

Este exemplar corresponde a redação final  
da tese defendida por Carmen Silvia  
Rincon Bazzani e aprovada pela Comissão  
Julgadora.

9/Janerio 1992

Molpe

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

UNICAMP

INSTITUTO DE QUÍMICA

MONITORAMENTO DA FERMENTAÇÃO DA D-GLICOSE

PELA *Saccharomyces cerevisiae* POR

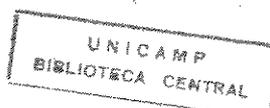
MICROCALORIMETRIA DE FLUXO

CARMEN SILVIA RINCON BAZZANI

TESE DE MESTRADO

Orientador : Prof. Dr. PEDRO L. O. VOLPE†

1991



Aos meus pais, DARCI e CARMEN,  
pelo apoio e incentivo.

Ao meu marido, JOSÉ ROBERTO...

...com muito amor.

E ao nosso filho MARCELO.

## AGRADECIMENTOS

A todos que de uma maneira ou de outra tenham contribuído para a realização deste trabalho, e em especial a:

Ao Instituto de Química da UNICAMP pelas condições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FAEP (Fundo de Apoio ao Ensino e Pesquisa) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Luiz O. Volpe pela amizade, compreensão e apoio durante todo o transcorrer deste trabalho.

À Dra. Silvia Y. Eguchi, da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia pelo auxílio na preparação da cultura de microorganismos utilizada neste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biotermodinâmica, Carmelita A. Basílio, Claudio Antonio Tonegutti, Eloi A. Silva Filho, Ligia Dobré e Watson Loh.

## ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	III
GLOSSÁRIO	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 DESENVOLVIMENTO DA MICROCALORIMETRIA	1
1.2 CLASSIFICAÇÃO DOS MICROCALORÍMETROS	6
1.2.1 MICROCALORÍMETROS DE CONDUÇÃO DE CALOR	8
1.2.2 CLASSIFICAÇÃO DAS CELAS DE REAÇÃO	11
1.3 APLICAÇÃO DA MICROCALORIMETRIA EM SISTEMAS BIOLÓGICOS	12
1.4 LEVEDURAS - FISILOGIA E BIOQUÍMICA	17
1.4.1 NÍVEIS DO METABOLISMO DAS LEVEDURAS	19
1.4.2 FASES DO METABOLISMO DAS LEVEDURAS	21
1.5 OBJETIVOS	26
2. PARTE EXPERIMENTAL	27
2.1 PREPARAÇÃO DA CULTURA DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.2 CONGELAMENTO ("FREEZING") DA SUSPENSÃO DE LEVEDURAS	28
2.3 DEFINIÇÃO DO MEIO CALORIMÉTRICO	29
2.4 EQUIPAMENTO UTILIZADO	31
2.5 INOCULAÇÃO	34
2.6 ANÁLISE DOS TERMOGRAMAS	37
2.7 EFEITO DA VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	39

2.8 EFEITO DA VARIAÇÃO DO pH DO MEIO	39
2.9 EFEITO DA ADIÇÃO DE SAIS DE METAIS PESADOS	41
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 VANTAGENS DA UTILIZAÇÃO DO MICROCALORÍMETRO DE FLUXO	45
3.2 METABOLISMO DAS LEVEDURAS	48
3.3 O PAPEL DO OXIGÊNIO NO METABOLISMO DA <i>S. Cerevisiae</i>	49
3.4 TEMPERATURA E pH	50
3.5 CALIBRAÇÃO DOS TERMOGRAMAS	53
3.6 VARIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE GLICOSE	55
3.7 VARIAÇÃO DO pH DO MEIO DE CULTURA	59
3.8 ADIÇÃO DE SAIS DE METAIS PESADOS	64
3.9 ADIÇÃO DE SULFATO DE CÁDMIO	67
4. CONCLUSÃO	71
5. BIBLIOGRAFIA	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

(1) Calorímetro de gelo de Lavoisier	4
(2) Esquema de construção de um microcalorímetro	9
(3) Avaliação da atividade de antibióticos por microcalorimetria	16
(4) Termograma típico do metabolismo da levedura	22
(5) Esquema da via metabólica anaeróbica	25
(6) Esquema da termopilha	32
(7) Esquema da cela de fluxo	34
(8) Esquema mostrando o arranjo experimental - microcalorímetro e microfermentador	36
(9) Monitoramento do metabolismo da <i>S. cerevisiae</i>	52
(10) Microcalorimetria do crescimento da <i>P. phosphoreum</i>	53
(11) Esquema de um termograma típico indicando a área de calibração	54
(12) Concentração de glicose em função do tempo	56
(13) Log Q em função de t em função da concentração de glicose	57
(14) Tempo de exaustão em função do pH	62
(15) Log Q em função de t em função do pH	63
(16) Perfil dos termogramas com adição de cádmio	68
(17) Log Q em função de t em função da concentração de cádmio	69

## GLOSSÁRIO

dq/dt	Taxa de variação de calor em função do tempo
DMSO	Dimetil sulfóxido
DSC	Calorímetro de Varredura Diferencial
fem	Força eletro motriz
FTPT	Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia
In.	Inoculação
k	Constante de formação
MIC	Concentração Inibitória Mínima
Q	Quantidade de calor
QSAR	Relação entre a atividade biológica e a estrutura química
t <sub>ex</sub>	Tempo de exaustão
TAM	Monitor de Atividade Biológica
ufc	Unidade formadora de colônia

## RESUMO

Nesta tese utilizou-se um microcalorímetro de fluxo para se estudar em tempo real e "in situ" o processo fermentativo da d-glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* (754 FTPT) . Este trabalho de tese marca o início de uma área de estudo no I.Q. (microcalorimetria biológica) onde o processo metabólico de uma cultura bem definida de microorganismos é estudada no interior de um microcalorímetro.

O inóculo utilizado foi preparado na FTPT, com contagem viável de  $10^7$  células /ml e estocado em nitrogênio líquido. O meio de cultura foi padronizado - meio definido, e o pH de trabalho foi de 5,0 com atmosfera de  $N_2$  na temperatura de 300 K.

Estudou-se o efeito da variação da concentração de glicose, do pH do meio de cultura (de 2,1 até 7,0) e o efeito da adição de metais pesados, cobre, ferro, cádmio, zinco e mercúrio.

Na região de pH 4,0 a 6,0 observou-se um mínimo nos valores de  $\text{tex}$  e conseqüentemente uma maior inclinação nas curvas  $\log Q \times t$  obtidas.

A concentração inibitória de cada metal pesado estudado foi encontrada, sendo que para o zinco, ferro e cobre obteve-se um valor de  $10^{-2}M$ , para o mercúrio  $10^{-4}M$  e para o cádmio  $10^{-3}M$ . Um efeito inesperado foi observado para a adição do metal cádmio que ao contrário dos outros metais potencializou a produção de calor no processo em concentrações menores que a inibitória.

## ABSTRACT

In this work a flow microcalorimeter was used to study *in situ* and in real time the fermentative process of d-glucose by *Saccharomyces cerevisiae* (FTPT 754). This work mark out the begining of a research area (biological microcalorimetry) in the I.Q. where a metabolic process was studied by pumping a defined medium plus microorganisms through a microcalorimeter.

The inocula was prepared by FTPT with viable count of  $10^7$  cells/ml and was stored in liquid nitrogen. The medium was standarized - defined medium, and the process was studied in  $N_2$  atmosphere at 300 K and pH=5,0.

The effect of glucose concentration, pH of the medium (from 2,1 till 7,0) and addition of heavy metals salts as copper, iron, cadmium, zinc and mercury was also studied in this work.

The variation on the glucose concentration affected exponentially the exaustion time. A minimum value of  $t_{ex}$  was observed in pH range 4,0 - 6,0. Consequently a higher slope for curves  $\log Q \times t$  was obtained.

The inhibitory concentration of each studied heavy metal added to the medium was determined. For zinc, iron and copper the concentration was  $10^{-2}M$  and  $10^{-4}M$ ,  $10^{-3}M$  for mercury and cadmium respectively. An unexpected effect for the addition of cadmium was observed compared to the other cations. The addition of cadmium has potentialized the heat output production even in lower concentrations than the inhibitory one.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Desenvolvimento da Microcalorimetria

A medida do calor em processos químicos é bastante antiga quando comparada com várias técnicas de interesse atual na química. Certamente o calor é um dos fenômenos mais comuns da natureza percebidos pelo Homem, a explicação deste fenômeno há alguns séculos atrás se encontrava entre um dos maiores problemas apontados pelos cientistas que trabalhavam nesta área, entre os quais se encontravam, Lavoisier, Kunckel, Boerhaave e outros (1).

Sem entrar em detalhes, da busca de entendimento sobre o que diz respeito à natureza do calor, pode-se mencionar uma frase de Kelvin aplicável ao calor *"Quando você pode medir aquilo sobre o que você está falando e expressá-lo em números você conhece alguma coisa sobre ele; e quando você não pode expressá-lo em números o seu conhecimento é do tipo pobre e insatisfatório"*.

Durante longo tempo muitos pesquisadores tentaram relacionar o calor com outras propriedades mensuráveis, como as variações de massa e da temperatura. No caso das variações de massa algumas conclusões errôneas foram obtidas devido ao fato que no processo da combustão em que uma certa quantidade de calor estava envolvida também se observavam variações de massa, porém foram necessários experimentos muito cuidadosos por Kunckel em 1716, Boerhaave, 1732, Lomonosov, 1756, Lavoisier, 1774 e outros para demonstrar com uma exatidão razoável que não ocorrem variações de massa em processos térmicos que se desenvolvem em sistemas fechados (1).

A maior parte dos processos que ocorrem na natureza, sejam eles químicos, físicos, ou biológicos, são acompanhados pela liberação ou absorção de calor. As quantidades de calor estão relacionadas com a extensão do processo, e o calor envolvido num dado processo é proporcional à intensidade e à velocidade deste processo. A calorimetria devido à sua importância na termodinâmica serve como uma ferramenta analítica geral, pois apresenta um grande potencial de aplicações na química, física, e especialmente nas ciências biológicas (2).

É interessante citar que foi durante o século XVIII que se iniciou o desenvolvimento da calorimetria como ciência.

O conhecimento das variáveis dos processos que envolvem efeito térmico e dos métodos de manipulação desenvolveram-se gradualmente e o entendimento da natureza do calor se tornou mais preciso. No início do século XVIII nenhum método para a medida de calor era conhecido, já no fim deste século o calorímetro havia se tornado um instrumento de trabalho amplamente utilizado para pesquisa, de forma que durante o século XVIII e início do XIX a combustão e a natureza do calor se tornaram um dos tópicos mais estudados na química, devido ao estudo geral destes fenômenos estarem apenas iniciando.

Os mais proeminentes químicos daquele período se concentravam em maior ou menor grau nos estudos do calor e alguns deles na calorimetria experimental. Entre eles estão Boerhaave, Fahrenheit, Lomonosov, Black, Watt, Crawford, Kerwin, Cavendish, Lavoisier, Gadolin e Dalton.

Desde então a calorimetria vem contribuindo frequentemente com dados de grande importância para os químicos práticos e para o desenvolvimento da teoria das interações químicas, estes dados estão sendo medidos a uma velocidade continuamente crescente, e com grande confiabilidade para uma grande variedade de substâncias e uma ampla faixa de condições físicas.

Um dos primeiros registros da utilização da calorimetria com a finalidade de se estudar os sistemas biológicos foi por volta de 1780 quando Lavoisier e Laplace utilizando um calorímetro de gelo, figura (1), estudaram a liberação de calor por pequenos animais e correlacionaram o calor produzido com a respiração e a massa destes animais. Nestes experimentos a água formada pelo derretimento do gelo era recolhida e pesada assim que o sistema atingisse a temperatura do gelo, calculando a seguir a quantidade de calor liberada pelo processo a partir do valor do calor de fusão do gelo.

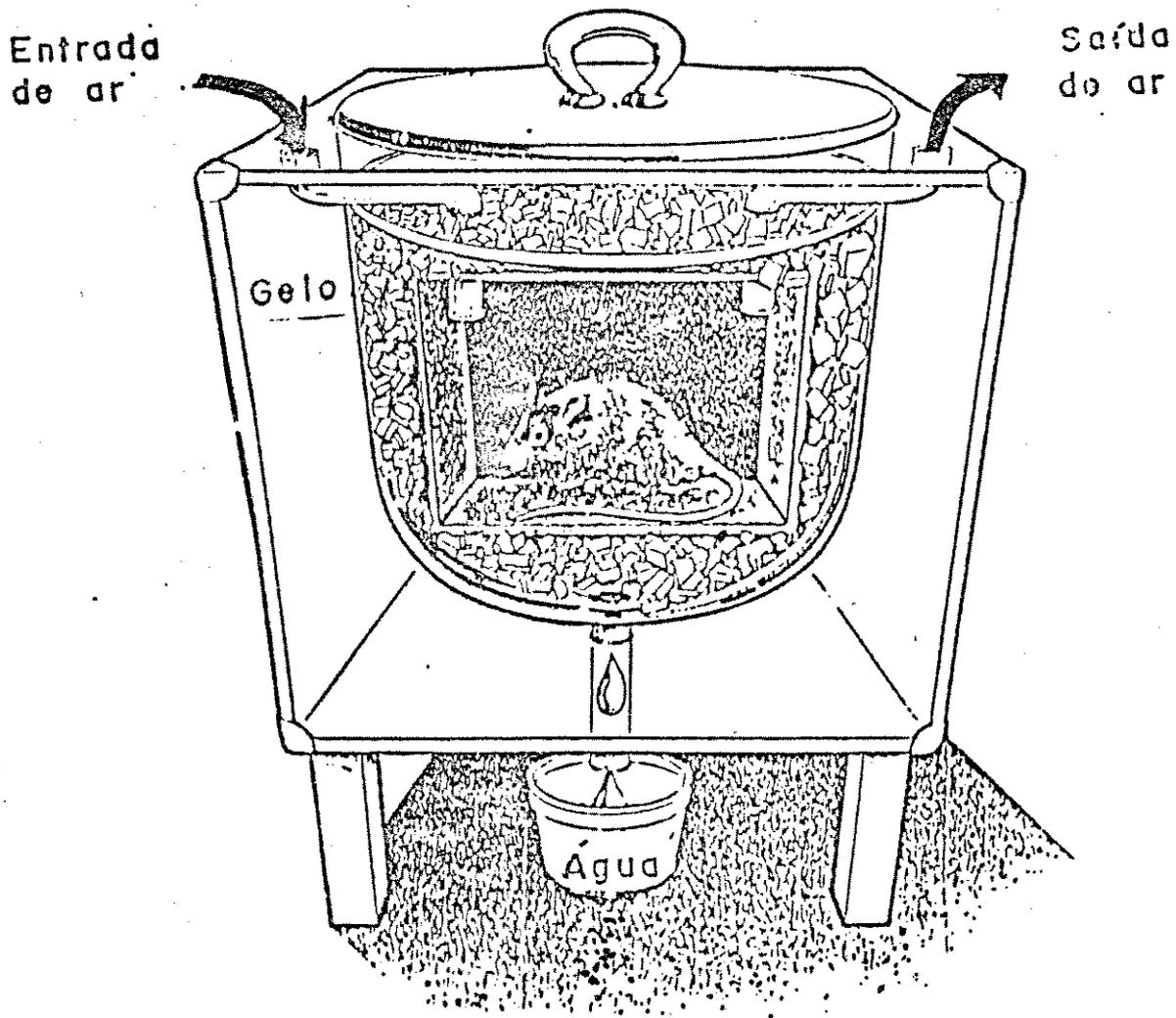


Figura 1 - Calorímetro de gelo de Lavoisier (1)

Muitos anos depois Calvet e Prat (3) estudaram o calor envolvido no crescimento de *Escherichia coli*, e obtiveram informações sobre a velocidade de crescimento das colônias de bactérias, bem como da variação do número de unidades de bactérias com o tempo. Desde então a calorimetria se desenvolvia e se formava como uma ferramenta analítica para o estudo de sistemas biológicos. O projeto de construção e as propriedades destes calorímetros, apropriados para pesquisas bioquímicas e biológicas foram revisados em (2, 4, 5, 6 e 7) , onde alguns princípios calorimétricos são discutidos, bem como a aplicação de microcalorímetros em sistemas de natureza biológica.

O uso de macrocalorímetros é indicado para trabalhos calorimétricos em solução de sistemas simples , enquanto em trabalhos em sistemas mais complicados, como os biológicos, o uso de microcalorímetros é mais adequado. Não existe uma distinção precisa entre macro e micro calorímetros , mas neste contexto o prefixo micro indica que o equipamento utilizado é de alta sensibilidade e a amostra utilizada é muito pequena. Embora os microcalorímetros estejam sendo usados para o estudo de muitos processos (medidas de calores de combustão, calores de vaporização, capacidade calorífica, etc.) o tipo de microcalorímetro que é o mais apropriado para aplicações microbiológicas e analíticas deve ser capaz de operar com reações em solução. Quando se trata de calorímetros que utilizam quantidades de reagentes muito pequenas os volumes das amostras são tipicamente da ordem de um ou alguns mililitros e a

sensibilidade é adequada para medidas da ordem de micromoles de substâncias. A sensibilidade a efeitos térmicos é usualmente da ordem de 0,1 a  $1\mu\text{W}$  e para instrumentos usados em estudos de processos lentos a estabilidade da linha de base frequentemente corresponde a ordem de  $1\ \mu\text{W}/\text{dia}$ . Em síntese as seguintes características dos microcalorímetros que são importantes para aplicações microbiológicas analíticas são: 1-sensibilidade; 2-reprodutibilidade, 3-precisão, 4-facilidade de operação, 5-segurança de operação e 6-economia no uso de materiais.

