

## INFLUÊNCIA DO NÍQUEL SOBRE ALGUNS PARÂMETROS FISIOLÓGICOS E COMPOSIÇÃO MINERAL DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* Fleischmann

LEITE, César<sup>1</sup>; PRADO, Renata<sup>2</sup>; DE-FARIA, Francys<sup>2</sup>; MARQUES, Tássia<sup>2</sup>; SILVA, Suely<sup>2</sup>; BRAIT, Joys<sup>2</sup>; OLIVEIRA, Silvio<sup>3</sup>; MARIANO-da-SILVA, Samuel<sup>4</sup>

Palavras-chaves: Níquel, Metais pesados, Levedura

### 1. INTRODUÇÃO (Justificativa e Objetivos)

Os metais pesados compreendem em torno de 40 elementos, que apresentam densidade mínima de  $6,0 \text{ g cm}^{-3}$ . Muitos destes metais, como o cobre, o cobalto e o níquel são essenciais para o crescimento de organismos, sendo exigidos em concentrações muito pequenas. Outros, contudo, como o cádmio, não são essenciais para o crescimento celular, sendo extremamente tóxicos mesmo em baixas concentrações. Quando a cana-de-açúcar é oriunda de solos ácidos, onde a absorção e o acúmulo de metais pesados pelas plantas são facilitados, quantidades consideráveis destes metais podem ser encontradas nos colmos das plantas, podendo ser transportados para o processo fermentativo. O processo de fermentação normalmente utilizado no Brasil é o chamado Melle-Boinot, no qual as células de levedura recuperadas são recirculadas no processo, mantendo elevada a concentração celular e obtendo-se deste modo, um aumento do rendimento alcoólico, devido ao menor consumo de açúcar para o crescimento celular. Desta forma, leveduras que crescem em um meio de fermentação com concentrações mesmo subtóxicas de metais pesados, podem apresentar, devido aos ciclos fermentativo e ao fenômeno de bioacumulação, concentrações celulares destes metais maiores que aquelas normalmente encontradas no mosto. O presente trabalho teve como objetivo verificar o acúmulo e os efeitos do níquel (Ni) na composição mineral da levedura *Saccharomyces cerevisiae* Fleischmann fermentando mosto de caldo de cana-de-açúcar (*Saccharum sp*) em quatro níveis de pH e seis níveis de contaminação pelo metal pesado.

### 2. METODOLOGIA

#### 2.1 Levedura e Preparo do Mosto:

A levedura foi adquirida no comércio na forma de blocos de levedura prensada. Estes foram armazenados à  $3^{\circ}\text{C} \pm 1$  até o momento do uso. O caldo foi esterilizado ( $1 \text{ ATM} / 20 \text{ minutos} / 121^{\circ}\text{C}$ ) e diluído com água destilada esterilizada até 12 % de ART. Pela adição de NaOH 0,1 M ou  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,1M, o pH foi ajustado para 3,5; 4,5; 5,5 e 6,5 conforme o tratamento. Os mostos foram então acrescidos com o sal cloreto de níquel ( $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) resultando em seis níveis de contaminações (0,0; 0,1; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0  $\text{mg Ni L}^{-1}$ ) e 24 tratamentos.

#### 2.3 Ensaio fermentativo:

As fermentações foram conduzidas em erlenmeyers de 500 mL, contendo uma quantidade inicial de 250 mL de mosto e 25 g de levedura (mu), em estufa BOD a  $30^{\circ}\text{C} \pm 1$ . O final das fermentações, cuja velocidade foi estimada pela perda de peso ( $\text{CO}_2$ ) a cada hora, ocorreu em 6 horas, quando o fermento foi separado mediante centrifugação e submetido às análises.

#### 2.4 Taxa de viabilidade:

Foi determinada no final das fermentações, segundo a metodologia proposta por Amorim et al. (1989).

## 2.5 Teores de trealose:

A trealose foi extraída segundo a metodologia proposta por Brin, (1966).

## 2.6 Determinação dos teores de níquel, fósforo, potássio, cálcio, ferro, e zinco:

Foram determinadas segundo a metodologia proposta por Varma (1986) submetidas à análise por espectrometria de absorção atômica com atomização por chama de acetileno.

