

EFEITO DA PRESENÇA DO ÍON PRATA NO CULTIVO DE *Saccharomyces cerevisiae*

FRANCINE KERSTNER DE OLIVEIRA¹; ANDRESSA FERNANDES PIVATO²;
ALLANA ARCOS COMITRE³; LUCIELEN OLIVEIRA DOS SANTOS⁴; JAQUELINE
GARDA BUFFON⁵

¹Universidade Federal do Rio Grande – frankerstner@gmail.com

²Universidade Federal do Rio Grande – pivatoandressa@gmail.com

³Universidade Federal do Rio Grande – allana.comitre@gmail.com

⁴Universidade Federal do Rio Grande – santosluciene@gmail.com

⁵Universidade Federal do Rio Grande – jaquelinebuffon@furg.br

1. INTRODUÇÃO

As leveduras são fungos unicelulares e apresentam-se como células simples, que crescem e se reproduzem rapidamente, sexualmente ou assexuadamente. Esses micro-organismos eucariontes podem apresentar formato arredondado, oval ou cilíndrico (MADIGAN et al., 2016).

O gênero *Saccharomyces* possui oito diferentes espécies, comumente empregadas em fermentações de alimentos e bebidas. Dentre elas, a *Saccharomyces cerevisiae* destaca-se por apresentar mecanismos adaptativos, sendo capaz de sobreviver a choques de pH e temperatura, além de estresses oxidativos e toxicidade aos produtos da própria fermentação (PENNINCKX, 2000).

A produção de recursos renováveis vêm sendo o foco de diferentes indústrias, sendo as técnicas biotecnológicas recurso que tem contribuído para as transformações industriais. Devido sua fácil manipulação e rápido crescimento, além da capacidade de obter energia de forma aeróbia, anaeróbia ou mista a *S. cerevisiae* tem sido o micro-organismo mais estudado (NELSON; COX, 2011; SANTOS et al., 2004).

Nos últimos anos, diferentes autores (BADHUSHA; MOHIDEEN, 2016; KORBEKANDI et al., 2016; NIKNEJAD et al., 2015; ZAHRAN et al., 2013) relataram a utilização da levedura *S. cerevisiae* na produção de nanopartículas de prata. Nesta produção, a fonte do elemento metálico é adicionada no meio de cultivo do micro-organismo de interesse, de forma que não apresente toxicidade às células (DUAN; WANG; LI, 2015). No entanto, os íons de prata apresentam como característica alta toxicidade para vasta gama de micro-organismos, em especial as bactérias, e por esse motivo, compostos com base nesse metal são utilizados como agentes antimicrobianos (GADE et al., 2008).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 na presença do íon prata visando sua aplicação futura na produção de nanopartículas.

2. METODOLOGIA

A cultura estoque da levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 7754 foi mantida a 4 °C em ágar Yeast Malt (YM), com composição (g L⁻¹): 10 g glicose, 5 g peptona, 3 g extrato de levedura, 3 g extrato de malte e 20 g de ágar. O inóculo foi preparado a partir da cultura estoque, sendo esta transferida para erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio YM sem ágar, incubada a 30 °C em agitador orbital a 150 rpm, durante 24 h (SANTOS, 2008). O meio de cultivo foi previamente esterilizado a 121 °C e 1,1 atm, por 15 min; a glicose foi esterilizada

separadamente nas mesmas condições e misturada aos demais componentes antes da inoculação.

O cultivo submerso da *S. cerevisiae* foi feito em frascos de 250 mL contendo 100 mL de meio YM sem ágar adicionado de 5% (v/v) de inóculo. O meio de cultivo foi ajustado para pH 6 antes da inoculação, utilizando ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹. O nitrato de prata (AgNO₃) foi adicionado ao cultivo em forma de solução com concentração de 1 mM e posteriormente incubado a 25 °C sob agitação orbital de 100 rpm (BADHUSHA; MOHIDEEN, 2016). Concomitante a essas condições de fermentação, foi realizado o cultivo controle, o qual foi mantido com os mesmos parâmetros de pH, temperatura e agitação, no entanto com a ausência do nitrato de prata.

