato e podem convertê-los em compostos orgânicos contendo Se (DA SILVA et al., 2010; ASSUNÇÃO et al., 2014), os quais estão mais biodisponíveis para absorção por humanos (RAYMAN et al., 2008; DA SILVA et al., 2010; MADSEN et al., 2014).

Sabendo disso é que cada vez existe um maior interesse por novas técnicas e ferramentas que permitam conhecer a composição de diversas amostras. O uso de técnicas baseadas na luz síncrotron com objetivo de saber a especiação e distribuição de alguns elementos têm sido cada vez mais recorrente em plantas (BULSKA et al., 2006; WANG et al., 2015), já que uma das principais vantagens que possui essa técnica é não ocasionar danos na amostra, o que poderia resultar em alterações na especiação dos elementos estudados (CAREY, 2012; SARRET et al., 2013). Duas técnicas muito utilizadas em plantas são: X-ray absorption spectrometry (XAS), que é utilizada para analisar a especiação química dos elementos e X-ray fluorescence (XRF), por meio da qual é possível conhecer a distribuição de elementos nas amostras. (ZHAO et al., 2014).

Porém, não tem sido referenciada a utilização da luz síncrotron na análise da composição de cogumelos, a qual poderia ser uma ferramenta de grande utilidade no caso de enriquecimento com algum micronutriente. Sabendo disso, é que o presente

trabalho tem como objetivo conhecer a distribuição e especiação do Se em cogumelos do gênero *Pleurotus* enriquecidos com esse micronutriente, utilizando a luz síncrotron como ferramenta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cultivo e enriquecimento de cogumelos com Se

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Associações Micorrízicas, do Departamento de Microbiologia (DMB), localizado no Instituto de Biotecnologia Aplicada e Agropecuária (BIOAGRO) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), em Viçosa, Minas Gerais.

Foram utilizadas duas espécies de fungos do gênero *Pleurotus*: *P. ostreatus* (Plo02) e *P. djamor* (Plo13). Esses isolados pertencem à coleção do Laboratório de Associações Micorrízicas / DMB / BIOAGRO / UFV.

O substrato utilizado para este experimento foi bagaço de cana-de-açúcar seco e fragmentado (cerca de 2 cm), previamente tratado por 16 h em uma solução de óxido de cálcio (cal) a 2 % e centrifugado a 1500 g por 5 min. Amostras de 300 g do substrato foram acondicionadas em sacos de polipropileno. Cada pacote foi inoculado com 100 g de semente-inóculo de um dos três isolados fúngicos em teste. Após inoculação foram adicionados 10 mL de solução de selenito de sódio (Na_2SeO_3) de maneira que as concentrações finais fossem de 50 e 100 mg de Se kg^{-1} no substrato. Os pacotes foram preparados em triplicata e incubados a 25 °C por 15 dias. Após esse período foram submetidos a um choque térmico pela transferência desses pacotes para uma geladeira com temperatura de 4 °C por 24 h, para induzir a frutificação (o aparecimento dos primórdios dos cogumelos). Em seguida, os pacotes foram transferidos para uma sala de frutificação a 25 °C e umidade do ar de 70%.

Posteriormente, parte dos cogumelos foi armazenado em ultrafreezer a -86 °C, e a outra parte desidratada.

2.2. Quantificação do teor de selênio nos cogumelos

2.2.1 Preparo da amostra para determinação de selênio

As amostras de 500 mg de cogumelos, secos e moídos, foram colocadas dentro de um tubo fechado adicionado de 6 mL de ácido nítrico (HNO_3) e posicionados em um

bloco de grafite (marca DigiPREP MS) aquecido a 65 °C overnight. Após esse período, foram adicionados 3 mL de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e a temperatura do bloco de grafite foi elevada a 120 °C. O conteúdo resultante da digestão foi transferido a novos tubos e o volume final foi completado para 10 mL utilizando água ultra pura (Milli-Q Millipore 18.2 MΩ cm⁻¹).

2.2.2 Determinação de Se

Para determinação do teor de Se foi utilizada a técnica de espectrometria de absorção atômica acoplada ao tubo de grafite (GF-AAS-Spectra 220FS).

A calibração do instrumento foi realizada de forma automática pelo aparelho utilizando uma solução de referência de 1000 mg Se L⁻¹. Os pontos de calibração utilizados foram 100, 250, 500, 750 e 1000. Para determinação da concentração de Se nas amostras digeridas foram introduzidas alíquotas de 15 µL da solução preparada e 7 µL do modificador químico (500 mg L⁻¹ de Pd).