## 2.7 Análise estatística:

A análise de variância (teste de F) foi utilizada para analisar as variáveis, seguida de uma análise sob esquema fatorial, com classificação cruzada e 3 repetições. As comparações de médias foram feitas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey (Snedecor & Cochran, 1967).

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os teores de potássio parecem não variar entre os diferentes tratamentos (Tabela 2), apesar dos teores levemente superiores no nível de pH 4,5. Talvez com a utilização de níveis mais altos de níquel, poderíamos observar as perdas maciças de potássio, causadas por metais pesados e relatadas por Assmann et al., (1996). O níquel, nas concentrações testadas, influenciou nos teores celulares de cálcio e ferro e magnésio (Tabelas 3, 4 e 5). Como pode ser observado, o pH influenciou a ação tóxica do níquel, uma vez que quanto maior o pH menor os teores intracelulares de cálcio e ferro. A diminuição dos teores intracelulares de ferro parece demonstrar que o níquel inibe a enzima ferredoxina responsável pela absorção de ferro. O níquel afetou os teores intracelulares de cálcio. Provavelmente o acúmulo de metais pesados no vacúolo causou o desalojamento do cálcio e magnésio de seus sítios vacuolares, provocando um aumento de íons  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{Mg}^{+2}$  livres no citossol. Como a membrana plasmática é danificada pelo níquel, que provoca a fluidização desta, os canais de transporte são abertos ocasionando uma diminuição do nível intracelular dos íons livres. Os teores celulares de zinco parece não variar nos diferentes tratamentos (Tabela 6). O pH influenciou a absorção de níquel, sendo esta maior em pH 3,5, enquanto no pH 6,5 praticamente não houve absorção (Tabela 1). Em níveis de pH mais elevados, ocorre a formação de óxidos e hidróxidos de níquel, decrescendo a quantidade de íons livres e disponíveis para interação com a levedura, diminuindo a absorção e os sintomas de toxicidade.

Tabela 1 - Teor de níquel ( $\text{mmol kg}^{-1}$  na MS)

| pH  | mmol Ni L <sup>-1</sup> |           |           |           |           |           |
|-----|-------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|     | 0,00                    | 0,10      | 0,50      | 1,00      | 2,00      | 5,00      |
| 3,5 | 0,002 Ea                | 0,0598 Da | 0,0498 Da | 1,4310 Ca | 3,6512 Ba | 5,7877 Aa |
| 4,5 | 0,002 Ca                | 0,0344 Ba | 0,0420 Ba | 0,0679 Bb | 0,2131 Ab | 0,5643 Ab |
| 5,5 | 0,001 Ca                | 0,0523 Ba | 0,0456 Ba | 0,0767 Bb | 0,2456 Bb | 0,8765 Ab |
| 6,5 | 0,002 Ca                | 0,0604 Ba | 0,0382 Ba | 0,0919 Bb | 0,2787 Ab | 0,2398 Ab |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 10,19%

As médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas), não diferem entre si dentro de uma mesma linha ou mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey à 1% de significância.

Tabela 2 – Teor de potássio ( $\text{mol kg}^{-1}$  na MS)

| pH  | mmol Ni L <sup>-1</sup> |        |        |        |        |        |
|-----|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|     | 0,00                    | 0,10   | 0,50   | 1,00   | 2,00   | 5,00   |
| 3,5 | 0,3666                  | 0,3922 | 0,3623 | 0,3581 | 0,3666 | 0,3922 |
| 4,5 | 0,4178                  | 0,4369 | 0,4497 | 0,4455 | 0,4860 | 0,3964 |
| 5,5 | 0,3800                  | 0,3368 | 0,3154 | 0,3261 | 0,3794 | 0,3730 |
| 6,5 | 0,3218                  | 0,3282 | 0,3517 | 0,3538 | 0,3581 | 0,3304 |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 17,67%

Segundo o teste de análise de variância (teste de F), as médias não diferem entre si à 1% de significância.

