

MEDIDA DA HIDROFOBICIDADE DA PAREDE CELULAR DE LEVEDURAS POR ADESÃO A HIDROCARBONETOS. Vinicius Paschoalini Silva, Miguel Jafelicci Junior, Sandro Rogério de Sousa, Cecília Laluece - Química - Química Licenciatura - Departamento de Físico - Instituto de Química - Campus de Araraquara.

A hidrofobicidade é uma propriedade físico-química relacionada com o grau de aversão de solutos ou partículas pela água, em um sistema aquoso. Assim, ocorrem interações entre moléculas ou partículas coloidais e interfaces do sistema que apresentam polaridade oposta à da água, ou seja, em interfaces nas quais as forças de atração das moléculas ou partículas são mais fortes que as demais forças envolvidas nas interações com a água. A medida da hidrofobicidade pode ser realizada apenas indiretamente, através de fenômenos que refletem, com maior ou menor clareza, a natureza das interações intermoleculares. A hidrofobicidade é usualmente determinada por partição da amostra em um sistema de duas fases (fase aquosa e fase orgânica), no qual o grau de hidrofobicidade é medido pela adesão das células a hidrocarbonetos [1]. A adesão das células à hidrocarbonetos pode variar com o pH da fase aquosa [2 e 3]. As superfícies das células microbianas são heterogêneas e caracterizadas por apresentar grupos ou regiões com especificidades químicas e físicas, susceptíveis às alterações frente ao estímulo induzido por componentes do meio de cultivo ou de produtos de excreção [4].

As propriedades físico-químicas de adesão e de hidrofobicidade que se manifestam na superfície das células governam os fenômenos amplamente empregados industrialmente em bioprocessos [5]: biocorrosão, biobeneficiamento, biodeteriorização, biofloculação, observadas no final do processo de fermentação e de considerável importância na indústria de bebidas e alimentos em geral, em processos de flotação, de grande relevância para a área da engenharia na separação de sólidos.

O objetivo do presente trabalho consistiu em estudar a hidrofobicidade de leveduras por adesão a hidrocarbonetos e estabelecer correlações entre as medidas obtidas com as linhagens das leveduras utilizadas, o tipo de hidrocarboneto e o pH das suspensões de células (biocolóide), ou seja, células suspensas no próprio meio de cultivo ou células lavadas com solução de nitrato de potássio e redispersas em soluções do mesmo sal.

As leveduras utilizadas foram: linhagem FLT-01 de *Saccharomyces cerevisiae*, que apresenta parede celular altamente hidrofóbica e alta capacidade de flotar [6] e a linhagem LTU (levedura de panificação) de caráter hidrofílico. Estas linhagens foram mantidas em YPD sólido (agar inclinado), em geladeira a 4° C. As leveduras foram propagadas em meio definido contendo glicose 2 % como fonte de carbono, sulfato de amônio ($3,12\text{g.L}^{-1}$) como fonte de nitrogênio e micro- nutrientes [7]. O meio (50 mL em Erlenmeyer de 250 mL) foi esterilizado por 20 minutos a 120°C e 1 atm de pressão. A seguir, os meios foram inoculados com um pré-inóculo de células frescas, tal que a concentração inicial de células foi de $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ no início de cada propagação, com duração de 24h a 30°C e em mesa giratória a 125 rpm.

Após a propagação das células a hidrofobicidade foi medida utilizando-se dois tipos de suspensões de células: a) células suspensas no próprio meio de cultivo e concentração inicial ajustada para $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ por retirada de sobrenadante (centrifugação), e posterior adição de meio de cultivo; b) células lavadas por três vezes (centrifugação) com solução de nitrato de potássio $10^{-4}\text{ mol.L}^{-1}$, sendo as células lavadas suspensas na mesma solução de sal ($0,5\text{ mg células /ml}$). Os valores de pH das suspensões de células foram ajustados para os valores desejados (1,5; 3,0; 4,5; 6,0; 7,5;) com a adição de soluções de HCl ou NaOH. Depois dos ajustes dos valores de pHs, as suspensões de células foram aclimatizadas por 30 minutos em mesa giratória operando a 125 rpm e 30°C.

