

Eloi A. Silva Filho* e Pedro L. O. Volpe

Instituto de Química - Unicamp - 13083-970 - Campinas - SP

Recebido em 28/10/97; aceito em 20/10/98

CALORIMETRIC STUDY ON THE INTERACTION OF ALCOHOLS WITH *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). The calorimetric experiments based on technique breaking ampoule were carried out by measuring of the heat of solution of alcohol in isotonic solution (NaCl 0.10 M) and alcohol in suspension of Sc at 298 K. From these data the enthalpy of interaction alcohol with suspension of Sc ($\Delta_{\text{tr}}H^\circ$) was calculate by Hess law. In this study, the results indicate that the enthalpy of interaction of aliphatic alcohol (C_2-C_8) with suspensions of Sc is a process exothermic and becomes more exothermic with increasing of $-CH_2$ group of alcohol in range -1,14 to -4,0 kJ.mol⁻¹. We concluded that enthalpy of interaction shows a linear relationship with increasing of alcohol's lipophilicity, in agreement with Traube's rule.

Keywords: calorimetry; alcohols; *saccharomyces cerevisiae*.

INTRODUÇÃO

Interações hidrofóbicas são muito importantes na área de química, incluindo a química de processos *in vivo*, interações enzima-substrato, os conjuntos lipídicos em biomembranas e micelas¹.

Kauzmann foi um dos primeiros a estudar este fenômeno (efeito hidrofóbico), inicialmente denominou de *ligação hidrofóbica* e o definiu como sendo a tendência das moléculas de uma proteína se agruparem uma às outras em meio aquoso². Modelos semelhantes podem ser observados para soluções de hidrocarbonetos em água, soluções aquosas de tensoativos e outras soluções contendo moléculas apolares como álcoois, éteres, ésteres e aminas. Posteriormente, Tanford³ denominou este mesmo fenômeno descrito por Kauzmann de *efeito hidrofóbico* e o define como sendo as interações que ocorrem entre grupos apolares ($-CH_2$) de cadeias de hidrocarbonetos.

Atualmente a aplicação da calorimetria no estudo de sistemas de natureza biológica, abrange praticamente, todos os processos de natureza química, física e biológica que são acompanhados pela liberação ou absorção de calor. Métodos de medidas da variação da entalpia, métodos calorimétricos, são portanto de um interesse potencial para todos os tipos de análises químicas e biológicas. No entanto, a grande quantidade de substâncias necessárias para a calorimetria convencional e sua baixa sensibilidade foram sempre fatores limitantes⁴.

Avanços na tecnologia dos sensores Peltier ou termopilhas⁵ têm permitido a aplicação de técnicas calorimétricas no estudo de sistemas biológicos complexos devido à detecção de pequenas quantidades de calor, utilizando amostras reduzidas, que podem ser definidas como soluções diluídas. Esta técnica recebeu a denominação de microcalorimetria biológica (MB)⁶.

MB é uma técnica valiosa para monitorar em tempo real uma grande variedade de processos biológicos e sendo uma técnica não específica, não destrutiva, não exige, que a amostra ou o sistema a ser analisado tenha algum tipo de tratamento podendo-se usar soluções de compostos bioquímicos, suspensões grosseiras, células, microrganismos, etc.

Pelo fato de não requerer soluções opticamente transparentes, a MB tem mais esta vantagem sobre os métodos espectrofotométricos⁷.

O efeito térmico que acompanha por exemplo uma reação pode ser registrado em tempo real por meio desta técnica. O registro do efeito térmico durante um processo biológico é chamado de entalpograma. O entalpograma ou curva dq/dt (J/s) x tempo, (Nomenclature of Thermometric and Enthalpimetric Methods in Chemical Analysis, 1994)⁸ determina em tempo real o calor desenvolvido no processo.