Os experimentos foram realizados em triplicata e cultivados durante 30 h com amostragens periódicas. A concentração celular foi determinada através da medida da turbidimetria em espectrofotômetro a 600 nm, conforme descrito por Bretanha (2014), sendo necessária a prévia realização da curva padrão da biomassa de *S. cerevisiae*. A determinação da viabilidade celular foi realizada utilizando o método de Azul de Trypan (SURA; SHELTON; WALMSLEY, 2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A concentração celular e viabilidade celular da *S. cerevisiae* para o cultivo controle e com a adição de nitrato de prata no meio podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1 – Concentração e viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* durante cultivo submerso

Tempo de fermentação (h)	Concentração celular (g L ⁻¹)		Viabilidade celular (%)	
	Controle	Ag	Controle	Ag
0	0,13 (2,8)	0,15 (2,0)	100	100
2	0,17 (0,7)	0,15 (1,0)	-	-
4	0,26 (0,4)	0,16 (2,0)	100	35
6	0,57 (4,3)	0,15 (3,9)	-	-
22	2,09 (7,4)	0,16 (0,4)	100	4
24	2,18 (2,3)	0,17 (1,2)	-	-
26	2,25 (1,4)	0,17 (0,4)	97	3
28	2,26 (4,4)	0,17 (1,6)	-	-
30	2,33 (3,3)	0,16 (1,0)	97	3

Concentração de nitrato de prata empregado igual a 1 mM. Dados entre parênteses correspondem ao coeficiente de variação (CV). Os valores apresentados são a média das triplicatas.

Pode-se observar que o cultivo contendo nitrato de prata apresentou concentração constante ao longo do tempo, quando comparado com ao cultivo controle. A concentração inicial de ambos os cultivos apresentou valor médio de 0,14 g L⁻¹, enquanto as concentrações finais foram 0,18 e 2,33 g L⁻¹ para os cultivos com e sem a presença de nitrato de prata, respectivamente.

Após atingir a fase estacionária, o cultivo controle apresentou concentração celular 92% superior ao cultivo contendo a solução de nitrato de prata. Essa diferença deve-se apenas a presença do íon prata ao cultivo, visto que ambos foram realizados sob as mesmas condições de temperatura, pH e agitação.

Segundo Tortora, Funke e Case (2012), a prata é usada como antisséptico em uma solução de nitrato de prata a 1%. No entanto, para o cultivo de *S. cerevisiae* empregando 1 mM de nitrato de prata ao meio de cultivo (aproximadamente 0,017%) já apresentou inibição do crescimento, diminuindo também a viabilidade celular.

Na análise de viabilidade utilizando o método de Azul de Trypan, observou-se que o cultivo contendo nitrato de prata apresentou células com coloração azul, o que caracteriza a inviabilidade das células, visto que não apresentaram resistência à permeabilidade do corante. Após as 30 h de cultivo, a viabilidade celular média foi de 3%. Discordante disso, as células do cultivo controle apresentavam-se transparentes, garantindo a integridade da membrana e a viabilidade celular média ao final do cultivo foi de 97%. Assim, pode-se propor que a presença do íon prata causa danos na membrana celular, levando ao rompimento e inviabilizando dessa forma a célula.

4. CONCLUSÕES

A presença do íon prata através da adição de nitrato de prata ao meio de cultivo da *Saccharomyces cerevisiae* mostrou-se como fator limitante do crescimento celular, inibindo a produção de biomassa e reduzindo a viabilidade celular, mostrando que o emprego de nitrato de prata ao meio de cultivo para produção de nanopartículas de prata pode não ser viável quando busca-se também crescimento celular.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BADHUSHA, M. S. M. B.; MOHIDEEN, M. M. A. K. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae* with different pH and study of antimicrobial activity against bacterial pathogens. **Chemical Science Transactions**, Tirunelveli, v. 5, n. 4, p. 906-911, 2016.
- DUAN, H.; WANG, D.; LI, Y. Green chemistry for nanoparticle synthesis. **Chemical Society Reviews**, Beijing, v. 44, n. 16, p. 5778-5792, 2015.
- GADE, A. K.; BONDE, P.; INGLE, A. P.; MARCATO, P. D.; DURÁN, N.; RAI, M. K. Exploitation of *Aspergillus niger* for synthesis of silver nanoparticles. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n.3, p. 1-5, 2008.
- KORBEKANDI, H.; MOHSENI, S.; JOUNE, G. R. M.; POURHOSSEIN, M.; IRAVANI, S. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, Iran, v. 44, n. 1, p. 235-239, 2016.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D. P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 2011.
- SANTOS, L. O. **Estudo da produção de glutatona a partir de *Saccharomyces cerevisiae* e avaliação da aplicação de campos magnéticos durante as**

fermentações. 2008. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

SANTOS, M. M.; RAGHEVENDRAN, V.; KÖTTER, P.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. **Metabolic Engineering**, Frankfurt, v. 6, p. 352–363, 2004.

SURA, H.; SHELTON, R. M.; WALMSLEY, A. D. Osteoblast viability and detachment following exposure to ultrasound in vitro. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, Birmingham, v. 12, n. 10-12, p. 997-1000, 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2012.

ZAHRAN, M. K.; MOHAMED, A. A.; MOHAMED, F. M.; EL-RAFIE, M. M. Optimization of biological synthesis of silver nanoparticles by some yeast fungi. **Egyptian Journal of Chemistry**, Cairo, v. 56, n. 1, p. 91-110, 2013.