## 1.2 Classificação dos Microcalorímetros

Desde o trabalho pioneiro de Black e o de Lavoisier (1) utilizando o seu calorímetro de gelo, a evolução tecnológica dos calorímetros até a atualidade tem sido considerável. Este desenvolvimento tem sido proporcionado pela evolução de componentes e sensores eletrônicos como por exemplo o termistor (8) que permite detectar variações de temperatura da ordem de  $10^{-5}\ ^\circ\text{C}$ . Os termistores ainda apresentam muitas outras vantagens: eles são pequenos, têm baixa capacidade calorífica e respondem rapidamente à variações de temperatura. O termistor deu um grande impulso ao desenvolvimento dos microcalorímetros isoperibólicos e de isolamento adiabático (2). Calorímetros isoperibólicos possuem uma jaqueta com temperatura termostaticamente controlada. Caso o calorímetro e a jaqueta diferirem na temperatura, calor é transferido entre eles. Este escoamento de calor pode ser calculado pela lei de resfriamento de Newton e a entalpia da

reação pode ser calculada.

Em calorímetros com isolamento adiabático a temperatura da vizinhança acompanha a da cela de reação e teoricamente não há troca de calor com o meio ambiente.

Estes calorímetros não são apropriados para estudos de processos envolvendo microorganismos, porque eles dependem de medidas de variações de temperatura para sua operação e também são do tipo batelada com as suas desvantagens decorrentes.

Um tipo particular de microcalorímetro de reação é o microcalorímetro de combustão, que foi usado para determinar o calor de combustão de células de fungos e assim fazer uma tentativa para avaliar os parâmetros termodinâmicos de crescimento de microorganismos (9). Um tipo importante de calorímetros não projetados para a investigação de reações são os instrumentos utilizados para a determinação de propriedades de substâncias, como por exemplo: capacidade calorífica. Uma variedade deste tipo é o calorímetro de varredura diferencial (DSC) o qual pode ser usado para testes de identificação, pureza de compostos químicos, temperatura de transição de fase, etc. (9).

Calorímetros que operam com base na taxa de transferência de  $(dq/dt)$  calor foram desenvolvidos nos anos 40 e 50 e se mostraram adequados para o estudo de reações lentas, mas ainda requeriam grandes volumes e pequeno tempo de resposta e eram ainda do tipo batelada (10).

A capacidade atual de se estudar processos envolvendo microorganismos por calorimetria é devida ao desenvolvimento de

modernos calorímetros isotérmicos diferenciais, projetados para operar com pequenos volumes de amostras (0,1 - 1,0 ml), quantidades de reagentes da ordem de micromoles, e permitem a medida de liberação de energia muito lentas com alta precisão (0,1% num nível de 200  $\mu$ W).

O desenvolvimento de tais calorímetros ocorreu com a introdução de sensores térmicos baseados no efeito Peltier também conhecidos como termopilhas ou dispositivos termoeletrônicos. Estes componentes foram desenvolvidos durante o programa espacial russo e americano para serem utilizados como microrefrigeradores. Na área de microcalorimetria eles são utilizados como sensores térmicos e junto com os amplificadores operacionais de alto desempenho propiciaram um grande avanço na medida de efeitos térmicos muito pequenos (11). Atualmente o calorímetro isotérmico de condução de calor oferece a melhor oportunidade de sucesso para a maioria das aplicações microbiológicas. A propriedade de operar isotermicamente é importante porque os microorganismos crescem a temperatura constante e seu metabolismo é melhor entendido como uma função da temperatura.

### 1.2.1 Microcalorímetros de Condução de Calor

Microcalorímetros de fluxo de calor ou de condução de calor são atualmente o tipo de microcalorímetro mais largamente utilizado para estudos termodinâmicos e analíticos (12).

A maior parte dos microcalorímetros, figura (2), utilizados com a finalidade de estudos microbiológicos apresentam os mesmos princípios de construção (13).

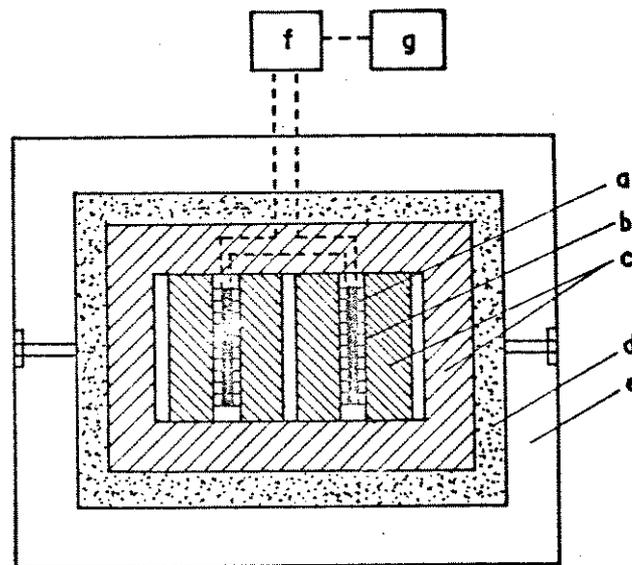


Figura 2 - Esquema de construção de um microcalorímetro (13)

a-cela de reação; b-termopilha; c-trocador de calor;

d- isolamento térmico; e- banho termostatizado;

f- amplificador g- registrador

Estes microcalorímetros são construídos baseados no princípio "twin" isto é, cada cela calorimétrica é encaixada entre duas termopilhas circundadas por pequenos blocos de alumínio ou trocador de calor. As termopilhas em cada cela calorimétrica são conectadas em série e os dois pares de termopilhas (cela amostra e cela referência) então formadas são conectadas em oposição e mantidas no interior do bloco calorimétrico com temperatura controlada. O bloco calorimétrico é

então fechado num recipiente de aço, e mantido num banho de ar ou de água. Quando as junções da termopilha são mantidas em temperaturas diferentes uma f.e.m. é produzida, e de maneira inversa quando uma corrente é aplicada numa termopilha, um conjunto de junções torna-se mais quente e o outro torna-se mais frio (Efeito Peltier) (9). O processo a ser estudado deve ser realizado em uma das celas, enquanto a outra é utilizada com um sistema não-reagente, isto é sistema de referência. Desta forma sinais não desejáveis tais como flutuações de temperatura no trocador de calor irão afetar ambas as celas na mesma intensidade, portanto se o sinal diferencial das duas celas for registrado, os distúrbios serão então cancelados. Esta é a principal vantagem dos calorímetros que utilizam o princípio "twin", que é de muita importância nos estudos que duram por longos períodos como por exemplo as fermentações industriais e o acompanhamento de alguns processos microbiológicos. Estas termopilhas são sensíveis a uma diferença de um milionésimo de graus Celsius entre a cela da amostra e o trocador de calor, esta diferença de voltagem produzida gera um sinal que é amplificado e registrado. As constantes de calibração são normalmente determinadas eletricamente, e a sensibilidade de alguns aparelhos é  $10^{-7}$  Watts e a estabilidade da linha base é  $1\mu\text{W}/\text{dia}$ . Para processos no estado estacionário a voltagem nos terminais da termopilha (mV) é diretamente proporcional à taxa de liberação de calor no calorímetro, ou seja, à potência,  $W=dq/dt$ . O calorímetro atua como um watímetro registrando a curva de voltagem versus o tempo, que é

diretamente relacionada à cinética do processo estudado ( $V=k.dq/dt$ ), cuja integração leva à  $Q=k.V.t$ , sendo então a quantidade de calor envolvida no processo proporcional à área sob a curva (13).

### 1.2.2 Classificação das Celas de Reação

As células de reação num sistema calorimétrico podem ser classificadas de acordo com o sistema de mistura utilizado: 1-batelada ("batch"); 2-fluxo; 3-ampola (13).

Nos calorímetros do tipo batelada a célula de reação tem dois compartimentos, a mistura é feita mecanicamente fazendo-se a rotação da célula de reação. Um dos compartimentos pode ser parte integrante da célula de reação ou uma microseringa que adiciona um dos reagentes.

Já os microcalorímetros com célula de fluxo podem ter células de reação do tipo flow-mix (mistura com fluxo) onde as soluções (reagentes) se encontram e são misturados dentro da célula de reação, ou do tipo flow-through (fluxo contínuo) que pode ser um tubo simples em forma de serpentina. Este tipo de célula de fluxo é adequada quando se necessita estudar processos lentos, como por exemplo crescimento anaeróbico de leveduras, em que se faz

necessário bombear o meio de cultura do fermentador para a cela calorimétrica. Neste caso a mistura pode ser descartada ou retornar para o meio reacional.

Se a mistura reacional for altamente viscosa, particulada ou sólida, de forma que não possa ser bombeada pode-se usar uma cela de reação do tipo ampola, que na sua forma mais simples consiste num tubo estático hermeticamente selado, podendo na sua forma mais complexa também ser incorporadas agitação e aeração. Os vários projetos de celas de reação para estudos de liberação de calor por culturas microbianas foram discutidos por Beezer, Perry, Chowdhry e colaboradores, e Wadsö, (6, 14, 15, 16).

### 1.3 Aplicação da Microcalorimetria em Sistemas Biológicos

A liberação de calor em experimentos biológicos, celulares e bioquímicos é frequentemente pequena, o que torna a microcalorimetria devido à sua sensibilidade uma ferramenta analítica bastante apropriada para o estudo destes fenômenos.

A microcalorimetria é uma técnica analítica não específica e não destrutiva para a caracterização e acompanhamento em tempo real de processos e progressos de crescimento e morte de microorganismos.

A importância do calor como uma maneira de monitorar em tempo real e possivelmente controlar processos fermentativos é

refletida no aumento crescente de publicações na área (7, 17, 18, 19, 20).

Os dados da literatura têm mostrado que a taxa de produção de calor em processos fermentativos e de crescimento de microorganismos pode ser útil de diversas maneiras tanto na pesquisa acadêmica como na industrial.

Nos últimos anos, o desenvolvimento e otimização dos métodos de controle e suas aplicações nos processos fermentativos, têm acarretado um crescente aumento no número de instalações altamente instrumentadas tanto a nível piloto como a nível industrial. O uso de computadores na indústria de fermentação é relativamente recente, sendo as primeiras descrições de fermentações controladas por computador datadas de 17 anos atrás (13).

Um dos problemas principais da aplicação de técnicas computacionais ao estudo da fermentação tem sido a dificuldade de se controlar adequadamente concentrações de substrato, massa celular e produtos intra e extra celulares (13).

A microcalorimetria de fluxo se apresenta como uma técnica geral e não específica, fato este que representa uma limitação para muitos tipos de problemas analíticos. Entretanto em bioquímica e biologia a especificidade inerente aos sistemas de reação permite o uso de um método analítico não específico com a perspectiva de obtenção de resultados reprodutíveis e com boa precisão.

Deve também ser lembrado que a utilização de um método não específico mostra-se vantajoso na investigação de todas as espécies de processos, e em particular para aqueles muito complexos, como por exemplo em sistemas fisiológicos pois permite a detecção do processo como um todo, uma vez que o isolamento dos vários processos individuais é bastante difícil e demorado.

Com a utilização da microcalorimetria os processos biológicos contínuos podem ser estudados com a vantagem adicional de não haver perturbação do sistema pela adição de reagentes, retirada de alíquotas ou por imposição de radiação.

Por meio desta técnica o calor produzido por todos os eventos metabólicos que ocorrem num meio de cultura podem ser registrados continuamente sem perturbar o processo e em tempo real, obtendo-se assim o registro gráfico da liberação de calor no meio reacional através da curva  $dq/dt$   $\mu W$  em função do tempo (seg), chamada curva p-t (potência - tempo) (IUPAC-IUPAB-IUB, Interunion Commission on Biothermodynamics, 1982) (21) é usada para determinar *in situ* a medida da atividade biológica de compostos, ou associação de compostos, bem como o crescimento e atividade de fungos, biomassas, testes do potencial de antibióticos, variação da entalpia de transferência de fase em sistemas de solventes modelos e em microorganismos e efeito hidrofóbico (22).

Os primeiros experimentos calorimétricos em microorganismos visando medir o calor da fermentação foram feitos em enormes tonéis de cerveja, em 1856 por Dubrunfaunt (16).

São muitas as aplicações da microcalorimetria de fluxo em sistemas biológicos registradas até o momento e algumas revisões relativas a este assunto são encontrados em literatura (6, 7, 16).

Perry e colaboradores, (23, 24) fizeram estudos sobre a microcalorimetria do crescimento da *Saccharomyces cerevisiae* em diferentes condições, tais como: inóculo, concentração de glicose, e também utilizando meios complexos como melaço estocado em diversas temperaturas.

Nanomura, (17), estudou o metabolismo aeróbico da *S.cerevisiae* e da *S.carlsbergensis* microcalorimetricamente, variando as condições do inóculo, a concentração de glicose e a temperatura utilizando a glicose como fontes de energia e carbono.

Recentemente a microcalorimetria foi utilizada para estudos termocinéticos do metabolismo bacteriano, Chang-Li e colaboradores, (18) estudaram a cinética do metabolismo da *E.coli* utilizando um microcalorímetro de fluxo LKB-2277 e obtiveram várias equações termocinéticas para os diversos tipos de metabolismo desta bactéria. Kurvits, estudou a cinética de reações enzimáticas, utilizando este mesmo tipo de microcalorímetro. Dentre elas pode-se destacar a hidrólise da sacarose pela invertase, (25).

A utilização da microcalorimetria de fluxo no monitoramento da atividade biológica em tratamento de esgotos, representa um grande desenvolvimento das aplicações industriais desta técnica realizado por Jolicœur, (26).

Uma aplicação bastante difundida desta técnica é a avaliação da atividade biológica de compostos antibióticos e antimicóticos bem como desinfetantes e bactericidas. Beezer e Wadsö (6, 16, 27) desenvolveram um procedimento calorimétrico que permite testar muitos antibióticos com a vantagem de ser muito mais rápido que o tradicional método de difusão em placas de agar-agar. Hartung, (28, 29) estudou o efeito de três antibióticos, Penicilina G, Oxytetraciclina e Polymyxina B em culturas de *E. coli* e também utilizou a microcalorimetria para fazer a distinção entre antibióticos e desinfetantes para um largo espectro de compostos (28,29). Num trabalho recente, Beezer (27) fez um estudo de QSAR (relação entre a atividade biológica e a estrutura química) estudando o efeito de alguns antibióticos tais como a Candicidina, a Anfotericina B, a Nistatina e outros em culturas de *S. cerevisiae* obtendo as concentrações inibitórias mínimas (MIC) para estes agentes biocidas, alguns resultados por ele obtidos estão na figura (3).

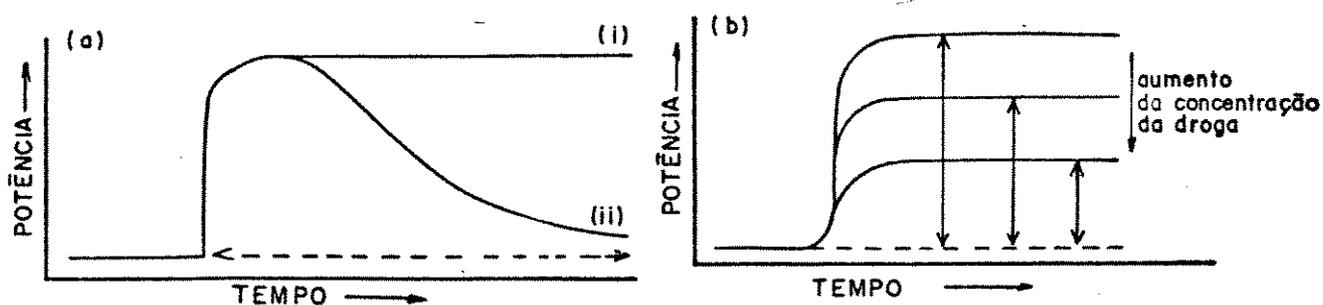


Figura 3 - Avaliação da atividade de antibióticos por microcalorimetria (27)

- (a) i- curva p-t de crescimento de *S. cerevisiae*;  
 ii- Resposta desta levedura à antibióticos.  
 (b) Curvas p-t, para várias concentrações de antibióticos.

Pode-se observar que a altura (intensidade) da curva p-t decresce com o aumento da concentração do antibiótico e concluir que a microcalorimetria é uma técnica adequada para a avaliação da ação de biocidas, porém faz-se necessário um controle rigoroso das condições experimentais.

