

ESTUDO DA RADIAÇÃO DE MICRO-ONDAS NA REDUÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* PARA A BUSCA DE UMA NOVA RADIOTERAPIA DE ENDOCARDITES BACTERIANAS

STUD OF THE *Saccharomyces cerevisiae* CONCENTRATION REDUCTION BY MICROWAVE RADIATION FOR THE SEARCH OF THE A NEW RADIOTHERAPY OF ENDOCARDITES

Alexandre Manicoba De Oliveira¹, Maria Raquel Manhani¹, João F. Justo², Tarcísio Fernandes Leão³, Isabella Di Stasi³, Antonio L. Marques¹, Antonio M. Oliveira Neto¹, Ulisses Brandão¹, Ruan V. De Melo¹.

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

²Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos da EPUSP, São Paulo (SP), Brasil

³Laboratório 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 10² 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; Radio-desinfecção; Controle de micro-organismos.

Abstract

In recent years, many efforts have been made to increase the tools to control the reduction of microorganisms by the use of microwave radiation, both in the health area and in the food industry. This study aimed to evaluate the lethal effect of microwave radiation on *Saccharomyces cerevisiae* yeast cells. A total of eight 20-mL aliquots of a suspension of *S. cerevisiae* in saline solution were used in the study, in which two of them were completely isolated from any type of electromagnetic radiation (control samples) and the others were bombarded in different scenarios, varying the power of the radiation in 2.45GHz resonance chamber for a period of 10 seconds. A reduction of the order of 10² in the concentration of the yeast suspensions exposed to the electromagnetic radiation with 375 W and 750 W of power was observed.

Keywords: Microbial reduction; Microwave; Non-ionizing radiation; Radio-disinfection; Control of microorganisms.

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 dipolos de moléculas e a componente campo elétrico (E-Field) da onda eletromagnética e também 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 Phantom) 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 pseudomicélio (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].

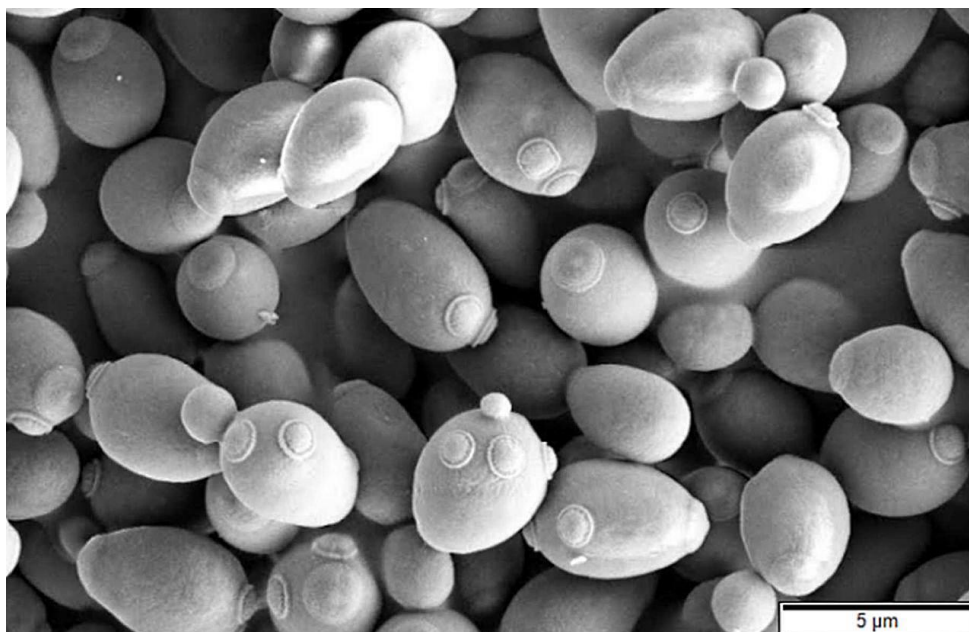


Figura 1: Exemplos de *Saccharomyces cerevisiae* [10].