Tabela 3 – Teor de cálcio ( $\text{mol kg}^{-1}$  na MS)

| pH  | mmol Ni L <sup>-1</sup> |          |         |          |          |         |
|-----|-------------------------|----------|---------|----------|----------|---------|
|     | 0,00                    | 0,10     | 0,50    | 1,00     | 2,00     | 5,00    |
| 3,5 | 27,86Aa                 | 26,61ABa | 25,87Ba | 23,70Ca  | 22,25Cda | 21,83Da |
| 4,5 | 22,87Ab                 | 19,65Bb  | 18,50Bb | 17,26BCb | 17,26Cb  | 17,05Db |
| 5,5 | 21,21Ab                 | 18,71Bb  | 17,26Bb | 14,55BCc | 14,97Cc  | 12,48Cc |
| 6,5 | 17,05Ac                 | 18,71Bb  | 17,05Ab | 16,22Ab  | 13,72Bc  | 10,19Bc |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 3,25%

As médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas), não diferem entre si dentro de uma mesma linha ou mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey à 1% de significância.

Tabela 4 – Teor de ferro ( $\text{mmol kg}^{-1}$  na MS)

| pH  | mmol Ni L <sup>-1</sup> |         |         |         |         |         |
|-----|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
|     | 0,00                    | 0,10    | 0,50    | 1,00    | 2,00    | 5,00    |
| 3,5 | 14,98Aa                 | 13,46Aa | 15,40Aa | 14,33Aa | 13,70Aa | 10,12Aa |
| 4,5 | 6,03Ab                  | 6,26Ab  | 7,30Ab  | 6,51Ab  | 6,10Ab  | 5,79Ab  |
| 5,5 | 5,68Ab                  | 5,88Ab  | 6,66Ab  | 5,68Ab  | 5,03Ab  | 4,40Ab  |
| 6,5 | 4,86Ab                  | 4,84Ab  | 4,26Ab  | 4,60Ab  | 4,73Ab  | 4,47Ab  |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 13,21%

As médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas), não diferem entre si dentro de uma mesma linha ou mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey à 1% de significância.

Tabela 5 – Teor de magnésio (mmol kg<sup>-1</sup> na MS)

|     | mmol Ni L <sup>-1</sup> |         |         |         |         |         |
|-----|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| pH  | 0,00                    | 0,10    | 0,50    | 1,00    | 2,00    | 5,00    |
| 3,5 | 56,91Aa                 | 52,80Ba | 53,83Ba | 51,09Ba | 50,40Ba | 46,29Ca |
| 4,5 | 52,80Ab                 | 50,40Ab | 51,77Ab | 50,06Aa | 42,46Bb | 45,26Ba |
| 5,5 | 52,46Ab                 | 48,34Bc | 47,32Bc | 44,91Cc | 46,29Bb | 40,11Db |
| 6,5 | 46,29Ac                 | 47,66Ac | 48,34Ac | 47,31Ab | 45,94Ab | 39,43Bb |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 6,39%

As médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas), não diferem entre si dentro de uma mesma linha ou mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey à 1% de significância.

Tabela 6 – Teor de zinco (mol kg<sup>-1</sup> na MS)

|     | mmol Ni L <sup>-1</sup> |        |        |        |        |        |
|-----|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| pH  | 0,00                    | 0,10   | 0,50   | 1,00   | 2,00   | 5,00   |
| 3,5 | 3,9354                  | 3,8334 | 3,7671 | 3,5938 | 3,7213 | 3,4307 |
| 4,5 | 3,3950                  | 3,2472 | 3,3033 | 3,3644 | 3,5479 | 3,4409 |
| 5,5 | 3,3186                  | 3,3287 | 3,3491 | 3,2574 | 3,3899 | 3,3236 |
| 6,5 | 3,5989                  | 3,6499 | 3,6601 | 3,5581 | 3,6856 | 3,3848 |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 7,90%

Segundo o teste de análise de variância (teste de F), as médias não diferem entre si à 1% de significância.