A grande contribuição da microcalorimetria no estudo de sistemas bioquímicos está na possibilidade de propor modelos para os processos investigados através da análise dos entalpogramas⁹. Na indústria, principalmente na área farmacêutica, a microcalorimetria é usada para a determinação da velocidade de decomposição de produtos, dissolução, interação enzima-substrato, e mais recentemente é utilizada em estudos de QSAR (Relações Quantitativas de Atividade-Estrutura) sendo que neste caso inclui as interações sistema químico-sistema microbiológico em esquema grupo-aditivo de séries homólogas¹⁰. No entanto, para analisar os dados obtidos com séries homólogas em geral segue-se a regra de Traube¹¹ que tem o enunciado de que uma série homóloga de tensoativos, tem sua atividade superficial em solução aquosa aumentando de maneira linear com o aumento do grupo metilênico $-CH_2$.

O objetivo deste estudo é determinar a entalpia de transferência ($\Delta_{\text{tr}}H^\circ$) de álcoois alifáticos ($C_2 - C_8$) em suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) utilizando o método calorimétrico de quebra de ampola.

PARTE EXPERIMENTAL

Método de preparação das suspensões de *Saccharomyces cerevisiae*

As suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) (FTPT 754) foram preparadas pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia com uma quantidade de $1,3 \times 10^{10}$ células de Sc por mL. O crescimento das células foi acompanhado por medidas de densidade ótica (colorímetro EEL). As células foram centrifugadas, lavadas duas vezes com solução de Ringer contendo 10% m/m de dimetilsulfóxido (DMSO). Após a última centrifugação, as células foram novamente suspensas em solução de Ringer contendo 10 % de DMSO e acondicionadas em ampolas de polipropileno de 2,0 mL (marca Sterilin). As ampolas foram encaixadas numa placa fina e perfurada de isopor sendo a própria tampa de um recipiente de alumínio contendo

* Endereço atual: Departamento de Química, Universidade Federal do Espírito Santo, (UFES), 29060-900, Vitória-ES, e-mail: eloi@npd.ufes.br

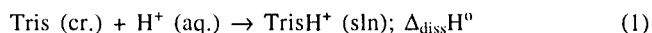
nitrogênio líquido. A placa de isopor foi mantida a uma altura de 8 cm acima do nível do nitrogênio e quando a temperatura na ampola controle atingiu - 80°C (medida com um termômetro de álcool), as ampolas foram liberadas para imersão no nitrogênio líquido e estocadas num cilindro criogênico¹². A suspensão de microrganismo utilizada no calorímetro foi sempre feita imediatamente após o descongelamento da ampola por 3 minutos em um banho de água a 36°C seguida de agitação por 20 segundos e finalmente com um pipetador automático (calibrado 0,49±0,03 mL) foi adicionado 3,0 mL destas suspensões de Sc em 100 mL de uma solução isotônica (NaCl 0,10 M), de modo que a atividade metabólica observada foi determinada de acordo com o método descrito por Battley e DiBiase¹³.

Os álcoois etanol, butanol-1, hexanol-1 e octanol-1, fornecidos pela Ecibra e Merck, p.a., foram previamente bidestilados, sendo que o etanol foi tratado com iodo e magnésio refluxado por 8 horas e destilado, depois secado com óxido de cálcio (calcinado) e recolhido somente a fração destilada na faixa de 78,0 a 78,5°C.^{14,15}

Método Calorimétrico

As medidas da variação de entalpia $\Delta_{int}H^0$ dos álcoois (C_2 - C_8) com as suspensões de Sc foram determinadas no sistema calorimétrico LKB-8700 utilizando o método de quebra de ampolas. Inicialmente fizemos uma calibração utilizando para isto a reação de dissolução do Tris(hidroximetilaminometano) ou Tris ($C_4H_{11}O_3$, da Riedel-De Häenag) em solução de HCl. Esta reação, proposta por Wadsö,¹⁶ é atualmente recomendada pela IUPAC passando a ser uma reação padrão em diversos laboratórios que utilizam técnicas calorimétricas para verificar a precisão e exatidão do calorímetro^{17,18}.