#### 1.4 Leveduras - Fisiologia e Bioquímica

As leveduras pertencem ao grupo dos organismos eucarióticos mais simples, sendo predominantemente unicelulares e se reproduzem vegetativamente. Estes organismos sempre atraíram o interesse de cientistas como um sistema modelo para o estudo de graus mais elevados de evolução e de propriedades gerais do metabolismo e crescimento de plantas e animais (6). Mas ao mesmo tempo, elas são de grande importância como fator essencial na produção de pães, cerveja, vinho e etanol bem como uma excelente fonte de proteínas e gorduras com uma alta concentração de vitaminas e sais minerais (16).

As leveduras possuem a capacidade de crescimento em quantidades inexpressivas de fonte de carbono, como por exemplo resíduos de bebidas alcoólicas, abrindo assim, uma nova dimensão no duelo da humanidade contra a fome e a desnutrição.

Economicamente as leveduras estão entre os mais importantes microorganismos explorados pelo Homem. As suas maiores aplicações comerciais se encontram na panificação, como suplemento alimentar humano e animal, e na produção de etanol tanto para bebidas alcoólicas como para fins sintéticos. No Brasil, a

produção de etanol assume grandes proporções face sua utilização como combustível por parte substancial da frota nacional de veículos. Esta levedura também tem sido extensivamente utilizada no estudo da genética, crescimento e bioquímica das células eucarióticas (6).

As fontes de carbono e energia utilizadas variam de acordo com a espécie da levedura, sendo de muita importância na classificação e identificação destes microorganismos. Anaerobicamente a *Saccharomyces cerevisiae* é capaz de utilizar glicose, frutose, manose, galactose, sacarose e maltose. Aerobicamente estas células podem utilizar adicionalmente fontes relativamente simples de carbono, como por exemplo ácidos oxaloacéticos e  $\alpha$ -citoglutáricos. Os substratos usados por outras leveduras incluem polissacarídeos, polióis e hidrocarbonetos (6).

Os fatores de crescimento por ela exigidos são diversos, as suas necessidades mais comuns são por biotina, ácido pantotênico, inositol, tiamina, ácido nicotínico e piridoxina. Adicionalmente, sob condições anaeróbicas as leveduras necessitam de uma fonte de esterol.

Todas as leveduras são capazes de utilizar íons amônio como fonte de nitrogênio e algumas delas ainda podem utilizar nitrato.

O efeito de parâmetros físicos (temperatura, agitação, pH e atividade da água) no crescimento e metabolismo das leveduras tem sido bastante estudado (30). A temperatura mínima de crescimento de muitas cepas de levedura é cerca de 0°C, embora

cepas obrigatoriamente psicrofílicas são capazes de crescer a temperaturas tão baixas como  $-7^{\circ}\text{C}$ . Com exceção destas cepas a temperatura máxima para o crescimento está entre  $30$  e  $47^{\circ}\text{C}$ , entretanto o rendimento celular e a formação de produtos geralmente não são maiores na temperatura máxima de crescimento. Muitas leveduras crescem melhor em pH ácidos sendo que o pH ótimo para o crescimento da *S. cerevisiae* é cerca de 4,5.

#### 1.4.1 Níveis do Metabolismo das Leveduras

Numa ótica termodinâmica um microorganismo pode atingir três níveis diferentes de atividade metabólica, cada um correspondendo a um estado estacionário. Estes diferentes níveis de metabolismo foram estudados microcalorimetricamente por Chang-Li e colaboradores (18) e podem ser descritos por parâmetros que são independentes do tempo ou variam muito lentamente quando comparados a outras constantes de tempo de reações bioquímicas.

O primeiro nível corresponde à mais baixa atividade metabólica e é devido ao metabolismo endógeno da célula. Tal metabolismo é definido como todas as reações metabólicas que ocorrem no interior da célula viva quando ela é mantida na ausência de compostos ou elementos que podem servir como substratos exógenos. Nesta situação o organismo é exclusivamente limitado à sua própria reserva de nutrientes, principalmente o glicogênio no caso das leveduras.

O segundo nível de metabolismo é o de manutenção. Enquanto o metabolismo endógeno é limitado pelo tempo devido ao esgotamento das substâncias de reserva e é seguido pela morte da célula, o metabolismo de manutenção mantém a célula viva por períodos tão longos quanto o substrato exógeno for disponível. A manutenção nas leveduras pode ser tanto aeróbica quanto anaeróbica dependendo das condições externas. Como não ocorre nenhum crescimento nesta situação, a energia externa e as fontes de carbono, glicose no caso, são usadas somente para o suprimento energético da célula. Esta energia é consumida em diferentes processos que mantêm a célula viva; ressíntese de macromoléculas, (RNA, proteínas, polissacarídeos e materiais da parede celular), regulação do valor de pH, pressão osmótica no citoplasma e transporte ativo dentro da célula (16).

O terceiro nível de metabolismo corresponde ao crescimento. Neste estado são necessárias fontes de energia externa, bem como traços de elementos e vitaminas. Muito frequentemente a fonte de carbono e de energia é a mesma, por exemplo a glicose para a *S. cerevisiae* mas também são possíveis substratos uma grande variedade de outros carboidratos, hidrocarbonetos, aminoácidos ou misturas pouco definidas como o melão. A intensidade de crescimento é determinada por parâmetros externos principalmente: tipo e concentração dos substratos e metabólitos, valores de pH, aeração, agitação, temperatura e concentração de células.

#### 1.4.2 Fases do Metabolismo das Leveduras

O crescimento típico de uma cultura microbiana é indicado por uma relação sigmoideal entre o fator de crescimento (número de células, volume de cultura, peso seco, turbidez, produção de calor ou metabólito) e o tempo, e pode ser dividido em cinco períodos distintos (16).

1) A fase "lag" ou de adaptação, quando as células são transferidas para um meio recém preparado. Durante este período não ocorre nenhum crescimento e as células estão produzindo as quantidades necessárias de enzimas para o catabolismo.

2) A fase de aceleração onde se inicia o crescimento, porém este não obedece a uma lei exponencial.

3) A fase "log" ou exponencial, onde o aumento no número de células é exponencialmente dependente do tempo, ou através de uma transformação matemática o logaritmo do número de células é função linear do tempo.

4) A fase de retardação onde uma baixa concentração de substrato ou alta concentração de metabólitos limitam a velocidade de crescimento.

5) A fase estacionária onde parâmetros externos inibem crescimentos futuros. Isto pode-se dar devido a diminuição na quantidade de substrato ou variações de pH do meio de cultura ou a condições não favoráveis de concentração de metabólito.

Na última fase as células estão completamente vivas mas como as fontes de energia já foram esgotadas elas têm que utilizar o metabolismo endógeno que é limitado pelo tempo. Portanto

frequentemente se inclui uma sexta fase, a fase da morte lenta.

Todas estas fases são prontamente reconhecidas num termograma  $dq/dt(\mu W) \times t(\text{seg})$ , que pode ser obtido por microcalorimetria de fluxo, e visualizadas na figura (4).

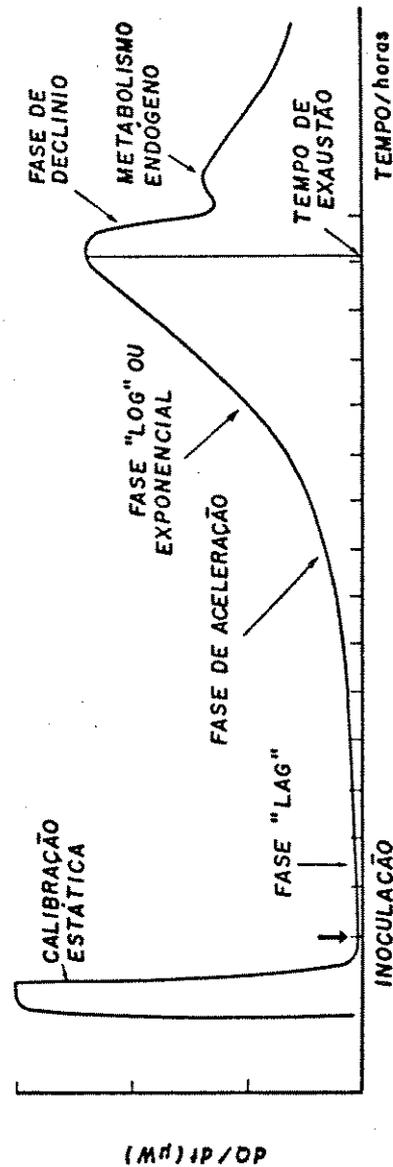


Figura 4 - Exemplo de um termograma do metabolismo da levedura nas condições experimentais padrão

Somente a fase exponencial de crescimento corresponde a um estado estacionário termodinâmico, com valores específicos constantes, como o aumento do número ou peso das células, taxa de produção de calor ou taxa de catabolismo. As outras partes numa curva de crescimento são períodos de transição de um estado estacionário com uma rápida alteração de parâmetros. Quando a cultura microbiana tem seu crescimento limitado, não pela fonte de energia mas pelas fontes de fosfato ou nitrogênio o estado estacionário de crescimento é trocado pelo estado estacionário de manutenção e quando a fonte limitante é extinta este é trocado pelo estado estacionário do metabolismo endógeno depois da extinção da fonte de energia.

Desta forma as questões interessantes de transição de fase na termodinâmica de processos irreversíveis podem ser prontamente estudados em culturas microbianas.

O catabolismo da levedura pode se dar na ausência ou na presença de oxigênio livre, mas esta propriedade pode variar bastante nos diferentes tipos de leveduras.

Quando o catabolismo ocorre em condições anaeróbicas é chamado de fermentação e quando ocorre em condições aeróbicas é chamado de respiração cujas equações são:

para a fermentação



e para a respiração



Estas duas equações demonstram a grande vantagem energética da respiração sobre a fermentação e indica que o metabolismo endógeno deveria ser aeróbico do ponto de vista de economia de energia livre.

Pasteur sugeriu que a fermentação seria a vida sem ar, isto é, o suprimento de energia livre sem o envolvimento de oxigênio. A energia livre que acompanha o metabolismo de 1 mol de glicose é somente -253 kJ para condições anaeróbicas, comparado com -287 kJ sob condições aeróbicas.

Na figura (5) estão sumarizadas as principais etapas do catabolismo aneróbico da glicose, onde a partir de 1 mol de glicose são formados 2 moles de etanol. Pode-se observar que este é um processo favorecido energeticamente com um  $\Delta G$  de -175 KJ por mol de glicose (31).

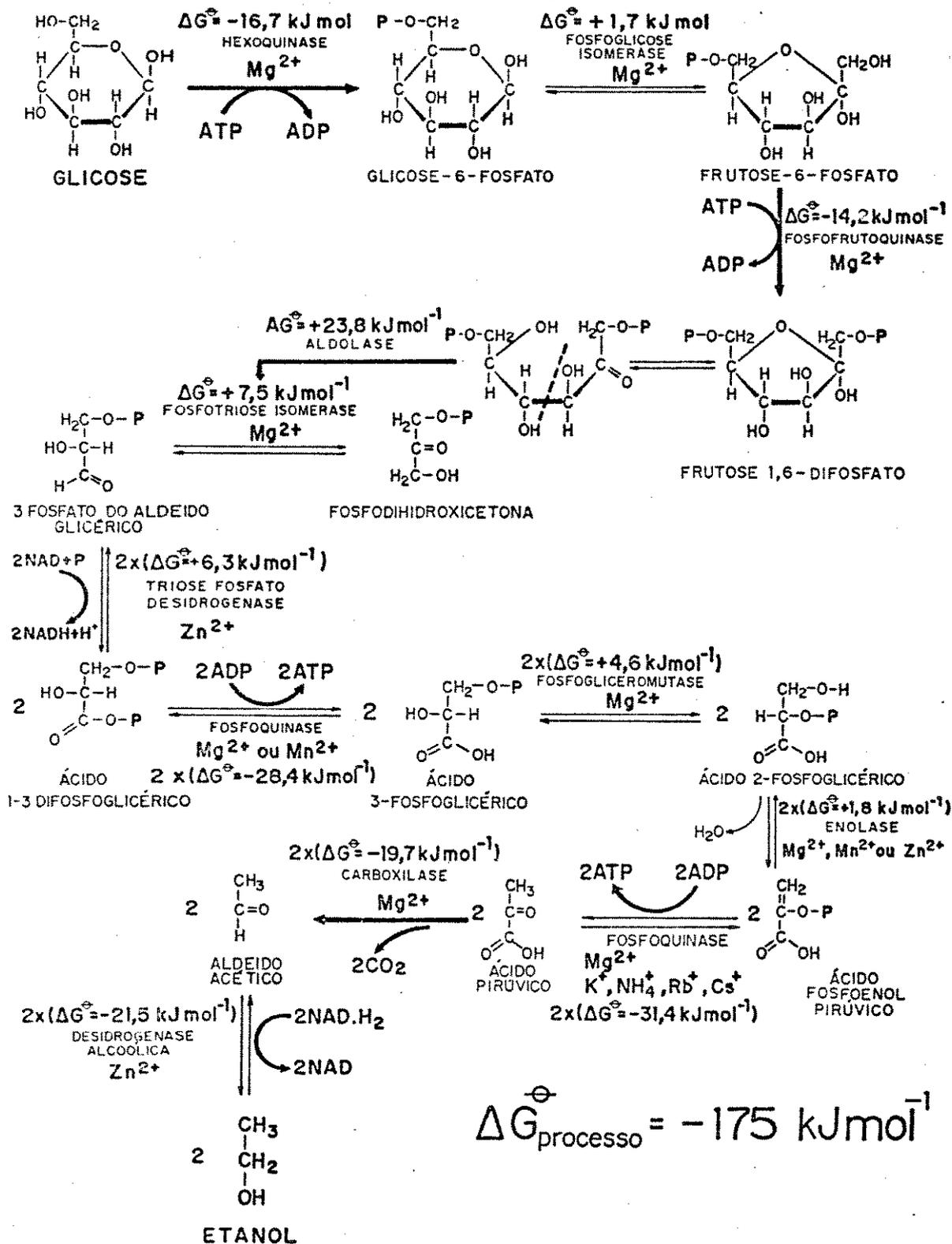


Figura 5 - Esquema da via metabólica anaeróbica (31)

### 1.5 Objetivos

Um dos objetivos deste trabalho foi a padronização das condições experimentais (meio de cultura, inóculo, temperatura e sensibilidade do aparelho) para que se pudesse fazer um estudo sistemático da fermentação da glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* utilizando-se para isto um microcalorímetro de fluxo LKB-2277 TAM - Monitor da Atividade Biológica. Uma vez estabelecidas as condições experimentais, fez-se um estudo do efeito da variação de alguns parâmetros: concentração de glicose, pH do meio, e também estudou-se o efeito da adição de alguns íons metálicos, cobre, mercúrio, ferro, cádmio e zinco. A partir do estudo dos termogramas obtidos mediu-se o tempo de exaustão e a área sob a curva, o que nos permitiu obter as seguintes curvas  $t_{ex} \times [glicose]$ ,  $t_{ex} \times pH$  e as curvas  $\log Q \times t$ . A medida de  $dQ/dt$  medida pela área ( $cm^2$ ) sob a curva representa o calor liberado em Joules neste tempo  $t$  e um gráfico de  $\log Q \times t$  fornece a taxa de liberação de calor do processo estudado em função do tempo.

## 2. PARTE EXPERIMENTAL

### 2.1 Preparação da Cultura de *Saccharomyces cerevisiae*

A cultura de *Saccharomyces cerevisiae* foi preparada na Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia.

Todos os meios de cultura e os materiais utilizados para o preparo da cultura de leveduras foram esterelizados em autoclave a 121°C e 2 atm por 30 minutos e a manipulação do meio em todas as etapas foi feita em atmosfera estéril (capela com luz ultra-violeta).

A cultura de *Saccharomyces cerevisiae* (FTPT 754) da coleção de culturas da Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia (trabalho em colaboração) que se encontrava liofilizada em ampolas de vidro foi reativada, transferindo-se o inóculo nela contido para um tubo de ensaio que continha meio de cultura GYP (g/l); glicose 4,0; peptona 5,0 ; extrato de leveduras 2,0. Procedeu-se então a incubação numa estufa por 30°C e 24 h.

Fez-se uma repicagem, ou seja, uma nova inoculação da cultura contida no tubo de ensaio num erlenmeyer contendo 100 ml do meio GYP e incubou-se por 24 h a 30°C, posteriormente fez-se uma nova repicagem transferindo-se a cultura contida no erlenmeyer para um fermentador que continha 1,5 litros do meio YM (g/l), glicose, 100 ; peptona, 5,0; extrato de malte, 3,0; extrato de leveduras, 3,0; e incubou-se por 24 h à 30°C em atmosfera

aeróbica, com agitação magnética.

As células foram então separadas e suspensas em solução salina de Ringer (g/l), NaCl, 9,0 ; KCl, 0,42; CaCl<sub>2</sub>, 0,48; NaHCO<sub>3</sub>, 0,2. Em seguida foram centrifugadas à 4000 rpm, a lavagem e a centrifugação foram repetidas por 3 vezes. Obteve-se um "creme" de leveduras ao qual se adicionou 200 ml de solução de Ringer com 10% de dimetil sulfóxido (DMSO).

O DMSO adicionado apresenta a propriedade de agir como agente anti-congelante, ou seja, ele impede a formação de gelo no interior da célula e desta forma, evita que haja rompimento da membrana celular (32).

