RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CÉLULAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

Alexandre Maniçoba de Oliveira[1,2], Maria Raquel Manhani[1], Tarcísio Fernandes Leão[3], Isabella Di Stasi[3], Antonio L. Marques[1], Antonio M. Oliveira Neto[1], Sérgio T. Kofuji[1,2], João F. Justo [1,2].

[1]Laboratório Maxwell de Micro-ondas e Eletromagnetismo Aplicado do IFSP, Suzano (SP), Brasil,

[2]Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos da EPUSP, São Paulo (SP), Brasil
[3] Laboratório de Automação para a Vida do IFSP, São Paulo (SP), Brasil.

amanicoba@ifsp.edu.br

Resumo - Nos últimos anos, muitos esforços vêm sendo realizados para incrementar as ferramentas no controle de redução de micro-organismos pelo uso de radiação de micro-ondas, tanto na área da saúde quanto na indústria de alimentos. Este estudo teve como objetivo avaliar o efeito letal da radiação de micro-ondas sobre as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Um total de oito alíquotas de 20 mL de uma suspensão de *S. cerevisiae* em solução salina foi utilizado no estudo, no qual duas delas foram isoladas completamente de qualquer tipo de radiação eletromagnética (amostras controle) e as demais foram bombardeadas em diferentes cenários, variando a potência da radiação em câmara de ressonância a 2,45GHz por um período de 10 segundos. Observou-se uma redução da ordem de 10^2 na concentração das suspensões de leveduras expostas à radiação eletromagnética com 375 W e 750 W de potência.

Palavras-chave: Redução microbiana; Micro-ondas; Radiação não ionizante; Radiodesinfecção; Controle de micro-organismos.

INTRODUÇÃO

A técnica de redução por micro-ondas é realizada pela exposição de micro-organismos à radiação eletromagnética não ionizante, cuja frequência de oscilação está compreendida entre 300MHz e 300GHz, com comprimento de onda entre 1m e 1mm e energia fotônica de 1,24 μeV a 1.24 meV, respectivamente [1], [2], [3], [4].

Nesta exposição, dois tipos de efeitos, os térmicos e os não térmicos, causadores da redução microbiológica podem ocorrer. Os efeitos térmicos são causados por vibração por meio da interação entre moléculas do tipo dipolo e a componente campo elétrico (E-Field) da onda eletromagnética e pelo surgimento de correntes elétricas cujos portadores são íons livres, causando a transferência de energia na forma de calor. Os efeitos não térmicos, por sua vez, relacionam-se à transferência de energia, não na forma de calor, mas como efeitos eletrostáticos polares, promovendo a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), altamente oxidante e letal para muitos micro-organismos, além da quebra de ligações químicas [5], [6], [7], [8].

A peculiar e profundamente detalhada estrutura celular de *Saccharomyces cerevisiae*, vulgarmente conhecida por "levedura de cerveja", faz dela um dos micro-organismos de maior interesse da comunidade científica como um modelo (Real Phanton) para estudo em áreas relacionadas à Biologia, tais como Bioengenharia, Biotecnologia e Tecnologia de Alimentos. Ela é encontrada na forma unicelular, ou na forma de pseudomicélios (filamentos semelhantes às hifas dos bolores). Sua reprodução celular ocorre por brotamento. Sua capacidade de fermentar açúcares específicos é um dos principais fatores de distinção entre outras leveduras [9].

DESENVOLVIMENTO

Transferiu-se um inóculo de *S. cerevisiae* para 100 mL de caldo triptona de soja enriquecido com 1,5% de glicose, previamente esterilizado, seguido de incubação à temperatura de 35ºC por 24 horas. Após incubação, uma alíquota de 20 μL da cultura foi adicionada a 200 mL de solução salina a 0,85% estéril, obtendo-se a suspensão de trabalho.

Adicionaram-se 20 mL da suspensão de trabalho a oito placas de Petri estéreis. Três pares de placas contendo a suspensão de trabalho foram submetidos à radiação de micro-ondas por um período de 10 segundos em um equipamento para uso doméstico, da marca LG, modelo MS3048GA, com potência de entrada de 1250 W e três potências de saída distintas: mínima (10% ou 75W), média (50% ou 375W) e

máxima (100% ou 750 W). Um par de placas de Petri não foi submetido à radiação, sendo considerado o grupo controle.

Neste experimento buscou-se mitigar a possibilidade de redução por efeitos térmicos, de forma que testes preliminares foram realizados com 20 mL de água de maneira que fosse determinada a temperatura final a que as leveduras seriam submetidas durante todo o processo.

A Tabela 1 apresenta as temperaturas atingidas das amostras de 20 mL de água após a exposição por 10 segundos com a radiação ocorrendo em condições de potências mínima, média e máxima. Um processo de repetição ocorreu por três vezes para se obter a média da temperatura dos 20 mL de água ao final da exposição.