2.3 Distribuição e especiação do Se: µ-XRF e XANES

2.3.1 Preparação de amostras

Para a análise de µ-XRF amostras de cogumelos frescos foram fixados em solução FAA (formaldehído-ácido acético-etanol), por 24 h. Após esse período foram desidratados por meio de incubações em concentrações crescentes de álcool etílico (70, 80, 95 %) trocando-as a cada 24 h. Posteriormente, cogumelos inteiros foram emblocadas em historesina (marca: Leica), segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, e seccionadas manualmente (de aprox.. 2 mm de espessura). Também foram realizadas secções transversais manualmente (de aprox.. 2mm de espessura) de amostras de diferentes partes desses cogumelos (estipe, píleo e lâmina).

Para medições pela técnica de XANES, amostras de 200 mg de cogumelos inteiros desidratados e triturados foram compactadas em pastilhas de 3 mm de espessura.

Os compostos de Se utilizados como padrões para este estudo foram: selênio elementar (Se⁰, Sigma-Aldrich; 229865), selenito de sódio (Na₂O₃Se, Sigma-Aldrich; 214485), selenato de sódio (Na₂O₄Se, Sigma-Aldrich; S8295), L-selenometionina (C₅H₁₁NO₂Se, SeMet, Sigma-Aldrich; S3875), L-selenocisteína (C₆H₁₂N₂O₄Se₂,

Sigma-Aldrich; 545996),) e Se(metil)-selenocisteína hidróclorido ($C_4H_9NO_2Se \cdot HCl$, Sigma-Aldrich; M6680). Cada um dos padrões foi diluído em nitrato de boro, e preparados em pastilhas pressurizadas de modo que cada uma delas contivesse concentrações entre 2 a 3% de Se.

2.3.2 Análises de μ -XRF e XANES

As análises de μ -XRF e XANES foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo.

O anel de luz síncrotron do LNLS opera com um valor de energia dos elétrons de 1.37 GeV e uma corrente nominal de 200 mA.

Para a obtenção dos espectros de XANES, foi feita a calibração em energias do microfeixe de raios-X na borda K de Se ($E_{\text{bordaK}} = 12.658 \text{ keV}$). Os dados foram colhidos desde -80 a $+100$ eV relativos à borda de Se usando passos de 0,4 a 2 eV por um tempo de 5 a 10 s. A média de 4 a 7 leituras foi utilizada para obter um sinal com o menor ruído possível para análises posteriores, tanto dos padrões de Se como das amostras de cogumelos

Os espectros de μ -XRF, bem como os mapas elementares, foram analisados usando o software PyMCA 5.1.1 (SOLÉ et al., 2007), um programa avançado de ajuste desenvolvido pelo ESRF.

A análise dos espectros de XANES foi realizada utilizando o programa ATHENA incluído no pacote IFFEFIT de análise de espectros XAS (RAVEL e NEWVILLE, 2005). Após normalização dos espectros, análises por combinação linear dos perfis das bordas de absorção K dos espectros XANES para os padrões, foram realizadas utilizando os métodos do ATHENA e comparados com as amostras a fim de determinar as possíveis formas de Se presentes.

3. RESULTADOS

Por meio do uso da técnica de μ -XRF foi possível obter um mapa com a distribuição de Se nos cogumelos de *P. ostreatus* e *P.djamor* (Figura 1: B, D, F e H). Também, mediante microscopia estereoscópica foram obtidas as respectivas fotografias (Figura 1: A, C, E e G).

Dados dos espectros de vários compostos contendo Se foram coletados (Figura 2). Amostras dos padrões de selenato, selenito, selenometionina, selenocisteína e metil selenocisteína forma utilizados com objetivo de observar diferenças entre as bordas de absorção de selenito e selenato, podendo ser possível diferenciar claramente umas de outras. Isto não é tão claro nos espectros de XANES dos compostos orgânicos os quais apresentam bordas de absorção bastante próximas (Figura 2), o que dificulta a diferenciação entre eles.