A contagem viável desta suspensão de leveduras foi feita em placas de Petri, utilizando como meio de cultura o PCA da Merck, fez-se a inoculação da suspensão em placas nas seguintes diluições:  $10^{-3}M$ ,  $10^{-4}M$ ,  $10^{-5}M$ ,  $10^{-6}M$ ,  $10^{-7}M$ ,  $10^{-8}M$ ,  $10^{-9}M$  e incubou-se a 30°C por 24 h, procedendo-se então a contagem viável a olho nu, visualizando as colônias formadas, o valor encontrado foi de  $2 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias em um mililitro (ufc/ml, ou seja  $2 \times 10^8$  células viáveis de *Saccharomyces cerevisiae*/ml).

## 2.2 Congelamento ("Freezing") da Suspensão de Leveduras

A suspensão de células foi acondicionada em canudinhos de polipropileno (canudinhos de refrigerantes) com 3cm de comprimento, e selados com auxílio de uma pinça na chama de um bico de bunsen, conforme o descrito em (32).

Em cada canudinho foram colocados 250 $\mu$ l da suspensão de leveduras utilizando-se uma micropipeta, depois de devidamente lacrados, colocou-se quatro canudinhos em cada ampola criogênica de polipropileno (12x35mm, Sterilin Ltda.), previamente esterelizadas. Estas ampolas foram encaixadas nos furos de uma placa de isopor, a uma distância de 5cm na superfície do nitrogênio líquido contido num recipiente de alumínio até que atingissem a temperatura de -90°C, usando uma modificação da técnica descrita em (33), e então resfriadas rapidamente a -196°C mergulhando-as em nitrogênio líquido.

O primeiro resfriamento foi acompanhado por um termômetro de álcool (-120°C até -30°C) colocado numa ampola de polipropileno.

Após o "freezing" fez-se uma nova contagem viável para a qual se obteve o valor de 5x10<sup>7</sup>ufc/ml.

### 2.3 Definição do Meio Calorimétrico

Uma etapa importante deste trabalho de tese foi a padronização do meio de cultura utilizado.

Vários experimentos calorimétricos foram realizados utilizando-se meios de cultura com diferentes composições. Inicialmente fez-se alguns testes nos quais não se utilizou meio de cultura tamponado, porém os termogramas obtidos não apresentavam boa reprodutibilidade, eram bastante indefinidos e o processo metabólico era extremamente longo, durava cerca de 36h.

Fazendo-se medidas do pH do meio, utilizando-se um

pHmetro (Micronal B731), constatou-se que havia uma variação de pH inicial 5,4 até um valor de pH final de 3,1, do início até o fim do processo metabólico, ou seja, havia um aumento de mais de duas unidades de pH, o que representa um aumento de cem vezes na concentração de  $H^+$  do meio de cultura.

Definimos então o que neste trabalho de pesquisa foi chamado de meio de cultura padrão tamponado em pH 5,0 que apresentava a seguinte composição.

Tabela 1 - Composição do meio de cultura

COMPOSTO	FÓRMULA	MARCA UTILIZADA	CONCENTRAÇÃO (g/l)
fosfato ácido de sódio	$NaHPO_4$	Vetec-PA	4,000
sulfato de magnésio	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	Vetec-PA	1,000
cloreto de cálcio	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	Cinética Química-PA	0,168
citrate trisódico	$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$	Vetec-PA	19,2
ácido cítrico	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Ecibra-PA	7,350
extrato de leveduras	---	Difico-PA	1,000
glicose	$C_6H_{12}O_6$	Reagen-PA	4,000
riboflavina	---	BDH-PA	0,005

VOLUME FINAL DO MEIO DE CULTURA - 50ml

Todas as soluções foram preparadas utilizando-se água bidestilada, previamente deaerada. Os componentes do meio de cultura foram pesados em pesa-filtro esterelizados e o mais próximo possível do momento da inoculação para que a contaminação por microorganismos indesejáveis fosse mínima de forma a ser desprezada. A riboflavina foi adicionada na forma de solução (0,1ml de uma solução 0,5g/l).

#### 2.4 Equipamento Utilizado

Utilizou-se um microcalorímetro de fluxo LKB-2277-TAM - Thermal Activity Monitor, com volume de residência de 0,5ml, a temperatura de seu banho de água interno foi mantido a 33°C, num ambiente termostaticado a  $25 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , o meio de cultura foi bombeado a uma velocidade de 41ml/h com o auxílio de uma bomba peristáltica LKB-2132. Utilizou-se o sistema de calibração estática para uma sensibilidade de  $300\mu\text{W}$  no registro do termograma, este tipo de calibração permite que o papel do registrador fique calibrado diretamente na potência de uso, no caso  $300\mu\text{W}$ .

O sistema de detecção é constituído por termopilhas, figura (6), que detectam pequenas variações na temperatura do meio de cultura,  $10^{-6}^{\circ}\text{C}$  (12).

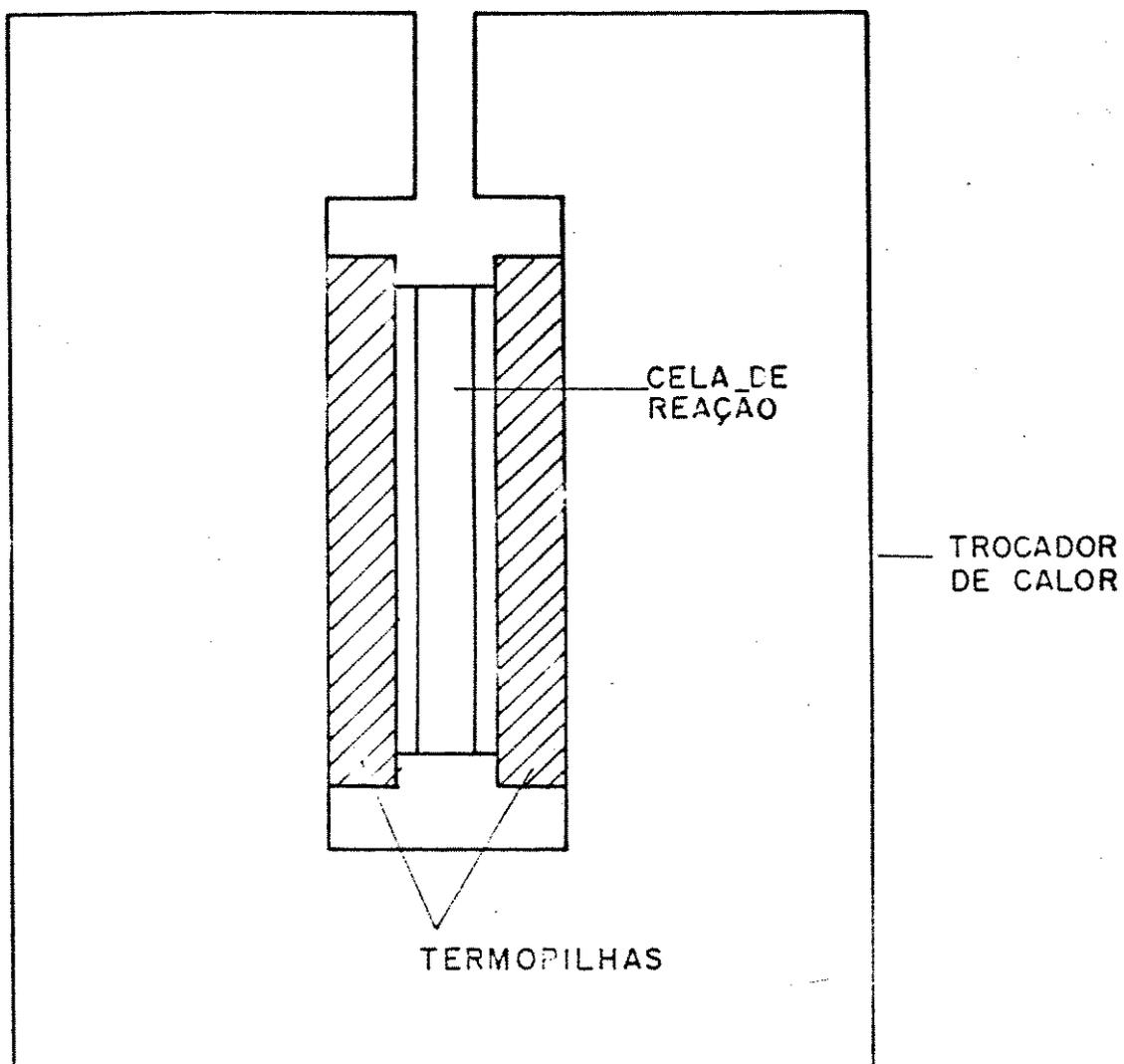


Figura 6 - Esquema da termopilha

Esta detecção é feita continuamente de modo que o equilíbrio térmico no fermentador não seja perturbado.

Como o sistema calorimétrico não pode ser esterelizado

pelos métodos convencionais faz-se uma descontaminação após cada experimento bombeando a um fluxo de 41ml/h por 30 minutos no sistema de fluxo as seguintes soluções nesta sequência: NaOH 0,1M; HCl 0,1M; H<sub>2</sub>O bidest.; Genapol 0,1M; H<sub>2</sub>O bidest.; etanol; H<sub>2</sub>O bidest.; metanol; H<sub>2</sub>O decaerada. Com este procedimento de lavagem garante-se a desinfecção do sistema, removendo as células de leveduras que porventura se tenham depositado na cela de reação, também se obtém um aumento na molhabilidade da superfície do teflon, evitando-se assim a formação de bolhas que poderiam vir a prejudicar os resultados obtidos.

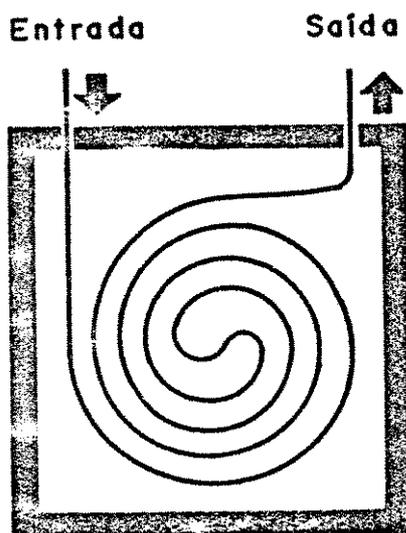
Utilizou-se o sistema esquematizado na figura (8), onde num microfermentador de volume aproximadamente 75ml, adiciona-se 50ml do meio definido, acopla-se então um sistema de borbulhamento de nitrogênio livre de oxigênio, com uma entrada para a adição do inóculo e/ou retirada de amostras. Conectou-se ao microfermentador um condensador de refluxo para se garantir que durante o experimento fosse mantido o volume do meio constante. O fermentador foi então selado com filme polimérico (magipack).

O microfermentador foi mantido sob agitação magnética constante dentro de uma jaqueta com circulação de água termostaticamente controlada, na temperatura de  $33 \pm 1^{\circ}\text{C}$ .

O fermentador, a barra magnética de teflon e o condensador foram previamente lavados com etanol e esterelizados em estufa a  $110^{\circ}\text{C}$  por 1h.

A cela de reação do microcalorímetro utilizado é do tipo "flow-trough", ou seja fluxo contínuo que consiste num tubo

capilar de ouro montado de forma espiral e encaixado entre duas placas de cobre de forma que haja um excelente contato térmico com as termopilhas, figura (7).



Fligura 7 - Esquema da cela de fluxo (13)

O meio de cultura ao entrar no microcalorímetro passa por uma nova termostatização mais precisa pois há um intervalo de aproximadamente 5 minutos entre o meio de cultura sair do fermentador e entrar na cela de fluxo, e possíveis variações de temperatura deste trajeto não termostatizado certamente acarretariam erros na medida experimental.

Quando o meio de cultura sai da cela de fluxo retorna novamente para o fermentador de forma cíclica sem que haja perturbação do processo.

## 2.5 Inoculação

Depois do sistema devidamente montado figura (8) e o

meio de cultura colocado no fermentador, inicia-se então o bombeamento deste meio pela cela de fluxo do microcalorímetro por 30 minutos a um fluxo de 41ml/h com a finalidade de se obter uma termostatização mais precisa e uma linha de base estável no registro do termograma.

A ampola de polipropileno contendo o meio de cultura foi então retirada do cilindro criogênico e descongelada num banho a 33°C por dois minutos, adicionou-se 0,2ml do inóculo nela contido ao meio de cultura.

Como há um hiato temporal de cinco minutos até que o meio inoculado atinja a cela de fluxo do microcalorímetro inicia-se o registro da curva potência-tempo (termograma) somente quando decorrido este intervalo de tempo após a inoculação.

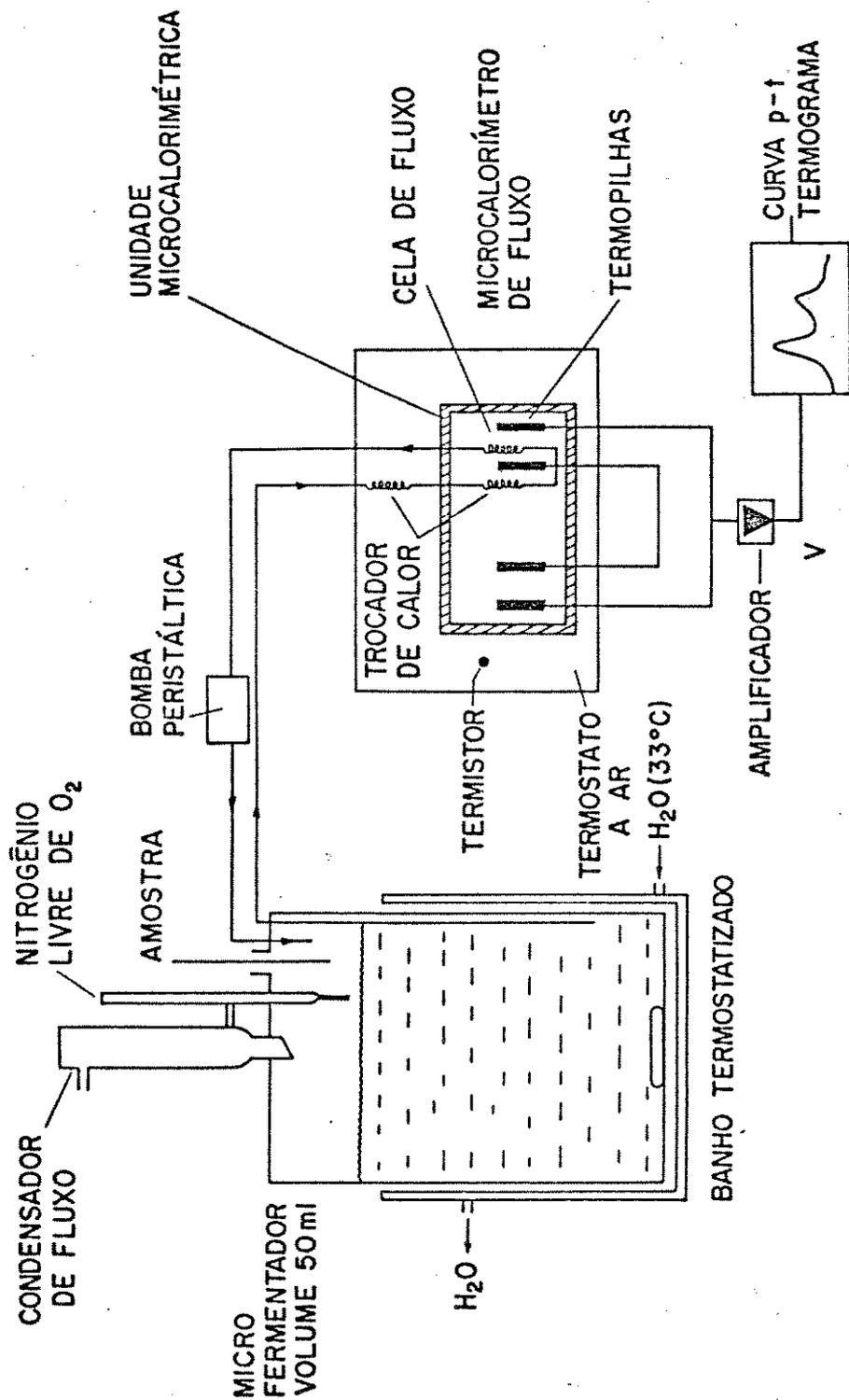


Figura 8 - Esquema mostrando o arranjo experimental microcalorímetro e microfermentador

## 2.6 Análise dos Termogramas

Utilizando-se o que foi definido como meio padrão, obteve-se o termograma controle, figura (4), nas condições experimentais já descritas e rigorosamente controladas. Todos os termogramas obtidos neste trabalho apresentam o mesmo perfil. O registro de todos os termogramas não foi colocado nesta tese pois optamos por representá-los na forma de gráficos. Para analisar um termograma procedeu-se da seguinte forma:

1- Dividiu-se o termograma de hora em hora a partir do ponto da inoculação até o final da fase exponencial (tempo de exaustão) e início do declínio da curva.

2- Utilizando-se um planímetro (Zeiss) fez-se a medida de área sob a curva (energia = calor produzido) de hora em hora (em  $\text{cm}^2$ ).