Tabela 7 – Taxa de viabilidade (%)

|     | mmol Ni L <sup>-1</sup> |          |          |          |         |         |
|-----|-------------------------|----------|----------|----------|---------|---------|
| pH  | 0,00                    | 0,10     | 0,50     | 1,00     | 2,00    | 5,00    |
| 3,5 | 88,34Ab                 | 82,98ABb | 76,12Bb  | 72,60Bc  | 70,21Bd | 66,90Cd |
| 4,5 | 99,12Aa                 | 95,56ABa | 89,00Bb  | 84,29BCb | 80,78Cc | 76,90Cc |
| 5,5 | 99,77Aa                 | 98,92Aa  | 95,56ABa | 90,67Bb  | 89,39Bb | 87,89Bb |
| 6,5 | 99,56Aa                 | 99,20Aa  | 99,67Aa  | 98,90Aa  | 99,54Aa | 98,07Aa |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 19,60%

As médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas), não diferem entre si dentro de uma mesma linha ou mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey à 1% de significância.

Tabela 8 – Teores de trealose (%)

|     | mmol Ni L <sup>-1</sup> |        |        |        |        |        |
|-----|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| pH  | 0,00                    | 0,10   | 0,50   | 1,00   | 2,00   | 5,00   |
| 3,5 | 3,50Aa                  | 2,70Aa | 1,23Bc | 0,87Bc | 0,01Cb | 0,02Cb |
| 4,5 | 3,90Aa                  | 3,93Aa | 2,10Bb | 1,21Cb | 0,02Db | 0,01Db |
| 5,5 | 3,93Aa                  | 3,88Aa | 3,67Aa | 2,99Aa | 3,00Aa | 2,97Aa |
| 6,5 | 3,81Aa                  | 3,43Aa | 3,55Aa | 3,12Aa | 3,05Aa | 3,00Aa |

COEFICIENTE DE VARIAÇÃO: 7,21%

As médias seguidas pelas mesmas letras (maiúsculas ou minúsculas), não diferem entre si dentro de uma mesma linha ou mesma coluna, de acordo com o teste de Tukey à 1% de significância.

A taxa de viabilidade e os teores de trealose apresentaram uma ótima correlação (Tabelas 7 e 8), sendo a tendência a viabilidade cair com a diminuição do pH e o aumento dos teores de níquel.

#### 4. CONCLUSÃO

A levedura *S. cerevisiae* acumulou níquel em todas as concentrações testadas, sendo que o acúmulo potencialmente aumenta com a reutilização da levedura para subseqüentes fermentações. O níquel parece influenciar nos teores intracelulares de ferro e cálcio, sendo os resultados obtidos semelhantes aqueles apresentados na literatura para outros metais pesados. Os valores de trealose mostraram uma ótima correlação com viabilidade da levedura, sendo este parâmetro reflete o estado fisiológico de estresse ao qual a levedura está submetida.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H. V.; OLIVEIRA, A. J.; ZAGO, E. A.; BASSO, L. C.; GALLO, C. R. *Processos de fermentação alcoólica: seu controle e monitoramento*, FERMENTEC, Piracicaba, 1989.
- ASSMANN, S.; SIGLER, K.; HÖFER, M. Cd<sup>2+</sup> induced damage to yeast plasma membrane and its alleviation by Zn<sup>2+</sup>: studies on *Schizosaccharomyces pombe* and reconstituted plasma membrane vesicles, *Archive of Microbiology*, v.165, n.4, p.279-284, 1996.
- BRIN, M. Tranketalose: clinical aspects, *Methods in Enzimology*, v.9, p.506
- SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. *Statistical methods*, 6. ed., The Iowa State University Press, Ames, 1967.
- VARMA, A. Group IIB elements (Zn, Cd, Hg). In: VARMA, A. *Handbook of atomic absorption analysis*. 3. ed., CRC Press, Boca Raton, v.2, cap.2, p.73

FONTE DE FINANCIAMENTO – CNPq/PIBIC

<sup>1</sup> Bolsista de iniciação científica. Departamento de Ciências Biológicas / Laboratório de Bioquímica, [cesar\\_1leite@yahoo.com.br](mailto:cesar_1leite@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Alunos do Campus Avançado de Jataí/UFG

<sup>3</sup> Professor Campus Avançado de Jataí/UFG

<sup>3</sup> Orientador/Campus Avançado de Jataí/UFG, [smarianos@uol.com.br](mailto:smarianos@uol.com.br)