Desenvolvimento

Transferiu-se um inóculo de *S. cerevisiae* para 100 mL de caldo tripton de soja enriquecido com 1,5% de glicose, previamente esterilizado, seguido de incubação à temperatura de 35°C 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 (°C)
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 35° 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 [11].

Na sequência são apresentados os possíveis efeitos da exposição a radiação de micro-ondas, sofridos pelos micro-organismos descritos neste estudo.

Efeitos da radiação de micro-ondas

O principal efeito da radiação de micro-ondas em um meio é o térmico, sendo que – diferentemente das radiações com frequências da faixa do visível para cima – sua interação com a matéria não se dá pela absorção da onda por um elétron ou pelo núcleo de um átomo, mas pela ação do campo elétrico das ondas eletromagnéticas sobre os dipolos existentes entre moléculas polares. O campo elétrico da onda interage com o dipolo provocando a rotação das moléculas ao buscar o alinhamento com o campo elétrico e este movimento é calor [12] [13]. Assim sendo, a efetividade de interação de cada meio com uma dada frequência de micro-ondas está diretamente relacionada com a sua constante dielétrica.

O aquecimento com uso de micro-ondas tem algumas diferenças notáveis quando comparado com o aquecimento convencional:

1- Para um meio que contenha um componente capaz de acoplar com uma frequência de onda incidente pode-se conseguir velocidades de aquecimento muito maiores.

2 – A fonte de energia pode remota, ou seja, pode estar distante do ponto de aplicação/uso.

3 – Cada material interage com intensidade diferente e, assim, pode-se conseguir aquecimento seletivo dentro de um mesmo sistema [14].

Além destes, podem também ocorrer efeitos não térmicos como o aumento do rendimento de reações, conduzidas em meio apolar ou sem solvente, que tenham transições polares [15], deslocamento de elétrons dentro de uma molécula [16], redução da energia de ativação de algumas reações [17], aumento da probabilidade de contato entre moléculas de reagentes – aumentando, portanto, a velocidade de reação – devido à fricção e mobilidade provocada pela micro-onda [18].

Outras possibilidades oferecidas pelas micro-ondas são:

1 - Seletividade quanto ao catalizador: Catalizadores polares absorvem energia de forma diferenciada e alcançam temperaturas superiores à temperatura global do meio reacional [19], [20].

2 – Uso de susceptores: Susceptores são materiais que absorvem micro-ondas eficientemente e transferem a energia térmica gerada às moléculas na vizinhança que não tenham esta eficiência. Embora a transmissão de energia ocorra de modo convencional, ela é mais rápida que o aquecimento convencional [21], [22].

3 – Durabilidade/estabilidade do catalizador: Como as reações assistidas por micro-ondas são mais rápidas isto reduz o tempo de exposição dos catalizadores a altas temperaturas. Processos catalíticos com tempos de reação mais curtos preservam o catalisador da desativação e decomposição, aumentando assim a sua vida útil.

Desta forma, na próxima Seção, serão apresentados os resultados dos testes a exposição à radiação não-ionizante de micro-ondas, dos micro-organismos e seu efeito direto na redução da formação de colônias.

Resultados e discussões

Após a exposição à radiação de micro-ondas, observou-se uma redução na concentração de células viáveis de *S. cerevisiae* das suspensões expostas ao bombardeamento eletromagnético por um período de 10 segundos, nas três potências de saída distintas em relação ao controle, como apresenta a Tabela 2.

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

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

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 de 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*, *viridans* a *bovis*, deste gênero são importantes agentes etiológicos de endocardite bacteriana [23], [24]. 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.

Endocardite Bacteriana

Endocardite Bacteriana (EB) é uma doença infecciosa, onde patógenos invadem a superfície endocárdica, provocando danos e inflamação. Normalmente, uma biota (vegetação) composta, principalmente, de fibrina e plaquetas, além dos agentes infecciosos, se estabelece nas válvulas cardíacas.