3- Fez-se gráficos de tempo de exaustão em função da variável estudada.

4- Fez-se gráficos a partir dos valores do logaritmo da área medida (calor produzido) em função do tempo.

A área sob a curva p-t é a integral

$$\int_{t_1}^{t_2} \frac{dq}{dt} dt = Ri^2 t = \Omega \times \text{Amp}^2 \times \text{Seg} = \text{Joules}$$

$t_1 = 0$  - tempo de inoculação

Se a medida da área sob a curva, for feita num intervalo de tempo qualquer, o valor obtido é numericamente igual ao calor liberado no processo (em Joules) neste intervalo de tempo.

Observou-se que somente a partir do início da fase exponencial se obtinha reprodutibilidade na reta obtida de  $\log Q$

em função de  $t$ , mesmo porque no intervalo de uma hora as áreas eram difíceis de se medir nesta região inicial, foi então estabelecido que só seriam utilizados os valores de área a partir do início da fase exponencial devido à imprecisão nas medidas e à grande falta de reprodutibilidade nos valores obtidos a partir de medidas desta região. Além disto, como já foi comentado anteriormente, a fase exponencial de produção de calor corresponde a um estado estacionário termodinâmico com valores específicos constantes como aumento dos produtos, aumento da taxa de produção de calor, etc.

O final da fase exponencial que é quando o metabólito se esgota (16) (no nosso caso a glicose) é denominado de tempo de exaustão,  $t_{ex}$ , e é um dado importante de ser observado quando se analisa um termograma do tipo do da figura (4).

Todos os termogramas obtidos neste trabalho foram sempre comparados com o obtido utilizando-se o meio definido que recebeu o nome de controle.

Pode-se estudar o comportamento das curvas  $p-t$  mediante a variação de alguns parâmetros do meio de cultura. Para que este estudo fosse possível utilizou-se para comparação o meio definido e as condições experimentais padrão, e alterou-se apenas o parâmetro estudado. Mesmo quando da adição de algum outro elemento estranho ao meio definido o volume final do meio de cultura foi fixado sempre em 50ml.

## 2.7 Efeito da Variação da Concentração de Glicose

A *Saccharomyces cerevisiae* é um tipo de levedura bastante resistente e capaz de adaptar seu metabolismo a diversas condições (32). Em escala industrial ela é utilizada para diversos fins (panificação, cerveja, vinho, álcool, etc.), sendo que em cada um deles ela é submetida a diferentes condições. Na indústria alcooeira o mosto da cana pode se apresentar com diferentes concentrações de açúcar, dependendo do solo onde a cana foi plantada, da quantidade de chuva, da presença ou não de irrigação, da variedade da espécie, por isto é importante se estudar o comportamento desta levedura em diferentes concentrações de glicose e observar o quanto é afetada a velocidade e a intensidade do processo.

Fez-se as medidas utilizando-se o mesmo procedimento já descrito apenas variando-se a concentração de glicose do meio de cultura. Utilizou-se as seguintes massas de glicose (g/l): 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0. A partir das medidas da  $t_{ex}$  e dos termogramas  $dq/dt \times t$  obtidos nestes experimentos construiu-se os gráficos das figuras (12) e (13) respectivamente.

## 2.8 Efeito da Variação do pH do Meio

O pH do meio de cultura é um fator importante quando se tem em mente o estudo do crescimento microbiano. As células de *Saccharomyces cerevisiae* se desenvolvem numa ampla faixa de valores de pH, porém a velocidade de produção de calor e a

quantidade de calor produzida são bastante influenciadas pelo valor do pH do meio. Este efeito foi estudado numa faixa de pH de 2,1 até 7,0. A escolha desta região de trabalho se deu porque em valores de pH menores que 2,1 não havia nenhuma resposta no registrador, ou seja o crescimento era totalmente inibido devido à grande acidez do meio, e em valores de pH maiores que 7,0 havia a formação de um precipitado no meio de cultura, que era de cor azul e de aparência floculenta, provavelmente devido à precipitação de sais do meio aderidos na superfície da levedura.

A partir das diferentes soluções tampão preparou-se diferentes meios com diferentes valores de pH, utilizou-se o meio definido exceto o ácido cítrico e o citrato de sódio em um balão volumétrico de 50ml utilizando a solução tampão como solvente.

As soluções tampão foram preparadas com a seguinte composição (34):

pH 2,1- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 38ml de HCl 0,1M  
pH 2,6- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 22ml de HCl 0,1M  
pH 3,0- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 18,8ml de HCl 0,1M  
pH 3,4- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 8,2ml de HCl 0,1M  
pH 3,9- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 0,1ml de HCl 0,1M  
pH 4,5- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 8,7ml de NaOH 0,1M  
pH 5,0- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 22,6ml de NaOH 0,1M  
pH 5,5- 50ml de biftalato de potássio 0,1M + 36,6ml de NaOH 0,1M  
pH 6,0- 50ml de fosfato diácido de potássio 0,1M +  
13,9ml de NaOH 0,1M

pH 6,5- 50ml de fosfato diácido de potássio 0,1M +  
5,6ml de NaOH 0,1M

pH 7,0- 50ml de fosfato diácido de potássio 0,1M +  
29,1ml de NaOH 0,1M

A partir das medidas de  $\tau_{ex}$  e dos termogramas  $dq/dt \times t$  obtidos nestes experimentos construiu-se os gráficos das figuras (14) e (15).

Para preparação destes tampões utilizou-se os seguintes reagentes:

Biftalato de potássio - PA Vetec

Fosfato diácido de potássio - PA Vetec

HCl - PA Merck

NaOH - PA Merck

## 2.9 Efeito da Adição de Sais de Metais Pesados

Os sais de metais pesados podem agir como agentes anti-microbianos, dependendo da concentração em que se encontram no meio de cultura, uma vez que estes cátions apresentam a propriedade de se complexarem com enzimas específicas da levedura.

Estudou-se o efeito da adição de cobre, mercúrio, ferro, cádmio e zinco. Estes cátions foram estudados pois, com excessão do cádmio e do mercúrio, normalmente estão presentes no mosto da cana de açúcar, provenientes de fertilizantes ou por sua presença natural no solo. Adicionou-se ao meio de cultura os seguintes sais de metais pesados, nas seguintes concentrações:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - (  $10^{-5}\text{M}, 10^{-4}\text{M}, 10^{-3}\text{M}, 10^{-2}\text{M}, 10^{-1}\text{M}$  )

$\text{Hg}(\text{OAc})_2$  - (  $10^{-5}\text{M}, 10^{-4}\text{M}, 10^{-3}\text{M}$  )

$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - (  $10^{-5}\text{M}, 10^{-4}\text{M}, 10^{-3}\text{M}, 10^{-2}\text{M}, 10^{-1}\text{M}$  )

$\text{CdSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - (  $10^{-6}\text{M}, 10^{-5}\text{M}, 10^{-4}\text{M}, 10^{-3}\text{M}, 10^{-2}\text{M}$  )

$\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  - (  $10^{-5}\text{M}, 10^{-4}\text{M}, 10^{-3}\text{M}, 10^{-2}\text{M}, 10^{-1}\text{M}$  )

Estes sais foram adicionados até a concentração em que havia inibição total do processo fermentativo,  $dq/dt = 0$ .

A fermentação feita em presença de acetato de mercúrio foi conduzida na ausência de luz, para se evitar a oxidação do metal.

Reagentes utilizados:

Sulfato de Cobre - Reagen-PA

Sulfato de Zinco - Fisher Scientific Company-PA

Acetato de Mercúrio - Reagen-PA

Cloreto de Ferro - Mallincrodt-PA

Sulfato de Cádmió - Art Lab-PA

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O recente interesse pela microcalorimetria biológica nos últimos anos deve-se ao fato desta ser uma técnica rápida, sensitiva, discriminadora e não destrutiva para o estudo de sistemas biológicos.

Uma grande vantagem desta técnica é a possibilidade de se trabalhar com suspensões grosseiras, material colorido e sistemas heterogêneos. A principal aplicação da técnica microcalorimétrica em biologia tem sido no estudo do metabolismo microbiano e isto se deve ao fato de que calor é produzido durante o metabolismo de um microorganismo e possível de ser monitorado por um microcalorímetro sensível. O calor liberado por unidade de tempo é uma medida da potência liberada do sistema. Esta técnica permite o estudo da variação da composição do meio, da cultura utilizada, e da influência de elementos estranhos sobre o metabolismo do microorganismo estudado.

Neste trabalho se fez necessária a padronização do meio de cultura e das condições experimentais e do inóculo, pois devido à alta sensibilidade da técnica utilizada, pequenas alterações em quaisquer das condições experimentais acarreta uma grande distorção nos resultados obtidos. É interessante observar que a fermentação da sacarose nos processos industriais (ex. produção de etanol) ocorre com o chamado mosto na concentração de (18 brix =

180 g/l) de glicose e a quantidade de levedura é cerca de 10% em volume da dorna de fermentação (35). Neste trabalho, a concentração da fonte de carbono é cerca de 40 vezes diluída em comparação com o processo industrial citado. Baseada neste fato observa-se a alta sensibilidade da técnica utilizada neste trabalho para monitorar em tempo real um processo de fermentação da glicose pela *Saccharomyces cerevisiae*.

O princípio de operação de um microcalorímetro que opera segundo o princípio "twin" e diferencial é muito simples. Uma cela de amostra com volume de 0,5ml no caso de microcalorímetros de fluxo é circundada por dispositivos termoeletrônicos ou termopilhas encaixadas por sua vez dentro de um trocador de calor de grande massa e alta capacidade calorífica. O trocador de calor é mantido a uma temperatura programada que pode variar de 5 a 95°C ± 0,0001°C. Qualquer processo térmico que ocorra na cela de amostra resulta numa diferença de temperatura  $\Delta T$  aparecendo então um fluxo de calor  $dq/dt$  através das termopilhas. As termopilhas da cela de amostra são conectadas em oposição às termopilhas da cela de referência, para eliminar qualquer efeito interferente do meio e o sinal resultante da voltagem é amplificado diferencialmente e registrado. O sinal obtido é relativo à taxa de variação do fluxo de calor com o tempo (potência ou  $dq/dt$ ) que é registrada como uma função do tempo (curva potência-tempo, p-t). A estabilidade do sinal é a mesma da flutuação da linha base num

período de 24h, ou seja não mais do que  $0,1\mu W$  (36).

### 3.1 Vantagens da Utilização do Microcalorímetro de Fluxo

1- Devido à alta sensibilidade desta técnica pode-se estudar o efeito de substâncias estranhas ao meio, no nosso caso sais de metais pesados em concentrações tão baixas como  $10^{-6}M$ , foram estudados fornecendo mais informações e de forma mais rápida, do que os métodos tradicionais de investigação da inibição de microorganismos.

2- O método microcalorimétrico não requer soluções transparentes, podendo se utilizar soluções coloridas, turvas ou até mesmo suspensões, e esta propriedade é de fundamental importância num trabalho como o desta tese.

3- O sistema pode ser automatizado.

4- Pode ser estudado o efeito de variações sutis das condições experimentais como pH, temperatura, concentração de metabólito e condições do inóculo.

5- Podem ser realizados estudos cinéticos de interação de agentes antimicrobianos, observando seus efeitos na produção de calor.

6- O microcalorímetro de fluxo pode ser conectado a um fermentador externamente no qual a cultura cresce. Todas as manipulações são realizadas no fermentador, de forma que o equilíbrio térmico no microcalorímetro não é perturbado.

7- Podem ser realizadas medidas simultâneas na cultura

como pH, consumo de substrato, contagem viável das células, etc., uma vez que o volume da linha de fluxo é muito pequeno quando comparado ao volume da cultura.

8- Microcalorimetria de fluxo registra o metabolismo total do microorganismo, isto a torna uma medida mais real do sistema vivo do que as técnicas analíticas em que um único parâmetro do metabolismo celular é medido, por exemplo volume de CO<sub>2</sub>.

9- A medida é realizada em tempo real, e o resultado obtido da curva p-t é a taxa de liberação de calor em função do tempo em que o processo ocorre.

10- Esta técnica tem aplicabilidade direta nos processos industriais pois pode-se utilizar meios de crescimento reais como melado, mosto de cana de açúcar, leite, sangue, etc.

Certamente esta técnica apresenta desvantagens, como qualquer outra que são as seguintes:

1- A concentração de células deve estar na faixa de  $10^4$  à  $10^5$  células/ml.

2- Há um tempo de aproximadamente 5 minutos entre a inoculação e o início da detecção no microcalorímetro, de forma que reações muito rápidas não podem ser estudadas.

3- Nos processos fermentativos há a liberação de CO<sub>2</sub>, que pode ficar depositado no tubo de teflon na forma de bolhas causando distorções na curva p-t, porém o procedimento de lavagem do sistema calorimétrico descrito na parte experimental pode minimizar este fato.

4- Num processo de crescimento microbiano pode haver deposição de células na cela de fluxo, e se não for realizada uma lavagem bem feita pode haver interferência nos experimentos subsequentes.

Para se assegurar a obtenção de bons resultados deve-se controlar algumas variáveis experimentais. Entre elas estão:

1- Deve-se trabalhar com um meio quimicamente definido, com capacidade de tamponamento suficiente para prevenir variações de pH durante o processo estudado.

2- Deve-se utilizar um inóculo padronizado, estocado em ampolas criogênicas a temperatura constante,  $-196^{\circ}\text{C}$ , com uma contagem viável fixa e bem determinada.

3- Agitação constante e uniforme.

4- Atmosfera controlada, seja ela anaeróbica ou aeróbica.

5- Manter o fermentador e o calorímetro termostatizados à mesma temperatura, com os tubos de teflon o mais curto possível para se minimizar as trocas de calor durante o trajeto do fermentador ao calorímetro.

6- Velocidade de bombeamento constante através do sistema calorimétrico feito por uma bomba peristáltica previamente calibrada.

7- Utilizar um condensador de refluxo no microfermentador de forma a manter o volume do meio constante.

8- Utilizar o fermentador e os demais materiais esterelizados para minimizar a contaminação por microorganismos indesejáveis.

### 3.2 Metabolismo das Leveduras

Ouve-se frequentemente que as leveduras estão intimamente associadas com a evolução da humanidade quando comparadas a outros grupos de microorganismos. A capacidade de fermentação das leveduras foi amplamente explorada por séculos na fabricação de pães e bebidas.

Classicamente, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* são usadas no processo fermentativo, mas outras leveduras que fermentam substratos de interesse são:

MICROORGANISMO	AÇÚCARES FERMENTADOS
<i>Kluyveromyces sp</i>	lactose, insulina, sacarose
<i>Pachysolen tannophilus</i>	xilose, glicose
<i>Candida shehatae</i>	xilose, glicose
<i>Pichia stipitis</i>	xilose

Entre eles o *Kluyveromyces* é uma levedura com grande potencial para aplicação industrial. Uma cepa de *Kluyveromyces marxianus* é capaz de produzir álcool a temperaturas de 30 a 48°C (35).

O rendimento alcoólico do *Kluyveromyces* em melaço de cana é geralmente menor que os observados em glicose, indicando a presença de açúcares redutores não fermentescíveis no meio, ou

então uma deficiência nutricional. Estudos deste tipo podem melhorar mais o desempenho desta linhagem, tornando seu uso viável nas usinas de fermentação (35).

No entanto a fermentação alcoólica clássica é processada com leveduras do gênero *Saccharomyces*, predominantemente a *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3.3 O Papel do Oxigênio no Metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae*

A *Saccharomyces cerevisiae* usada nas fermentações alcoólicas é um microorganismo anaeróbico facultativo, portanto cresce tanto na presença como na ausência de oxigênio.

Nas condições de anaerobiose esta levedura produz etanol e CO<sub>2</sub> a partir da glicose e outros açúcares através do metabolismo fermentativo:



Em presença de oxigênio, todo açúcar é convertido em células de água e CO<sub>2</sub>, através do metabolismo oxidativo:



Na maioria das vezes, o limiar destes dois metabolismos é indistinto, e os dois sistemas são coexistentes durante a fermentação.

Embora a fermentação alcoólica seja classicamente considerada como totalmente anaeróbica, inúmeros pesquisadores têm mostrado que traços de oxigênio estimulam a velocidade de fermentação (Efeito Pasteur Negativo) (16). A maioria das cepas de *Saccharomyces cerevisiae* também requer oxigênio como fator de

crescimento, pois o oxigênio molecular é fundamental para a biossíntese de ácidos graxos insaturados, lipídios da membrana e esteróis. Os níveis de oxigênio necessários para atender esta demanda são muito pequenos (da ordem de 1ppm) e portanto, sua determinação e controle é muito difícil.

### 3.4 Temperatura e pH

Temperatura e pH são dois parâmetros importantes que devem ser sempre considerados quando temos em mente o controle biológico de um processo (35).

A temperatura ótima para o crescimento e para a fermentação está geralmente ao redor de 35°C, este valor depende muito da cepa utilizada, mas o comportamento do crescimento em curvas de temperatura é sempre o mesmo, a velocidade aumenta até uma temperatura ótima e depois decai rapidamente. Como a fermentação é um processo exotérmico é sempre recomendável operar abaixo da temperatura ótima (35).