TABELA 1 - Valores médios de temperatura da água após exposição a três potências distintas por 10 segundos. n = 3

Potência (W)	Temperatura (ºC)
75	38,3
375	50
750	51

A partir deste primeiro experimento, e com base na temperatura ambiente da sala, que se encontrava em 30°C, constatou-se que a temperatura média final obtida estava apenas 23°C acima da temperatura ambiente, minimizando a probabilidade de que a redução ocorresse devido aos efeitos térmicos.

Imediatamente após os testes de irradiação, um mililitro (1 mL) de todas as amostras de suspensões de levedura, irradiadas e controle, foi transferido para 9 mL de solução salina, resultando na diluição 1:10 (10^{-1}). A seguir, transferiu-se 1 mL desta diluição para outro tubo contendo 9 mL de solução salina, perfazendo a diluição 1:100 (10^{-2}). Finalmente, obteve-se a diluição 1:1000 (10^{-3}) a partir da transferência de 1 mL da diluição 10^{-2} para 9 mL de solução salina.

Alíquotas de 1 mL das diluições 10^{-2} e 10^{-3} de todas as amostras foram inoculadas em profundidade (pour plate) em ágar triptona de soja suplementado com 1,5% de glicose, seguido de incubação a 35º C por 72 horas.

Após o período de incubação, realizaram-se as contagens das unidades formadoras de colônia (UFC) das leveduras nas placas, utilizando-se o procedimento assistido por visão computacional proposto por GEISSMANN [10].

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Observa-se na Tabela 2, que houve uma redução na concentração de células viáveis de *S. cerevisiae* das suspensões expostas ao bombardeamento por radiação eletromagnética por um período de 10 segundos, nas três potências de saída distintas em relação ao controle.

TABELA 2 – Concentrações de *Saccharomyces cerevisae* na amostra controle e nas placas submetidas às potências de saída distintas por 10 segundos.

		Potências (W)		
	Controle	**75**	**375**	**750**
Concentrações (UFC/mL)	$3{,}20 \times 10^5$	$2{,}6 \times 10^4$	$1{,}0 \times 10^3$	$2{,}6 \times 10^3$

Os resultados obtidos neste estudo permitiram constatar que os efeitos não térmicos da radiação de micro-ondas mostraram-se eficientes no controle microbiano, destacando-se as potências média (375 W) e alta (750 W), que causaram uma redução da ordem de 10^2 ou 2 ciclos logarítmicos na concentração da suspensão de leveduras.

Pode-se apresentar a técnica de redução por micro-ondas como método viável para desenvolvimentos futuros, sobretudo na indústria de alimentos, não descartando seu uso como forma de desinfecção ou até mesmo esterilização em procedimentos da área de saúde, ora no tratamento médico como radioterapia, ora na desativação de micro-organismos para a produção de vacinas.

A radiação eletromagnética não ionizante tem como resíduo, oriundo dos efeitos não térmicos, o peróxido de hidrogênio, letal para bactérias do gênero *Streptococcus*, por serem incapazes de produzir a enzima catalase, responsável pela clivagem desta substância.

As espécies *mutans* e *viridans* deste gênero são importantes agentes etiológicos de endocardite bacteriana [11]. Infere-se, desta maneira a possibilidade de aplicação da técnica de redução por micro-ondas, objetivo de estudo deste trabalho, como tratamento auxiliar desta patologia.

REFERÊNCIAS

[1] Theodore, N. D. "Backscattering for localized annealing", U.S. Patent n. 9,153,644, 6 out. 2015.
[2] Bagus, P. S., et al. "Spin-orbit coupling in actinide cations", Chemical Physics Letters, vol. 546, pp. 58-62, 2012.
[3] Wu, Y. e Yao, M. "Inactivation of bacteria and fungus aerosols using microwave irradiation", *Journal of Aerosol Science*, vol. 41, n. 7, pp. 682-693, 2010.
[4] Adam, D. "Microwave chemistry: Out of the kitchen", *Nature*, vol. 421, n. 6923, pp. 571-572, 2003.
[5] Solanki, H. K., Prajapati, V. D. e Jani, G. K. "Microwave Technology—A Potential Tool in Pharmaceutical Science". *ChemInform*, vol. 42, n. 24, 2011.
[6] Kothari, V., Patadia, M. e Trivedi, N. "Microwave sterilized media supports better microbial growth than autoclaved media". *Research in Biotechnology*, vo. 2, n. 5, pp. 63-72, 2011.
[7] Woo, I. S., Rhee, I. K. e Park, H. D. "Differential damage in bacterial cells by microwave radiation on the basis of cell wall structure", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 66, n. 5, pp. 2243-2247, 2000.
[8] Jeng, D. K., et al. "Mechanism of microwave sterilization in the dry state", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, n. 9, pp. 2133-2137, 1987.
[9] Feldmann, Horst. "Yeast: molecular and cell biology", *John Wiley & Sons*, 2011.
[10] Geissmann, Q. "OpenCFU, a new free and open-source software to count cell colonies and other circular objects", *PloS one*, vol. 8, n. 2, pp. e54072, 2013.
[11] Dajani, A. S.et al. "Prevention of bacterial endocarditis", *Circulation*, vol. 96, n.1, pp.358-366, 1997.