O diagnóstico é realizado por ecocardiograma transtorácico ou transesofágico, sendo o segundo com melhores resultados de sensibilidade e especificidade [25]. Apesar dos avanços na quimioterapia, a letalidade da EB está entre 13 e 40%. A variação da letalidade pode ser atribuída ao perfil variável e dinâmico da vegetação, às causas e complicações clínicas, além do diagnóstico por ecocardiograma. A incidência da EB varia entre 1,7 e 6,2/100.000 pessoas/ano, com idades entre 30 e 40 anos, acometendo mais homens que mulheres.

Alterações valvares degenerativas e próteses são as causas mais comuns.

Idade acima de 40 anos, insuficiência cardíaca classe IV ou choque cardiovascular, sepse não-controlada, distúrbios de condução e arritmia são fatores preditivos de maior mortalidade [26].

Streptococcus e *Stafilococcus* são bactérias que figuram como as principais causas de EB. Estas bactérias são amplamente encontradas na biota bucal e intestinal, normalmente não causando doenças, mas ao serem combinadas aos fatores de risco, podem levar a EB e posteriormente a morte [27].

A *Streptococcus* é uma bactéria do grupo D, que pode causar a endocardite. Esta é responsável por 14% dos casos de EB [28]. A *Streptococcus bovis* está entre as principais causas de EB e está associada à neoplasia colônica. Sua ação, tipicamente, acomete a válvula aórtica, tendo como consequência e complicação a insuficiência cardíaca congestiva, acompanhada de abscesso valvular e tromboembolismo sistêmico [24].

Métodos de tratamento alternativos ou complementares à quimioterapia, tal como o método proposto neste trabalho utilizando redução por micro-ondas, são importantes para evitar ou mitigar a insuficiência cardíaca por EB.

Conclusão

Através deste estudo, pôde-se avaliar o efeito letal da radiação de micro-ondas sobre as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, geralmente considerada na literatura como Real Phantom.

Um total de oito alíquotas de 20 mL de uma suspensão de *S. cerevisiae* em solução salina foram utilizados neste estudo, sendo que duas delas foram isoladas completamente de qualquer tipo de radiação eletromagnética (amostras controle) e as demais foram bombardeadas eletromagneticamente 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, levando-nos a crer que: Devido aos efeitos não térmicos, houve uma alteração no metabolismo dos micro-organismos, especificamente devido a síntese de peróxido de hidrogênio, o que levou estes a uma condição limitadíssima para o suporte a vida.

Desta forma, conclui-se que a exposição à radiação não-ionizante de 2,45 GHz, a uma potência de até 750W, por um não maior que 10 segundos, é letal para micro-organismos como as células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, inferindo-se assim esta condição de rádio desinfecção a bactérias do gênero *Streptococcus*, que nas espécies *mutans* e *viridans* são agentes etiológicos de endocardite

bacteriana, abrindo um novo horizonte para a busca de uma rádio terapia deste tipo de patologia cardíaca.