As leveduras são conhecidas por sua grande tolerância a variações das condições de pH. Este fato é altamente favorável a sua utilização na indústria, pois permite operar na faixa de pH 4 a 4,5, enquanto a maior parte dos microorganismos não são capazes de se desenvolver nestas condições, diminuindo assim o risco de contaminação por microorganismos selvagens. Devido a isso muitas indústrias alcooleiras utilizam biocidas agressivos como o ácido sulfúrico, um produto barato e bastante tóxico, ao invés de se usar as penicilinas e os sais quaternários de amônio que são bem

menos tóxicos e possuem atividade biocida em concentrações relativamente baixas (35).

Recentemente tem se notado crescente interesse em métodos analíticos adequados para o monitoramento de processos fermentativos, e particularmente em instrumentações "on-line" e *in situ*. É cada vez maior a necessidade de instrumentos analíticos "on-line" de resposta rápida. Tradicionalmente o pH, níveis de oxigênio, concentração de substrato são medidos simultaneamente ao monitoramento e controle da temperatura e do fluxo de gás. A concentração celular é medida turbidimetricamente "off-line" e as concentrações dos produtos principais e do substrato são analisadas por métodos analíticos adequados tais como cromatografia a gás, espectrometria de massas ou espectrofotometria. O balanço de massa pode ser normalmente obtido a partir destas medidas. O complemento natural para o balanço de massa é o balanço térmico e um dos métodos mais apropriados para obtê-lo é a microcalorimetria.

Linden e colaboradores (37) estudaram o crescimento da *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando a glicose como fonte de carbono e energia. Este estudo foi feito com monitoramento simultâneo de um microcalorímetro e de um fluorímetro, com objetivo de medir a liberação de calor em função do tempo e a fluorescência do nucleotídeo NADH a 340 nm. A pH 4,5 eles obtiveram os seguintes resultados, mostrados na figura (9).

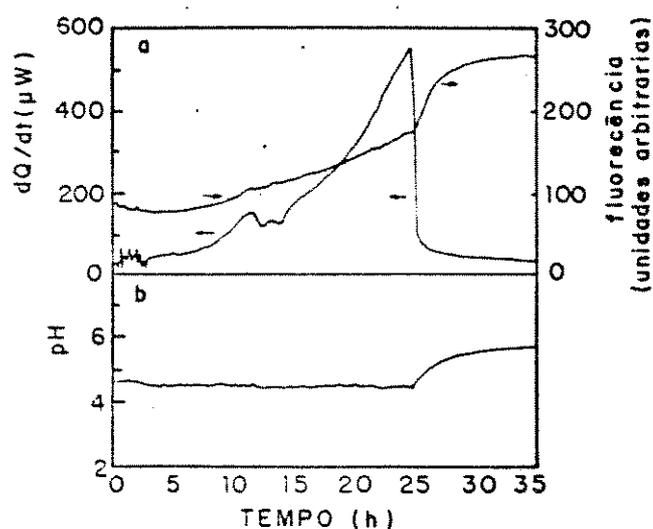


Figura 9 - Monitoramento do metabolismo da *S. cerevisiae* a- medida calorimétrica (escala da esquerda) e fluorescência (escala da direita). b- medida de pH. (32)

Pode-se observar na figura (9) um comportamento típico da *Saccharomyces cerevisiae* de crescimento bifásico. Na primeira fase o etanol foi produzido num metabolismo mixto respiro-fermentativo das células. Na transição de fase as células são adaptadas a utilizar primariamente o etanol, que é metabolizado na segunda fase de crescimento (37).

Hartung (38) estudou o metabolismo de uma bactéria luminescente, a *Photobacterium phosphoreum* utilizando um microcalorímetro de fluxo e dois foto-detectores para monitorar a produção de calor durante o crescimento de culturas deste microorganismo. Os resultados deste trabalho mostrados na figura (10).

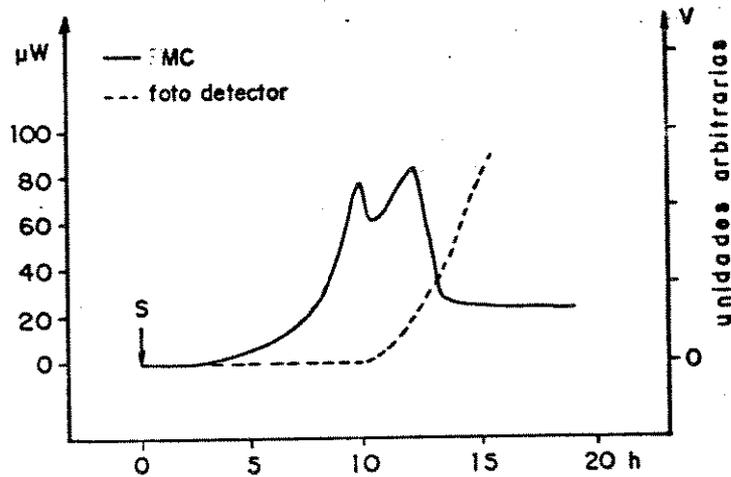


Figura 10 - Microcalorimetria do crescimento da *P. phosphoreum*

Comparação entre a produção de calor e a emissão de luz para o crescimento de uma cultura de *P. phosphoreum*.

S=inoculação. (23)

O resultado por ele obtido mostrou que a emissão de luz pela cultura estudada em seu crescimento inicia quando a fase logarítmica de crescimento está em fase avançada, isto significa que não há paralelismo entre o crescimento e a emissão de luz no metabolismo desta bactéria.

### 3.5 Calibração dos Termogramas

Um termograma típico obtido neste trabalho é mostrado na figura (11).

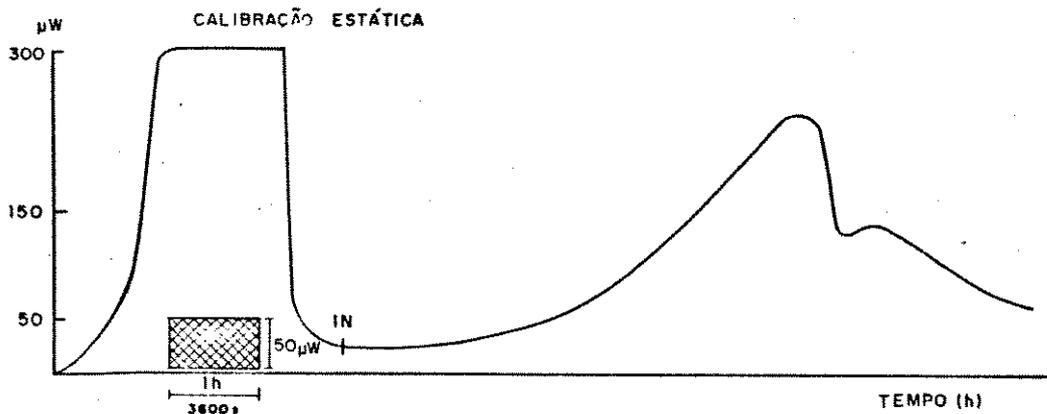


Figura 11 - Esquema de um termograma típico indicando a área de calibração

O termograma da figura (11) como já comentado anteriormente é o registro do fluxo de calor  $dq/dt$  detectado pela termopilha com o tempo. A área total sob o termograma é a integral

$$\int_{t=c \text{ (in.)}}^{t=c \text{ (in.)}} dq \times dt$$

e corresponde a uma certa quantidade de energia em Joules.

Obviamente, para calcular o calor produzido durante o processo da fermentação em Joules necessitamos correlacionar uma certa área do termograma ( $cm^2$ ) com uma quantidade de energia. A calibração do termograma é feita então supondo uma área como a

hachuriada na figura (11) e o cálculo é feito multiplicando os lados deste retângulos ou seja:

$$\begin{aligned} \text{Área} &= 50\mu\text{Watts} \times 3600 \text{ seg (1 hora)} = \text{Energia} \\ &= 50 \times 10^{-6} \text{Watts} \times 3600 \text{ seg} = 1,8 \times 10^{-1} \text{Joules} \end{aligned}$$

Calibramos desta maneira uma área ( $\text{cm}^2$ ) em Joules e agora por comparação com outras áreas podemos mapear todo o termograma.

Inicialmente o termograma é então dividido de hora em hora. Em seguida faz-se a medida da área sob a curva com o uso de um planímetro, obtendo-se assim valores de área em  $\text{cm}^2$  que por comparação com a área de calibração obtém-se o valor da energia.

### 3.6 Variação da Concentração de Glicose

Neste trabalho estudou-se o metabolismo fermentativo da *Saccharomyces cerevisiae* em diversas concentrações de glicose (g/l): 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0, e através das medidas dos termogramas obtidos foram construídos os gráficos das figuras (12) e (13). O gráfico da figura (12) é relativo à medida do tempo de exaustão em função das diferentes concentrações de glicose, e pode-se observar que nesta faixa de concentração o tempo de exaustão varia exponencialmente com o aumento da concentração de glicose, porém não se observou uma variação sistemática na inclinação das curvas  $\log Q \times t$ , figura (13).

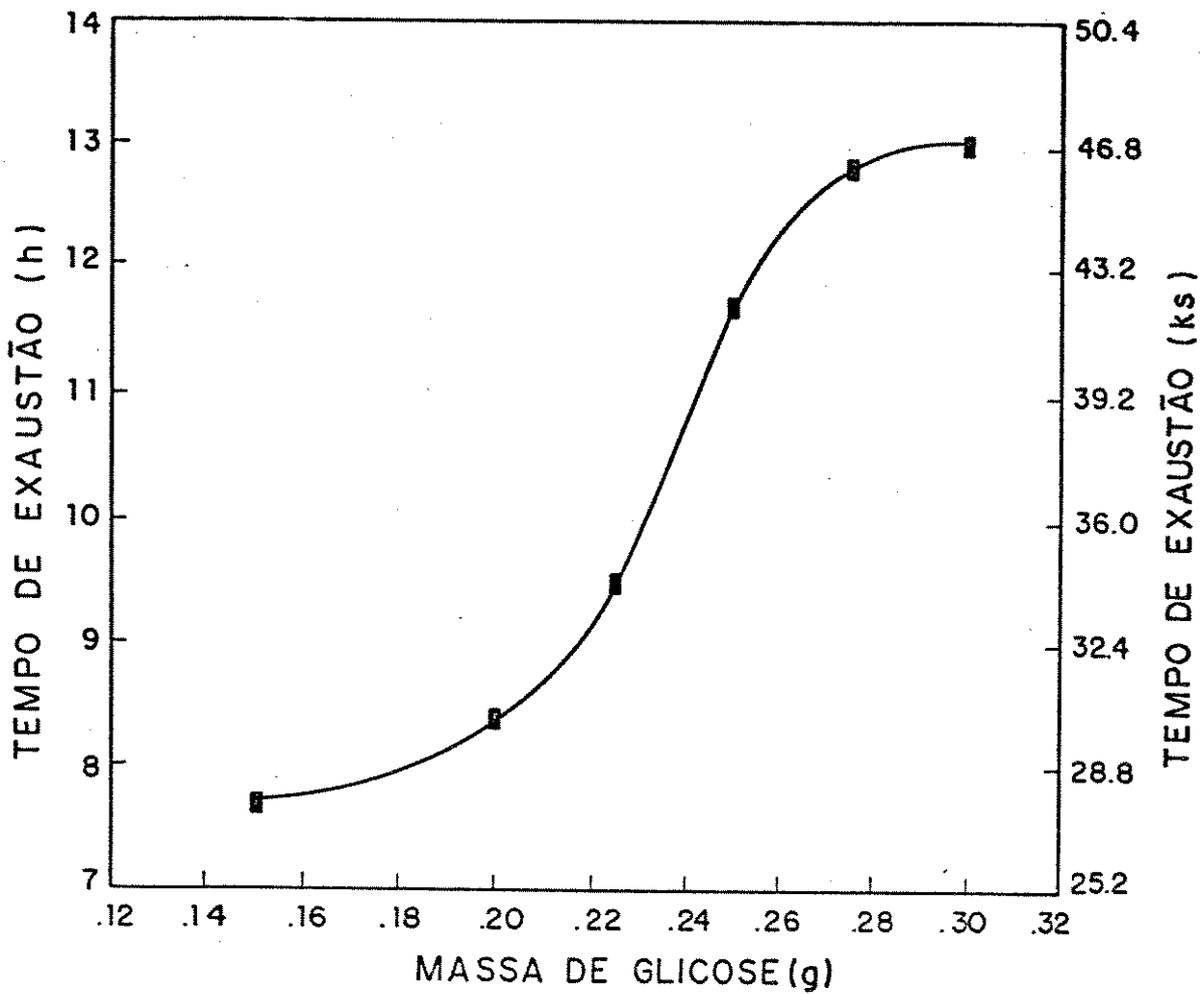


Figura 12 - Tempo de exaustão em função da massa de glicose obtida a partir de curvas p-t

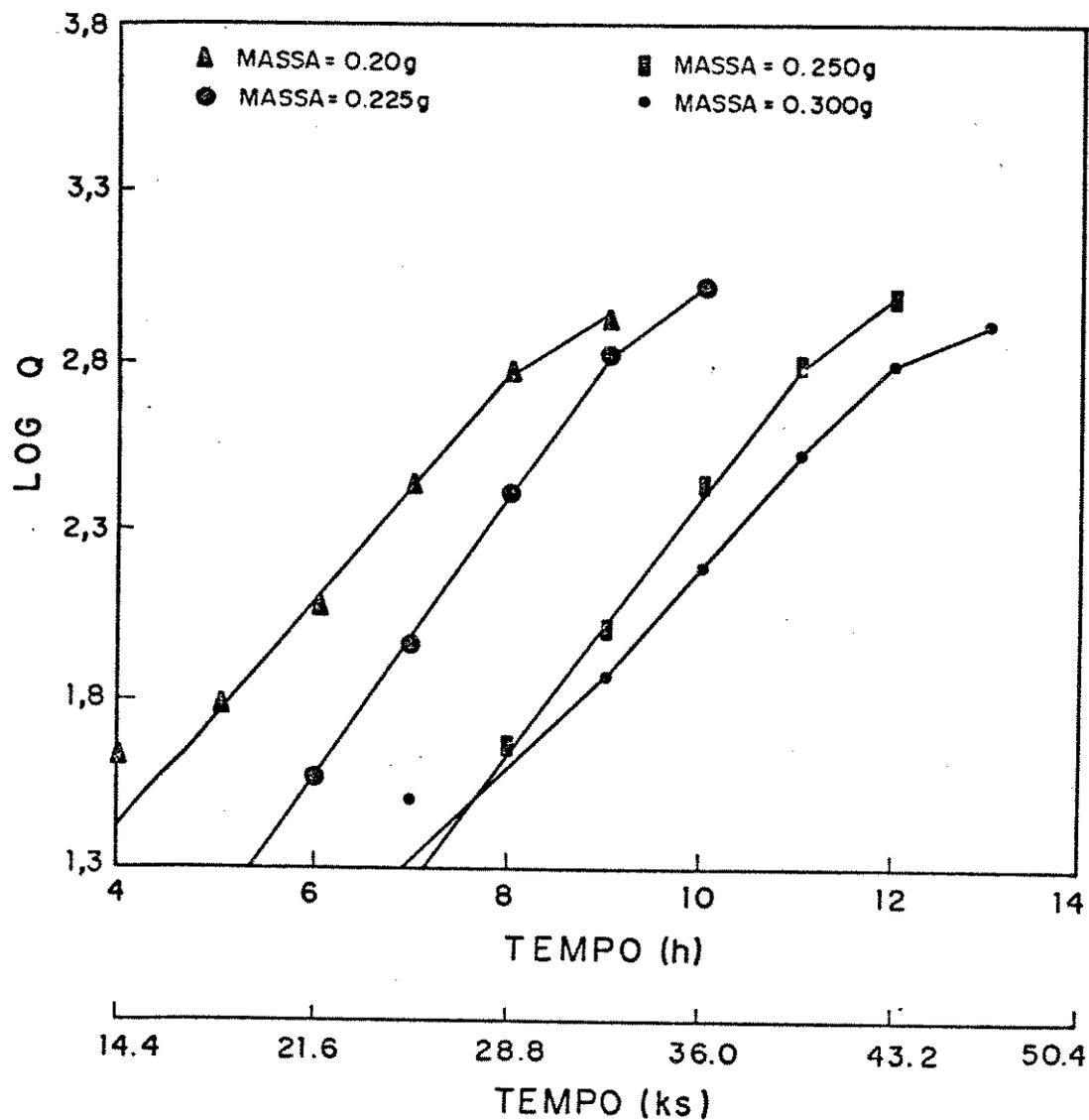


Figura 13 -Produção de calor em função do tempo para diferentes concentrações de glicose

O tempo de exaustão foi definido como o tempo necessário para o consumo de toda a glicose presente no meio, portanto o resultado por nós obtido está bastante coerente com a definição de  $t_{ex}$  pois pode-se observar na análise dos termogramas, figura(12), que a variação na concentração de glicose afeta diretamente e de forma exponencial o tempo de exaustão. Uma vez que o processo por nós estudado é o fermentativo e não o de crescimento é de se esperar que o número de células de leveduras não varie significativamente com o decorrer do experimento, portanto a capacidade de consumir o metabólito por unidade de tempo não varia muito com o decorrer do processo estudado. Quando se aumenta a concentração deste metabólito o tempo para que haja o seu total consumo deve então aumentar.