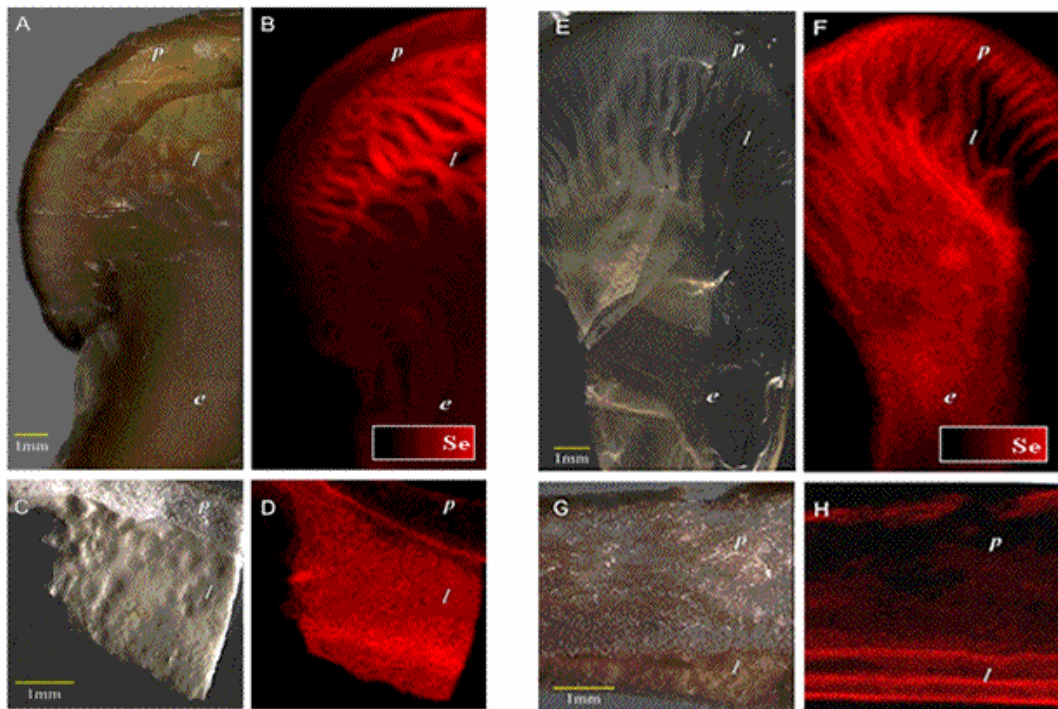


Figura 1 Cogumelos *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus djamor* enriquecidos com selênio, intactos e suas partes (píleo e lâmina), observados sob microscópio estereoscópico (A, C, E, G) e seus respectivos mapas μ -XRF de Se (B, D, F, H), mostrando, em vermelho, a presença de selênio. *Pleurotus ostreatus* e suas partes (A-D) e *Pleurotus djamor* e suas partes (E-H). p: píleo, l: lâmina, e: estipe.

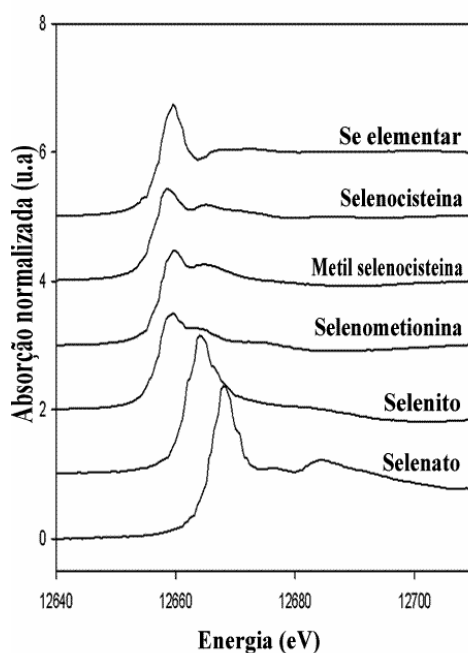


Figura 2: Espectro obtidos por meio da técnica de XANES para os compostos de Se usados como padrões de referência.