Para medidas de hidrofobicidade, 3,0 mL de cada suspensão aclimatizada de células foram transferidos para tubos de ensaio contendo 1 mL de hidrocarboneto (p-xileno, hexano ou tolueno). Então, os tubos foram agitados por 25 segundos em um agitador de tubos, e após 10 minutos ocorreu a separação das fases. Após a separação das fases, a parte aquosa foi retirada com o auxílio de um micro pipetador e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro a 570 nm.

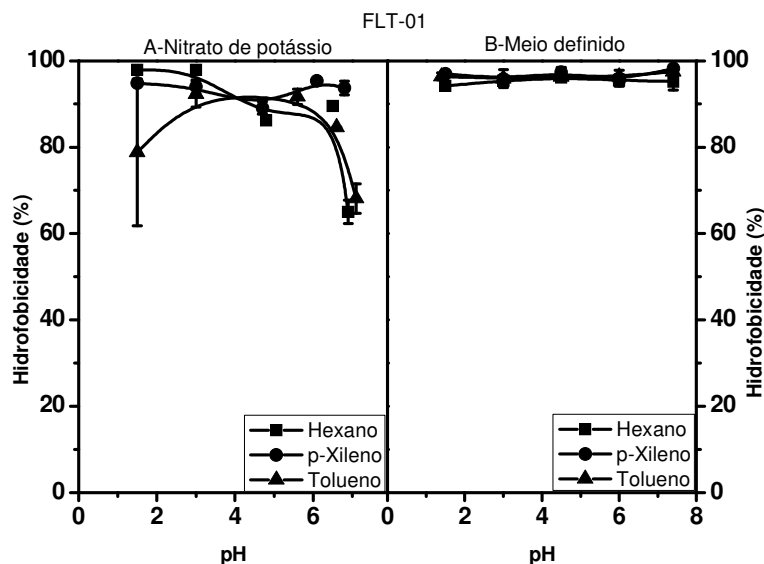


Figura 1: Efeito do pH sobre a hidrofobicidade da linhagem FLT-01 de *Saccharomyces cerevisiae*: A) lavada e suspensa em nitrato de potássio; B) lavada e suspensa no próprio meio; em sistema de duas fases (orgânico /aquoso) utilizando hexano, p-xileno e tolueno.

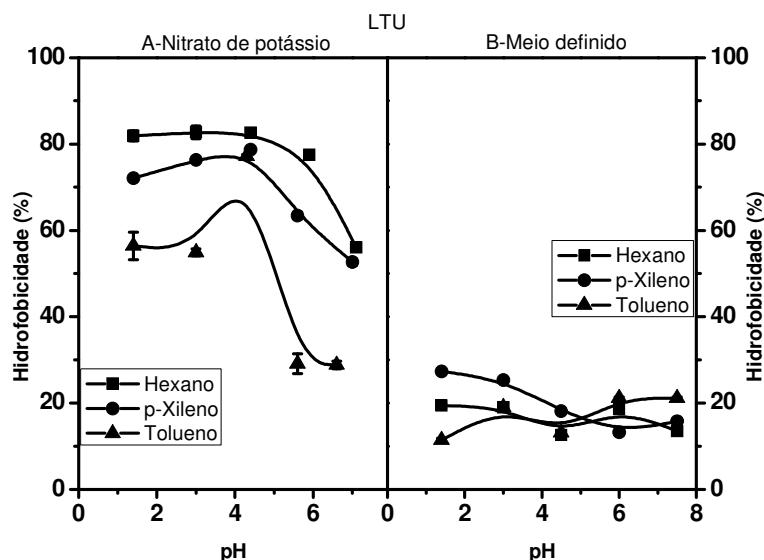


Figura 2: Efeito do pH sobre a hidrofobicidade da linhagem LTU de *Saccharomyces cerevisiae*: A) lavada e suspensa em nitrato de potássio; B) lavada e suspensa no próprio meio; em sistema de duas fases (orgânico /aquoso) utilizando hexano, p-xileno e tolueno.