Resultado semelhante foi obtido por Perry, (24), onde a concentração de glicose foi variada de 20mM para 2mM e a densidade do inóculo mantida constante. Neste experimento o tempo de exaustão foi bastante afetado bem como o perfil da curva p-t.

O uso da microcalorimetria de fluxo para o estudo sistemático do efeito da variação da concentração da glicose no metabolismo da *Saccharomyces cerevisiae* se mostrou bastante viável, pois sendo uma técnica muito sensível pôde-se trabalhar em concentrações reduzidas do metabólito. Tradicionalmente este tipo de estudo é feito por contagem de células em placas de agar-agar, ou determinando-se a concentração dos produtos formados. Bravo e colaboradores, recentemente, (39), estudaram a influência da concentração inicial de glicose na fermentação alcoólica por

*Pachysolen tannophilus*, uma levedura capaz de metabolizar a glicose a etanol aerobicamente a temperaturas relativamente altas, em torno de 37°C. Este estudo foi feito determinando-se o etanol produzido com a utilização de um método enzimático, utilizando a alcool desidrogenase. Neste trabalho obteve-se uma relação linear entre a quantidade de etanol produzido e a glicose consumida.

Ao contrário do estudo microcalorimétrico esta técnica de determinação do produto formado, não observa o processo como um todo. A utilização deste tipo de técnica tem, e sempre terá, importância na pesquisa do metabolismo de microorganismos, porém a microcalorimetria vem abrir uma frente de pesquisa em que o processo metabólico é estudado de forma global. Tamanha é a complexidade dos sistemas biológicos que quanto mais ferramentas houver disponíveis mais facilmente poder-se-á desvendar a enorme quantidade de fenômenos ainda não conhecidos destes sistemas.

### 3.7 Variação do pH do Meio de Cultura

Estudou-se o efeito da variação do pH no meio de cultura no intervalo de pH 2,1 até 7,0. Esta região de trabalho foi escolhida empiricamente, porque em valores de pH menores que o mínimo utilizado ocorria a inibição total do processo, não se observando nenhuma variação significativa na linha base da curva p-t. Em valores de pH maiores que o máximo utilizado ocorria a formação de um precipitado azul no meio de cultura, portanto já não se podia garantir que se estava trabalhando sob as mesmas condições experimentais previamente definidas.

Pode-se observar que a faixa de pH em que trabalhamos é bastante ampla, fato este já esperado pois é bem conhecida a grande tolerância das leveduras a condições adversas (35).

A partir dos dados obtidos das curvas p-t pôde-se fazer os gráficos das figuras (14) e (15). Colocando-se num gráfico os valores de tempo de exaustão em função de pH, figura (14), obteve-se uma curva que apresentava um mínimo na região de pH 4,5 a 6,0., portanto para os valores de pH do meio menores que 4,5 e maiores que 6,0 o processo fermentativo é mais demorado sugerindo assim uma possível inibição do metabolismo da levedura.

Observando-se a inclinação das retas  $\log Q$  em função de t, figura (15), pôde-se notar que a curva correspondente a pH 6,0 apresentava a maior inclinação, ou seja uma maior taxa de produção de calor com o tempo. As curvas correspondentes a pH 4,0 e 5,0 também apresentam uma inclinação maior que aquelas observadas para os demais valores de pH, sendo esta região a mais adequada para se trabalhar com processos fermentativos que envolvem a *Saccharomyces cerevisiae* (40).

A pH 5,0 o processo fermentativo é predominante e a quantidade de calor produzida com o tempo é bastante alta quando comparada aos demais valores de pH para os quais a inclinação da curva  $\log Q \times t$  é sempre menor. Este resultado é muito interessante uma vez que esta é a região de trabalho na indústria alcooeira, pH entre 4,5 e 5,0 em que a contaminação por

microorganismos selvagens é inibida pela acidez do meio e o rendimento da levedura está próximo do máximo.

A influência do pH no metabolismo de leveduras é amplamente estudada, uma vez que este microorganismo apresenta uma grande variedade de aplicações industriais, porém os métodos de estudo frequentemente são: determinação do etanol produzido, como no trabalho realizado recentemente por Rubio e colaboradores, (19), em que as curvas de crescimento apresentam maior inclinação na região de pH 2,5 até 6,0, sendo que em pH 1,5 praticamente não há um crescimento, resultado este concordante com o nosso, apesar da técnica utilizada ser outra, porém estas medidas requerem um tempo muito grande, em torno de 50 horas.

Fleet e colaboradores (41) estudaram a tolerância de diversas leveduras de vinho à variações de pH, entre elas a *Saccharomyces cerevisiae*, a *Candida stellata* e a *Kloeckelia apiculata* utilizando crescimento em meio de cultura e posterior medida turbidimétrica. Porém para estas medidas são necessários vários dias, em média de 15 a 20. O tempo de análise é muito longo quando comparado ao necessário para uma medida microcalorimétrica do mesmo sistema.

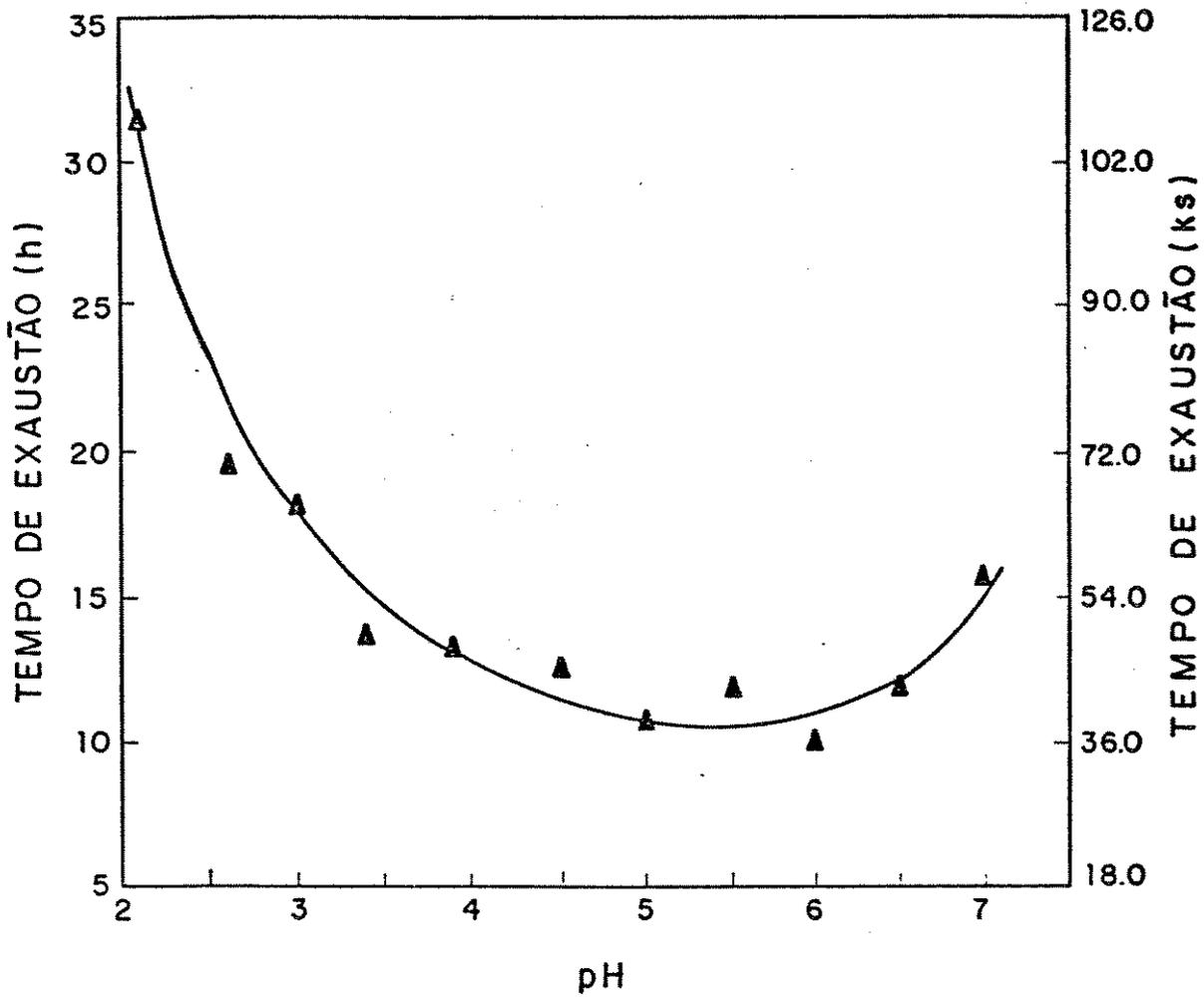


Figura 14 - Variação do tempo de exaustão em função do pH do meio

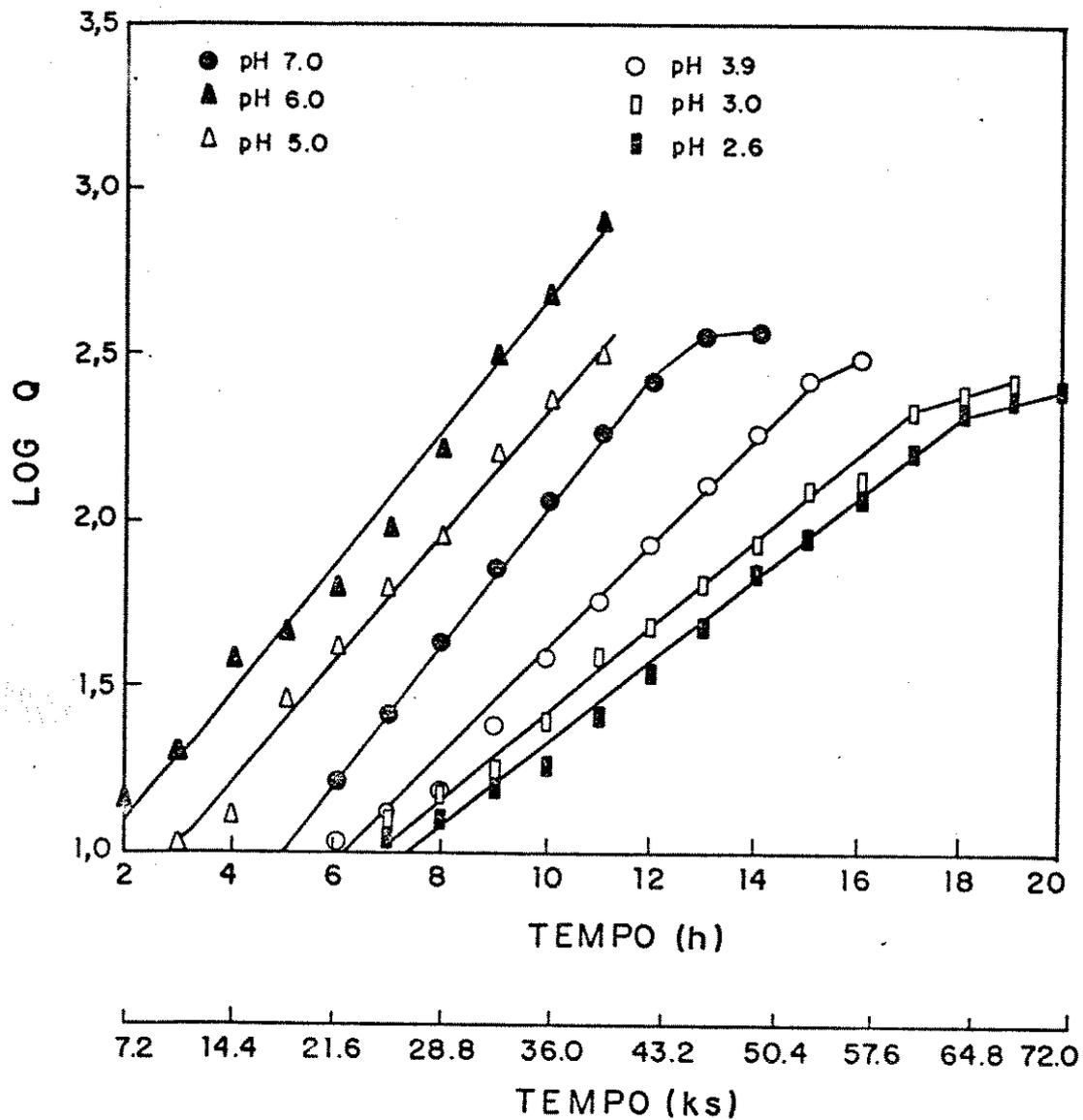


Figura 15 - Calor produzido em função do tempo em diferentes valores de pH do meio

### 3.8 Adição de Sais de Metais Pesados

Os sais de metais pesados podem atuar como agentes anti-microbianos, dependendo de sua concentração no meio de cultura, uma vez que estes cátions competem e se complexam com enzimas específicas da levedura (35).

Porém num sistema fermentativo a velocidade de produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* decresce com o acúmulo de etanol no meio.

Este declínio na atividade fermentativa começa muito cedo na fermentação, ainda quando a concentração de etanol é bastante baixa. Esta concentração é frequentemente menor que 3% (v/v). Nagowithana, realizou diversas fermentações na presença e na ausência de etanol e mediu a concentração intracelular de etanol nas ditas "fermentações rápidas" (42).

Portanto para se estudar isoladamente o efeito inibitório de algum agente biocida seria necessário se retirar o etanol do meio à medida que ele fosse formado, porém este não era nosso objetivo. Neste trabalho buscou-se estudar o efeito inibitório de alguns metais e comparar os resultados obtidos ao que chamamos como meio definido. Desta forma pôde-se desprezar este efeito inibitório do etanol pois ele também ocorre no nosso meio padrão focalizando nossa atenção apenas nos efeitos causados pela adição dos metais por nós estudados, ferro, zinco, mercúrio, cádmio e cobre.

Fez-se o estudo da adição de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ ,

FeCl<sub>3</sub> . 6H<sub>2</sub>O, ZnSO<sub>4</sub> . 6H<sub>2</sub>O e CdSO<sub>4</sub> . 8/3 H<sub>2</sub>O em diferentes concentrações. Estes compostos foram adicionados ao meio de cultura padrão de forma a atingir a concentração por nós desejada porém mantendo o volume final de 50ml. Quando se utilizou o acetato de mercúrio, tomou-se o cuidado de manter o fermentador e os tubos de teflon ( de entrada e saída do calorímetro) no escuro para se evitar a oxidação deste metal.

Com excessão do sulfato de cádmio que será discutido separadamente, pôde-se observar que a quantidade de calor envolvida no processo não era alterada com a variação da concentração do metal, porém quando se atingia a concentração inibitória o processo era bruscamente interrompido. O tempo de exaustão sofreu um deslocamento significativo com relação ao padrão e não variou a medida em que se aumentou a concentração dos metais.

O mercúrio foi o metal que se mostrou mais tóxico pois apresentou efeito inibitório na concentração 10<sup>-4</sup>M, 100 vezes mais diluído que o cádmio e 1000 vezes mais diluído que os demais metais, ferro, zinco e cobre.

A alta resistência da *Saccharomyces cerevisiae* a condições adversas do meio foi constatada também nestes experimentos, pois esta levedura foi capaz de metabolizar a d-glicose na presença de metais em concentrações bastante elevadas da ordem de 10<sup>-2</sup>M para o caso do ferro, do zinco e do cobre.

O aumento no tempo de exaustão com relação ao meio padrão foi observado como um incremento na fase "lag" dos

termogramas e não na fase exponencial. Como é na fase "lag" que as leveduras produzem as enzimas necessárias para seu catabolismo, pode-se concluir que o metal adicionado apresenta seu efeito nesta etapa da fermentação, talvez se complexando com as enzimas específicas das leveduras.

Nesta tabela se encontram os valores  $t_{ex}$  para os metais utilizados nas diversas concentrações de trabalho (em horas):

	$10^{-6}M$	$10^{-5}M$	$10^{-4}M$	$10^{-3}M$	$10^{-2}M$	$10^{-1}M$
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$		15,0	14,5	14,6	14,2	inibição
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$		15,3	15,3	16,0	15,7	inibição
$Hg(OAc)_2$		14,0	inibição			
$ZnSO_4 \cdot 6H_2O$		15,0	14,4	14,7	15,7	inibição
$CdSO_4 \cdot 8/3H_2O$	16,0	16,3	16,2	15,8	inibição	

$$T_{ex} \text{ padrão} = 13 \pm 0,5 \text{ h}$$

Sabe-se que alguns metais, num meio a pH 5,0 podem sofrer hidrólise, como por exemplo o ferro que a pH acima de 4 já inicia a formação dos complexos  $Fe(OH)_n$  cujos valores de  $\log k$  (constante de formação do complexo) foram sumarizados por Martell e Smith (43,44). Porém o nosso meio padrão é bastante complexo e há também competição entre os outros íons nele presentes. No caso o ferro é capaz de se complexar com o ácido cítrico com um valor de constante da mesma ordem de grandeza que no caso da hidrólise (43).