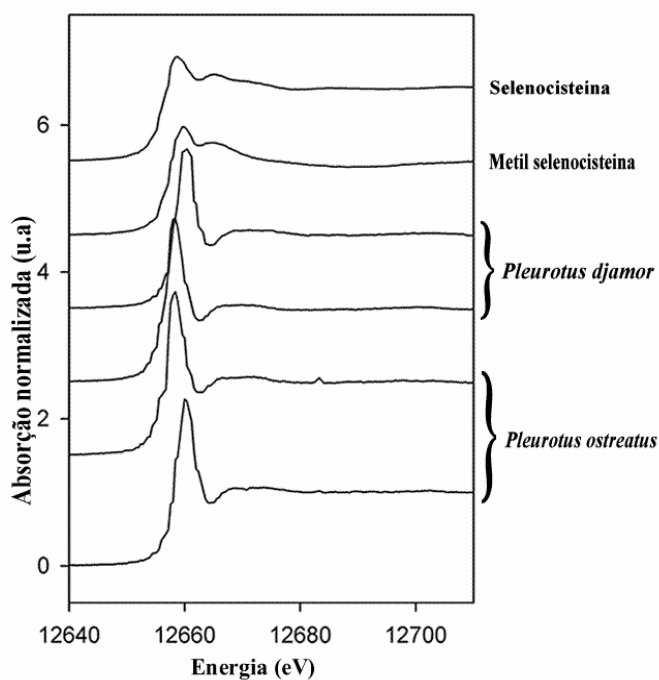


Figura 3: Espectros de XANES para cogumelos de *Pleurotus* enriquecidos em diferentes doses de Se e alguns padrões de referência. De cima pra baixo: selenocisteína, Se-metil selenocisteína, 2 espectros pertencentes a *P. djamor* (na concentração de enriquecimento de 100 e 50 mg kg⁻¹) e 2 espectros pertencentes a *P. ostreatus* (na concentração de enriquecimento de 100 e 50 mg kg⁻¹).

Houve uma oxidação dos padrões quando analisados, isso foi evidenciado ao observar um claro deslocamento dos picos nas diferentes leituras realizados. Os espectros que mostraram oxidação não foram considerados na construção dos espectros apresentados, tanto nos padrões como nas amostras (Figuras 2 e 3).

O resultado da combinação linear dos espectros obtidos pela técnica de XANES mostrou que os cogumelos acumularam formas orgânicas de Se (Figura 3). Porém não foi possível diferenciar as espécies neles presentes.

4. DISCUSSÃO

Por meio da técnica de μ -XRF foi possível observar a distribuição do Se em cogumelos de *P. ostreatus* e *P. djamor* enriquecidos com esse micronutriente (Figura 1). Mostrando que existem altas concentrações deste elemento nas lâminas, quando comparado com o píleo que mostra pouca fluorescência, indicando uma baixa concentração deste elemento nessa estrutura. E quanto ao estipe, este possui uma distribuição uniforme de Se, indicando que acumula Se, mas não em altas concentrações. No entanto, como o consumo de cogumelos é feito de forma integral (inteiro), a distribuição do Se não seria importante. Porém se o interesse for utilizar eles para fabricar algum suplemento com altas concentrações deste micronutriente, poderia se escolher quais regiões do cogumelo utilizar com este fim. As duas espécies utilizadas neste trabalho mostraram resultados similares em quanto à distribuição deste elemento (Figura 1).

A técnica de XANES nos permitiu indicar o caráter reduzido das formas de Se encontradas na biomassa fúngica de ambos os fungos estudados e em todos os tratamentos (Figura 3). Os espectros dos compostos inorgânicos mais oxidados (selenato e selenito) apresentaram espectros com mais características e, portanto, mais facilmente distinguíveis. Porém, os padrões orgânicos avaliados (selenometionina, selenocisteína, e metilselenocisteína) apresentaram espectros com características muito semelhantes (Figura 2), o que dificulta a diferenciação entre eles. Esse mesmo problema também foi observado por outros autores (BULSKA et al, 2006, SARRET et al., 2013).

Os espectros das amostras dos dois cogumelos avaliados, em qualquer uma das concentrações nas quais eles foram enriquecidos com Se, apresentam espectros bastante

semelhantes e com poucas características (Figura 3). Porém, a energia na qual ocorre o pico de absorção de raio X nos permite afirmar que o Se que se encontra na biomassa fúngica, em qualquer concentração e cogumelo avaliado, é uma espécie reduzida. O Se fornecido aos fungos no seu substrato de crescimento na forma mais oxidada do elemento (selenato) foi absorvido e assimilado por esses fungos em formas mais reduzidas de Se. Percebe-se que o pico máximo de absorção de raio X está ocorrendo por volta de 12.660 eV, a energia de absorção de formas orgânicas e do Se elementar

Embora os picos de máxima absorção das amostras estejam realmente ocorrendo em energias próximas das formas orgânicas de Se, não podemos afirmar que sejam formas orgânicas, uma vez que nossos padrões não permitiram um bom ajuste linear. Uma grande diferença que existe entre as amostras e os padrões de formas orgânicas de Se é o formato e o tamanho do pico de máxima absorção, que é diferente entre eles. As formas orgânicas de Se apresentam espectro com pico de máxima absorção de tamanho reduzido e ligeiramente mais largos em comparação com as amostras.