Referências

- [1] N. D. Theodore, "Backscattering for localized annealing", U.S. Patent n. 9,153,644, 6 out. 2015.
- [2] P. S. Bagus, et al. "Spin-orbit coupling in actinide cations", *Chemical Physics Letters*, vol. 546, pp. 58-62, 2012.
- [3] Y. Wu, e M. Yao, "Inactivation of bacteria and fungus aerosols using microwave irradiation", *Journal of Aerosol Science*, vol. 41, n. 7, pp. 682-693, 2010.
- [4] D. Adam, "Microwave chemistry: Out of the kitchen", *Nature*, vol. 421, n. 6923, pp. 571-572, 2003.
- [5] H. K. Solanki, V. D. Prajapati e G. K. Jani, "Microwave Technology—A Potential Tool in Pharmaceutical Science". *ChemInform*, vol. 42, n. 24, 2011.
- [6] V. Kothari, M. Patadia e N. Trivedi, "Microwave sterilized media supports better microbial growth than autoclaved media". *Research in Biotechnology*, vo. 2, n. 5, pp. 63-72, 2011.
- [7] I. S. Woo, I. K. Rhee e H. D. Park, "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] D. K. Jeng, et al. "Mechanism of microwave sterilization in the dry state", *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 53, n. 9, pp. 2133-2137, 1987.
- [9] H. Feldmann, "Yeast: molecular and cell biology", *John Wiley & Sons*, 2011.
- [10] M. D. Murtey, P. Ramasamy, "Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy—Life Sciences." In: *Modern Electron Microscopy in Physical and Life Sciences*. InTech, 2016.
- [11] Q. Geissmann, "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.
- [12] N. E. Hill, W. E. Vaughan, A. H. Price and M. Davies, "Dielectric Properties and Molecular Behaviour", *van Nostrand*, New York, 1969.
- [13] M. Davies, "Some Electrical and Optical Aspects of Molecular Behaviour", *Commonwealth and International Library of Science, Technology and Liberal Studies*, Pergamon Press, Oxford, 1962.
- [14] D. R. Baghurst and D. M. P. Mingos, "Applications of microwave dielectric heating effects to synthetic problems in chemistry", *Chem. Soc. Rev.*, 1991, 20, 1-47.
- [15] L. Perreux and A. Loupy, "A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations", *Tetrahedron*, 2001, 57, 9199;
- [16] V. Polshettiwar and M. P. Kaushik, "Tighter ion pair effect and scale-up study in microwave assisted aminolysis of enolizable esters using potassium tert-butoxide (t-BuOK)", *Indian J. Chem. B*, 2005, 44, 773.
- [17] A. Miklavc, "Strong acceleration of chemical reactions occurring through the effects of rotational excitation on collision geometry", *ChemPhysChem*, 2001, 552
- [18] J. G. P. Binner, N. A. Hassine and T. E. Cross, "The possible role of the pre-exponential factor in explaining the increased reaction rates observed during the microwave synthesis of titanium carbide", *J. Mater. Sci.*, 1995, 30, 5389
- [19] N. F. K. Kaiser, U. Bremberg, M. Larhed, C. Moberg and A. Hallberg, "Fast, Convenient, and Efficient Molybdenum-Catalyzed Asymmetric Allylic Alkylation under Noninert Conditions: An Example of Microwave-Promoted Fast Chemistry", *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, 39, 3595.
- [20] D. Bogdal, M. Lukasiewicz, J. Pielichowski, A. Miciak and Sz. Bednarz, "Microwave-assisted oxidation of alcohols using Magtrieve™", *Tetrahedron*, 2003, 59, 649.
- [21] T. Razzaq, J. M. Kremsner and C. O. Kappe, "Investigating the existence of nonthermal/specific microwave effects using silicon carbide heating elements as power modulators.", *The Journal of organic chemistry.*, 2008, 73, 6321.
- [22] N. E. Leadbeater and H. M. Torrenius, "A study of the ionic liquid mediated microwave heating of organic solvents", *J. Org. Chem.*, 2002, 67, 3145.

- [23] A. S. Dajani, et al. "Prevention of bacterial endocarditis", *Circulation*, vol. 96, n.1, pp.358-366, 1997.
- [24] J. Waisberg; C. Matheus; J. Pimenta, "Infectious Endocarditis From Streptococcus Bovis Associated With Colonic Carcinoma: Case Report And Literature Review", *Arq Gastroenterol*, vol. 39, n. 3, p. 177-180, 2002.
- [25] M. M. Barbosa, "Endocardite Infecciosa: Perfil Clínico em Evolução", *Arq Bras de Cardiol*, vol. 83, n. 3, 2004.
- [26] M. Costa, et al. "Índice de risco de mortalidade por endocardite infecciosa: um modelo logístico multivariado", *Braz J Cardiovasc Surg*, vol. 22, n. 2, p. 192-200, 2007.
- [27] A. Barcelos, et al. "Endocardite Infecciosa por Streptococcus Bovis em Paciente com Carcinoma Colônico", *Arq Bras Cardiol*, vol. 95, n. 3, p. E88-E90, 2010.
- [28] A. Ferrari, et al. "Colonoscopy is mandatory after Streptococcus bovis endocarditis: a lesson still not learned: case report", *World J Surg Oncol*, vol. 49, n. 6, 2008.