$\text{Fe}(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)$      $\log k$     11,50 (43)

$\text{Fe}(\text{OH})_n$          $\log k$         11,01 (44)

Não desejamos resumir os vários processos que ocorrem no meio a apenas estes dois exemplos, somente estamos esclarecendo que se torna bastante difícil isolar todas as interações e reações ocorridas num meio tão complexo quanto o nosso.

O nosso objetivo foi verificar o efeito da adição de tais metais no meio fermentativo padrão, para observarmos as variações na produção de calor pelo sistema como um todo. Esta é uma das limitações da técnica por nós utilizada, embora muitas vezes sua utilização seja uma das únicas maneiras de se estudar processos tão complexos, como no caso o metabolismo de uma levedura.

### 3.9 Adição de Sulfato de Cádmio

Dentre os metais pesados, o cádmio se mostra tóxico a todas as formas vivas, devido ao seu efeito altamente oxidante e de desnaturação de proteínas, além de ser acumulado pelos organismos.

Joachimsohn e colaboradores, (45) fizeram um estudo microcalorimétrico das alterações na atividade metabólica de um organismo aquático, *Planorbis corneus*, utilizando para este estudo uma concentração de cádmio da ordem de  $0,01 \mu\text{g}/\text{l}$  à  $1000 \mu\text{g}/\text{l}$  e puderam observar um decréscimo na taxa de produção de calor dependente da concentração de cádmio de 19% a  $0,01 \mu\text{g}/\text{l}$  a 88% a  $1000 \mu\text{g}/\text{l}$ .

Neste trabalho utilizou-se  $\text{CdSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$  numa faixa de concentrações que variava de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}\text{M}$  e ao contrário do que se imaginava observou-se que à medida que se aumentava a concentração de cádmio houve um aumento na quantidade de calor liberada, ou seja as curvas de  $\log Q \times t$  apresentavam uma maior inclinação à medida que a solução se tornava mais concentrada em sulfato de cádmio, até a concentração de  $10^{-2}$  onde houve a inibição total do processo.

O perfil dos termogramas obtidos nestes experimentos podem ser observados na figura (16).

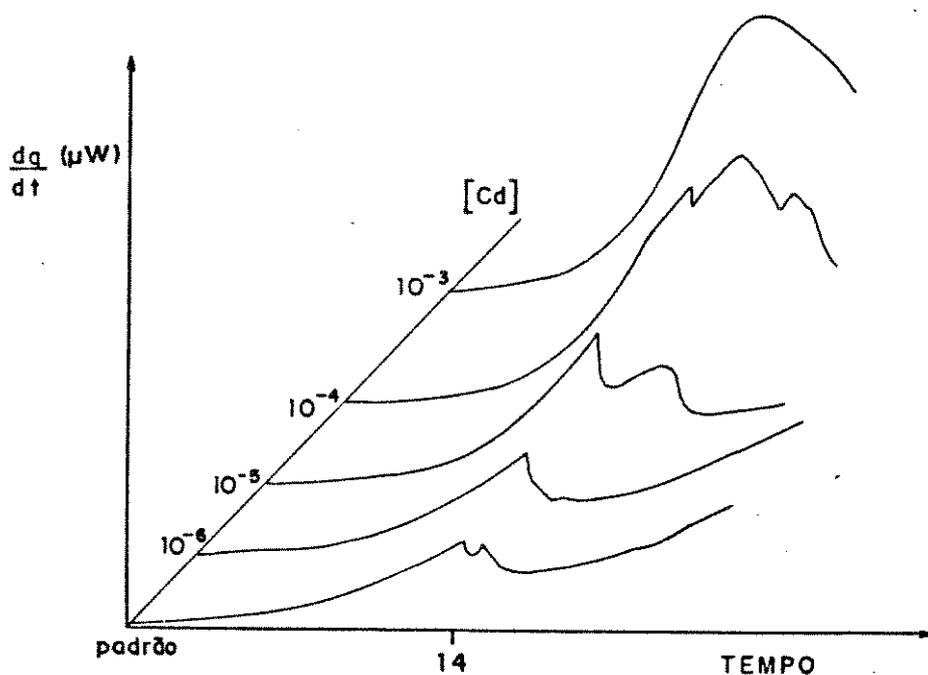


Figura 16 - Perfil dos termogramas com adição de cádmio

E o gráfico  $\log Q \times t$ , figura (17), mostra como a taxa de liberação de calor variou com o tempo.

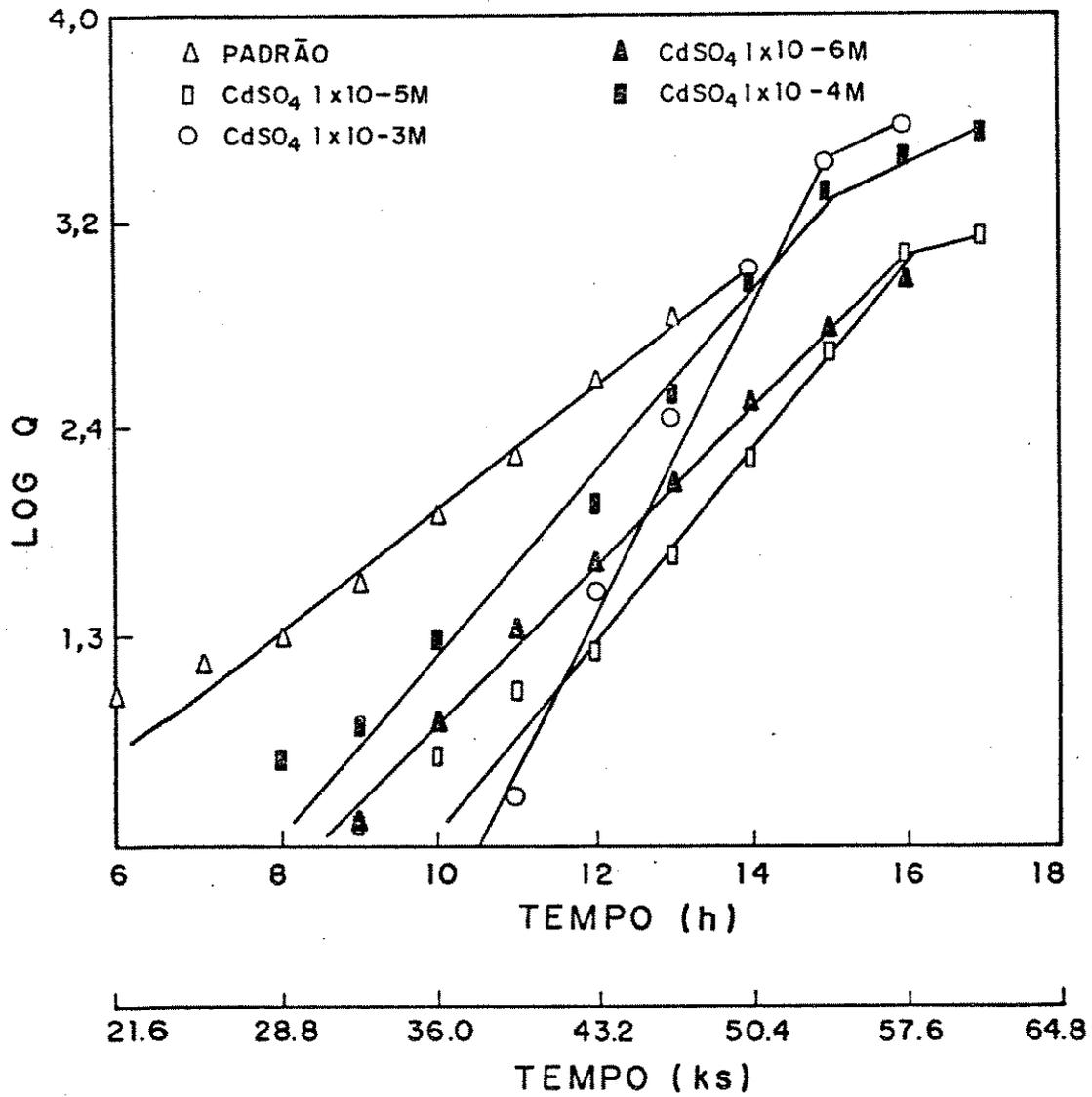


Figura 17 - Calor produzido em função do tempo para as diferentes concentrações de sulfato de cádmio

Este efeito de potencialização da liberação de calor quando da adição do cádmio no meio foi bastante inesperado, devido este metal ser altamente tóxico porém ele também é capaz de se complexar com as enzimas das leveduras e o que talvez tenha acontecido é que as enzimas responsáveis pela via anaeróbica do metabolismo das leveduras tenham sido inibidas e houve então um desvio para a via aeróbica, que é bem mais energética que a primeira. Ou então podemos na verdade estar medindo o efeito térmico do processo de esporulação destes organismos devido às condições adversas do meio.

#### 4. CONCLUSÃO

A etapa mais importante deste trabalho foi a otimização das condições experimentais, densidade do inóculo, pH, temperatura e meio de cultura, pois devido a alta sensibilidade da técnica utilizada fez-se necessário um controle rigoroso de tais parâmetros para que fosse possível a obtenção de resultados reprodutíveis.

Esta área de pesquisa, em que uma cultura bem definida de um microorganismo é estudado dentro de um microcalorímetro, está apenas iniciando e suas potencialidades ainda não foram totalmente exploradas, no entanto a microcalorimetria de fluxo se mostrou uma ferramenta analítica bastante apropriada para o estudo de sistemas biológicos.

A fermentação da d-glicose pela *Saccharomyces cerevisiae* foi monitorada em tempo real *in situ* e a variação de alguns parâmetros experimentais pôde ser estudada, mas para que este trabalho pudesse ser realizado todas as outras variáveis foram mantidas rigorosamente controladas.

Como trabalhamos com uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, bem definida, com contagem viável previamente determinada, da ordem de  $10^7$  células/ml e o processo por nós estudado não era longo (cerca de 13 horas), pôde-se garantir que a contaminação por outros microorganismos fosse mínima pois caso

alguma célula estranha estivesse presente no meio este tempo não seria suficiente para que a liberação de calor devido ao seu metabolismo influenciasse nossos resultados.

Quando se analisou os termogramas apenas se utilizou a região exponencial da curva pois esta corresponde a um estado estacionário termodinâmico.

Quando se estudou o efeito da variação da concentração da glicose concluiu-se que o tempo de exaustão varia exponencialmente com o aumento da concentração deste metabólito.

O pH mostrou ser um parâmetro importante quando se avalia um processo fermentativo pois tanto o  $t_{ex}$  quanto a quantidade de calor envolvida foram significativamente afetados quando se variou o pH de 2,1 até 7,0. Concluiu-se que a melhor região de trabalho é entre pH 4,0 e pH 6,0, onde a taxa de liberação de calor é bastante alta e o processo se desenvolve num tempo menor que aquele necessário nos demais valores de pH.

Encontrou-se a concentração inibitória dos metais estudados: ferro, zinco, cádmio, mercúrio e cobre, chamando atenção para a grande resistência da levedura estudada a altas concentrações de elementos tóxicos presentes no meio.

Quanto ao resultado por nós obtido quando da adição de cádmio ao meio de cultura, de potencialização da liberação de calor no processo fermentativo, fazem-se ainda necessárias análises complementares como por exemplo o monitoramento do etanol produzido por cromatografia líquida, a contagem num microscópio das células das leveduras de alíquotas retiradas do fermentador

durante o processo.

O estudo dos sistemas vivos é de fundamental importância, pois cada vez é maior a interferência do Homem no meio que o cerca, e o desenvolvimento de técnicas que permitam uma avaliação criteriosa de suas causas e efeitos faz-se cada vez mais necessária. Talvez a única saída para se contornar os danos já causados por nós seja a utilização do conhecimento científico. Por menor que seja a contribuição da microcalorimetria para o estudo dos sistemas vivos sua agregação às demais técnicas já existentes e àquelas a serem ainda desenvolvidas certamente colabora com o conhecimento de sistemas tão complexos e ainda tão obscuros.

## 5 BIBLIOGRAFIA

- (1) Armstrong, G.T. *Journal of Chemical Education*, 1964, 41 (6), 297.
- (2) Spink, C.; Wadsö, I. *Methods of Biochemical Analysis*, Ed. Glick, D., N.Y., 1976, vol.23.
- (3) Calvet, E.; Prat, H. *Microcalorimetrie - Application Physico-chimiques et Biologiques*, Masson et Cie, Paris, 1956.
- (4) Martin, C.J.; Marini M.A. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1979, 8 (3), 221.
- (5) Spink, C.H. *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1980, 9, 1.
- (6) Wadsö, I. "Thermal and Energetic Studies of Cellular Biological System", in: James, A.M. (ed), John Wright et Sons, Bristol, 1987, 34.
- (7) Buckton, G.; Russell, S.R.; Beezer, A.E. *Thermochemica Acta*, in press.
- (8) Wadsö, I.; Monk, P. *Acta Chemica Scandinavia*, 1968, 22, 1842.
- (9) Volpe, P.L.O., *Química Nova*, 1987, 10 (2), 122.
- (10) Langerman, N.; Biltonen, R.L. *Methods Enzymol.*, 1979, 61, 261.
- (11) Volpe, P.L.O., IQ-UNICAMP, Comunicação pessoal, Trabalho em elaboração.
- (12) LKB - *Bioactivity Monitor Modelo 2277*, Bromma Sweden.

- (13) Perry, B.F.; Milles, R.J.; Beezer A.E. *Yeast Technology*, Springer-Verlag, Berlin, 1990, pgs. 276-345.
- (14) Perry, B.F. *Thermal Analysis*, 1982, 12(B), 176.
- (15) Chowdhry, B.Z.; Beezer, A.E.; Greenhow, E.J. *Talanta*, 1983, 30, 209.
- (16) Beezer, A.E. Em *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, Londres, 1980, pgs 34-67.
- (17) Nunomura, K.; Fugita, T. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 1982, 28, 497.
- (18) Chang-Li, X.; Day-Ung, S.; Zhau Hua, S.; Song-Sheng, Q. *Thermochimica Acta*, 1989, 142, 211.
- (19) Rubio, F.C.; Rodriguez, V.B.; Villasclaras, S.S.; Vico, M.C. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1989, 54, 1244.
- (20) Beezer, A.E. *J. Applied Bacteriology*, in press.
- (21) Wadsö, I. Normas Provisórias da IUFAC-IUB-IUPAB, Interunion Commission on Biothermodynamics, *Pure & Appl. Chem.*, 1982.
- (22) Volpe, P.L.O. *Química Nova*, 1988, 11, 435.
- (23) Perry, B.F.; Beezer, A.E.; Milles J.R. *Microbios*, 1981, 32, 163.
- (24) Perry, B.F.; Beezer, A.E.; Miles, R.J. *Journal of Applied Bacteriology*, 1979, 47, 527.
- (25) Kurvits, M.; Sümer, E. *Thermochimica Acta*, 1986, 103, 297.
- (26) Jolicoeur, C.; Cong To, T.; Beaubien, A. *Analytica Chimica Acta*, 1988, 213, 165.

- (27) Beezer, A.E. *Society for Applied Bacteriology*, in press
- (28) Hartung, J. *Jbl. Bakt. Hyg. B*, 1986, 183, 47.
- (29) Hartung, J. *Jbl. Bakt. Hyg. B*, 1988, 187, 166.
- (30) Sharma, P.B.; Beezer, A.E. *Microbios*, 1981, 31, 16.
- (31) Miller, S.L.; Smith-Magowan, D. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, 1990, 19(4), 1049.
- (32) Kirsop, B.E.; Snell, J.J. *Em Maintenance of Microorganisms*, Academic Press, N.Y., 1984, pgs. 109-130.
- (33) Beezer, A.E.; Newell, R.D.; Tyrrell, H.J.V. *Journal of Applied Bacteriology*, 1976, 41, 197.
- (34) CRC - *Handbook of Chemistry and Physics*, 67<sup>th</sup> ed., CRC Press Inc., Florida, 1986.
- (35) Eguchi, S.; Yokoya, F.; Canhos, V.F.; Galo, C. *Apostila do curso oferecido na FIPT, Pontos Críticos e Microbiológicos em Usinas de Açúcar e Alcool*, 1989.
- (36) Buckton, G.; Beezer, A.E. *International Journal of Pharmaceutics*, 1991, 72, 181.
- (37) Lidén, G.; Lason, C.; Gustafsson, L; Niklasson, C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, 31, 355.
- (38) Hartung, J. *Thermochimica Acta*, 1987, 119, 121.
- (39) Bravo, V.R.; Camacho, R.F.; Sanchez, V.S. *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1990, 55, 854.
- (40) Iroschy, L. Centro de Pesquisa da Copersúcar, Comunicação pessoal.
- (41) Fleet, G.H.; Gao, C. *Journal of Applied Bacteriology*,

1988, 65, 405.

- (42) Nagowithana, T.W. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1976, 31(3), 158.
- (43) Martell, A.E.; Smith, R.M. *Critical Stability Constants*, Plenum Press, N.Y., 1916, 161, vol. 3.
- (44) Martell, A.E.; Smith, R.M. *Critical Stability Constants*, Plenum Press, N.Y., 1916, 1, vol. 4.
- (45) Joachimsohn, G.B.; Lamprecht, I.H.D.; Schaarschmidt, B. *Journal of Thermal Analysis*, 1989, 35, 659.