Portanto, o que a análise de XANES nos permite afirmar é que esse Se fornecido na forma de selenito foi absorvido e assimilado pelos fungos em formas mais reduzidas, possivelmente formas orgânicas de Se. Mesmo em condições de elevadas concentrações, todo o Se absorvido foi assimilado em formas reduzidas de Se (Figura 3).

As análises realizadas permitiram determinar que os cogumelos de *P. djamor* e *P. ostreatus* acumularam espécies reduzidas de Se, porém, não foi possível distinguir entre elas, devido a que os espectros orgânicos de Se apresentam bordas de absorção próximas e poucas características.

5. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostra a eficiência de usar técnicas baseadas na luz síncrotron para determinar a distribuição de Se em cogumelos de *Pleurotus*. A técnica de μ -XRF mostrou-se eficiente e prática na detecção de Se nas diferentes partes do cogumelo. Entretanto, a especiação de Se pela técnica de XANES deve ser aprimorada usando novos padrões que permitam a diferenciação das diferentes formas de Se orgânico.

6. REFERÊNCIAS

- ALONSO, J.; GARCÍA, M. A.; PÉREZ-LÓPEZ, M., MELGAR, M. J. The concentrations and bioconcentration factors of copper and zinc in edible mushrooms. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 44, p. 0180-0188, 2003.
- BERMINGHAM, E. N.; HESKETH, J. E.; SINCLAIR, B. R.; KOOLAARD, J. P.; ROY, N. C. Selenium-Enriched Foods Are More Effective at Increasing Glutathione Peroxidase (GPx) Activity Compared with Selenomethionine: A Meta-Analysis. **Nutrients**, v. 6, p. 4002-4031, 2014.
- BHATIA, P.; AURELI, F.; D'AMATO, M.; PRAKASH, R.; CAMEOTRA, S. S.; NAGARAJA, T. P.; CUBADDA, F. Selenium bioaccessibility and speciation in biofortified *Pleurotus* mushrooms grown on selenium-rich agricultural residues. **Food Chemistry**, v. 140, p. 225-230, 2013.
- BULSKA, E.; WYSOCKA, I. A.; WIERZBICKA, M. H.; PROOST, K., JANSSENS, K.; FALKENBERG, G. In Vivo Investigation of the Distribution and the Local Speciation of Selenium in *Allium cepa* L. by Means of Microscopic X-ray Absorption Near-Edge Structure Spectroscopy and Confocal Microscopic X-ray Fluorescence Analysis. **Analytical Chemistry**, v.78, p. 7616-7624, 2006.
- CAREY, A. M.; LOMBI, E.; DONNER, E., DE JONGE, M. D.; PUNSHON, T., JACKSON, B. P.; GUERINOT M.L.; PRICE A. H., MEHARG, A. A. A review of recent developments in the speciation and location of arsenic and selenium in rice grain. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, p. 3275-3286, 2012.
- COMBS, JR. GF. Selenium in global food systems. **British Journal of Nutrition**, v. 85, n. 05, p. 517-547, 2001.
- FALANDYSZ, J. & BOROVIČKA, J. Macro and trace mineral constituents and radionuclides in mushrooms: health benefits and risks. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 477-501, 2013.
- FINLEY, J W. Increased intakes of selenium - enriched foods may benefit human health. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, p. 1620-1629, 2007.
- INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). Dietary reference for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington, DC. National Academy Press 2000. 506p
- MADSEN, J. L., SJÖGREEN-GLEISNER, K.; ELEMA, D. R.; SØNDERGAARD, L. R.; RASMUSSEN, P.; FUGLSANG, S.; LJUNGBERG M.; DAMGAARD, M. Gamma camera imaging for studying intestinal absorption and whole-body distribution of selenomethionine. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 547-553, 2014.