A Figura 1 mostra o efeito do hidrocarboneto sobre as medidas de hidrofobicidade da levedura FLT-01, quando células previamente lavadas foram suspensas em nitrato de potássio $10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$, bem como, células suspensas no próprio meio de cultivo foram utilizadas nos ensaios realizados para diferentes valores de pH inicial. A hidrofobicidade não variou em função do pH em frente a nenhum dos hidrocarbonetos em meio definido. Porém, variações ocorreram com as células suspensas em nitrato de potássio, sobretudo com tolueno e hexano. O tolueno mostrou uma faixa de pH de máxima

hidrofobicidade que variou de 2,0 a 6,0 (em torno de 90%). As medidas de hidrofobicidade em hexano e tolueno caíram significativamente acima de pH 6,0. O p-xileno manteve hidrofobicidade elevada (90%) em todos os pHs. No entanto, a hidrofobicidade foi máxima (90%) e equivalente para os três hidrocarbonetos a pH 4,0.

A Figura 2 mostra o efeito do hidrocarboneto sobre as medidas de hidrofobicidade da levedura de panificação LTU, quando as células previamente lavadas foram suspensa no próprio meio de cultivo ou em solução de nitrato de potássio 10^{-4} mol.L⁻¹. As medidas foram realizadas nos diferentes valores de pH ajustado. Em meio definido, o grau de hidrofobicidade foi baixo frente aos três hidrocarbonetos (>25%) em toda faixa de pH, enquanto que em nitrato de potássio 10^{-4} mol.L⁻¹ apareceram diferenças de hidrofobicidade em função do pH (55% -80%) e do tipo de hidrocarboneto (maior hidrofobicidade frente ao hexano, 80%).

Os resultados indicam que a linhagem FLT-01 é mais hidrofóbica que a linhagem LTU. No entanto, a hidrofobicidade variou com o pH da suspensão das células e composição da fase líquida. A hidrofobicidade das células da levedura hidrofílica LTU foi muito baixa no meio de cultivo indicando que, apesar de ser um meio definido, o próprio meio de cultivo contém substâncias (secretadas durante o crescimento) que devem apresentar uma adesão maior pelos hidrocarbonetos que as próprias células. Porém, aumentos da hidrofobicidade foram observados com células lavadas da levedura LTU e suspensas em solução diluída de nitrato de potássio, portanto esta levedura pode sintetizar moléculas anfífilas que adsorvem e tornam a superfície hidrofílica, porém removidas quando as células são lavadas.

Referências bibliográficas:

- [1] ROSENBERG, M. Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: water interface, **Crit Rev Microbiol**, v. 18, p. 159, 1991.
- [2] LICHTENBERG, D.; ROSENBERG, M.; SHARFMAN, N.; *et al.* A kinetic approach to bacterial adherence to hydrocarbon, **J. Microbiol Meth**, v. 4, p. 141-146, 1985.
- [3] ROSENBERG, M.; GUTNICK, D. E. FEMS. Adherence of bacteria to hydrocarbons - a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity . **Microbiol Lett**, v. 9, p. 29-33, 1980.
- [4] DESOUSA, S. R.; OLIVEIRA, K. F.; SOUZA, C. S.; KILIKIAN, B. V.; LALUCE, C. Yeast flotation viewed as the result of the interplay of supernatant composition and cell wall hydrophobicity, **Colloids Surfaces B**, v. 29, p. 309, 2003.
- [5] SHARMA, P. K. Surface Studies Relevant to Microbial Adhesion and Bioflotation of Sulphide Minerals. 2001. **Tese de Doutorado**. Lulea University of Technology, Lulea, Sweden, 2001.
- [6] DESOUSA, S. R.; LALUCE, C. Flotation for cell recovery from small volumes of yeasts culture, **Biotchenol Lett**, v.22, p. 753, 2000.
- [7] DESOUSA, S. R.; LALUCE, C.; JAFELICCI, M. Effects of organic and inorganic additives on flotation recovery of washed cells of *Saccharomyces cerevisiae*, **Colloids Surfaces B**, v. 48, p. 77-83, 2006.

Bolsa: CNPq