- MARCOCCI, C.; KAHALY G. J; KRASSAS, G.E.; BARTALENA, L.; PRUMMEL M.; STAHL, M.; ALTEA, M.A.; NARDI, M.; PITZ, S.; BOBORIDIS,K., SIVELLI P.; VON ARX G.; MOURITS, M.P.; BALDESCHI, L.; BENCIVELLI, W.; WIERSINGA, W. **The New England Journal of Medicine**, v. 364, p. 1920-1931, 2011.
- NUNES R.G.F.L., LUZ J.M.R., FREITAS R.B., HIGUCHI A., KASUYA M.C.M.; VANETTI M.C.D. Selenium Bioaccumulation in Shiitake Mushrooms: A Nutritional Alternative Source of this Element. **Food Science**, v. 77, p. 983-986, 2012.
- PAPP, L. V.; LU, J., HOLMGREN, A.; KHANNA, K. K. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxidants & Redox Signaling**, vol. 9, p. 775-806, 2007.
- PONNAMPALAM, E.; JAYASOORIYA, D.; DUNSHEA, F. R.; GILL, H.; WERRIBEE, V. Nutritional strategies to increase the selenium and iron content in pork and promote human health. **Co-operative Research Centre for an Internationally Competitive Pork Industry, Pork CRC, Australian Government**, 2009.
- RAVEL B. & NEWVILLE B., ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. **Journal of Synchrotron Radiation**, v.12, p. 537–541, 2005.
- RAYMAN, M. P. Selenium and human health. **The Lancet**, v. 379, p. 1256-1268, 2012.
- SARRET, G.; PILON SMITS, E. A. H.; CASTILLO MICHEL, H.; ISAURE, M. P.; ZHAO, F. J.; TAPPERO, R. Use of synchrotron-based techniques to elucidate metal uptake and metabolism in plants. **Advances in Agronomy**, v.119, p. 1-82, 2013.
- SILVA, M. C.; NAOZUKA, J.; DA LUZ, J. M. R.; DE ASSUNÇÃO, L. S.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C.; BAZZOLLI D.M.S.; KASUYA, M. C. Enrichment of Pleurotus ostreatus mushrooms with selenium in coffee husks. **Food Chemistry**, v.131, p.558-563, 2012.
- SILVA, M. C.; NAOZUKA, J.; OLIVEIRA, P. V.; VANETTI, M. C.; BAZZOLLI, D. M., COSTA, N. M.; KASUYA, M. C. In vivo bioavailability of selenium in enriched Pleurotus ostreatus mushrooms. **Metallomics**, v. 2, p.162-166, 2010.
- SOLÉ, V.A., PAPILLON, E., COTTE, M., WALTER, PH., J. SUSINI. A multiplatform code for the analysis of energy-dispersive X-ray fluorescence spectra, **Spectrochim. Acta B**, v. 62, p. 63-68, 2007.
- TÜZEN, M. Determination of heavy metals in soil, mushroom and plant samples by atomic absorption spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 74, p. 289-297, 2003.
- WANG, P.; MENZIES, N. W.; LOMBI, E.; MCKENNA, B. A.; JAMES, S.; TANG, C., KOPITTKKE, P. M. Synchrotron-based X-ray absorption near-edge

spectroscopy imaging for laterally resolved speciation of selenium in fresh roots and leaves of wheat and rice. **Journal of Experimental Botany**, p. 1-12, 2015.

WITKOWSKA A. M. Selenium-Fortified Mushrooms - Candidates for Nutraceuticals? **Austin Therapeutics**, v. 1, p. 1-4, 2014.

CONCLUSÃO GERAL

O enriquecimento de cogumelos das espécies de *Pleurotus ostreatus*, *P. djamor* e *P. cornucopiae* quando cultivados em bagaço de cana-de-açúcar enriquecido com selênio (Se) foi obtido com sucesso. Destaca-se *P. djamor* que foi quem apresentou maior concentração de Se ($142,9 \mu\text{g g}^{-1}$) e também maior eficiência de absorção (7,31%), sendo a espécie mais indicada no caso de produção de cogumelos enriquecidos.

Por meio da técnica de μ -XRF foi possível observar a distribuição do Se em cogumelos de *P. ostreatus* e *P. djamor* enriquecidos com esse micronutriente, mostrando que a parte das lâminas dos cogumelos é onde se observa um maior acúmulo de Se, mostrando assim que estas estruturas poderiam ser as mais adequadas no caso de querer obter algum suplemento alimentar derivado de cogumelos. Também pela técnica de XANES foi possível determinar esses cogumelos acumulam espécies reduzidas de Se as que provavelmente correspondem a espécies orgânicas de Se, as quais se encontram mais biodisponíveis para absorção. Técnicas complementares e novas análises com uma maior variedade de padrões de Se devem ser testadas com intuito de diferenciar os compostos presentes nos cogumelos.