O processo de quebrar ampolas (com Tris em seu interior) em solução de HCl 0,1 M é descrito pela equação:



Para a calibração do calorímetro foi usado o padrão primário, Tris (hidroximetil)aminometano, $C_4H_{11}O_3N$, da Riedel-De Häenag, que foi triturado e recristalizado por sublimação a vácuo em atmosfera de nitrogênio sob temperatura de 140°C durante uma hora¹⁹. Sua pureza foi determinada por titulação potenciométrica (potenciômetro digital da Metrohm Herisau E-500) com HCl 0,01 M, mostrando ser 99,9% puro. O procedimento experimental de quebra de ampolas contendo Tris (27,2 a 50,6 mg) foi feito utilizando 90 mL de uma solução de HCl 0,1 M no interior do vaso calorimétrico, sendo quebrada uma média de cinco ampolas no interior de uma mesma solução de HCl 0,1 M, que através da representação gráfica (Figura 1) do calor observado (Q_{obs}/J) no processo em função do número de moles de Tris obteve-se uma reta cujo coeficiente angular corresponde a entalpia de dissolução $\Delta_{diss}H^0 = -29,70 \pm 0,10 \text{ kJ.mol}^{-1}$, sendo concordante com os demais valores da literatura²⁰⁻²³. O mesmo procedimento foi utilizado para determinar a entalpia álcool/solução isotônica (Δ_aH^0) e álcool/células de Sc (Δ_bH^0) e os resultados são apresentados na Tabela 1.

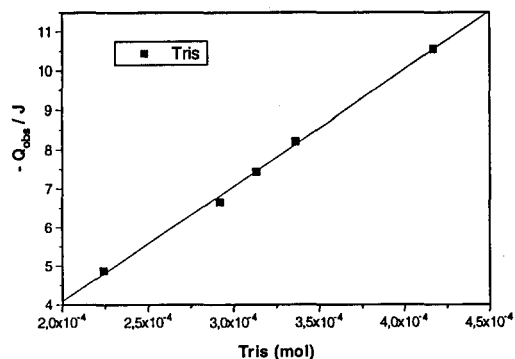


Figura 1. Entalpia de dissolução do Tris em HCl 0,1 M a 298 K.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação experimental da entalpia de interação de álcoois alifáticos (C_2 - C_8) com suspensões de Sc foi feita com o interesse de verificar a contribuição aditiva dos grupos - CH_2 do álcool (efeito lipofílico) em sistemas de natureza biológica, portanto mais complexo que o sistema micelar.

Nestes sistemas, as condições de equilíbrio são uma simplificação não realística e condições de quase equilíbrio (por tratar-se de sistemas complexos) ocorrerão para certos compartimentos do sistema e por tempo definido, somente sob circunstâncias controladas²⁴. Usando a técnica de quebra de ampolas anteriormente descrita na parte experimental fez-se medidas da entalpia de interação ou transferência ($\Delta_{irs}H^0$) de álcoois alifáticos (C_2 - C_8) com suspensões de Sc. No cálculo desta entalpia de interação foi descontado o efeito térmico da solução de álcool em água, e aplicando a lei de Hess (Figura 2) obteve-se o valor da entalpia de interação $\Delta_{irs}H^0$.

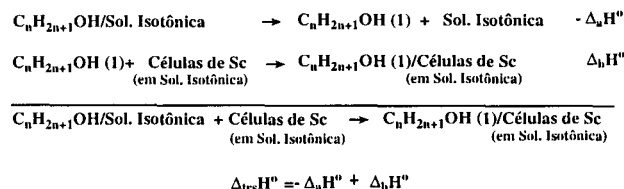


Figura 2. Lei de Hess para calcular $\Delta_{irs}H^0$.

Os valores da entalpia de interação álcool/células de Sc em solução isotônica (NaCl 0,10 M) assim como as entalpia do processo representado por Δ_aH^0 e Δ_bH^0 relacionados anteriormente para os álcoois alifáticos (C_2 - C_8) estão descritos na Tabela 1 e Figura 3 respectivamente.

No presente trabalho todos os experimentos foram feitos na mesma temperatura ($25,0 \pm 0,1^\circ\text{C}$), mesma concentração das suspensões de células de Sc em solução isotônica, meio

Tabela 1. Entalpia de interação de álcoois/Sc a 298 K.

Álcoois	Quantidade de álcool adicionada mol	- Δ_aH^0 kJ.mol ⁻¹	- Δ_bH^0 kJ.mol ⁻¹	- $\Delta_{irs}H^0$ kJ.mol ⁻¹
EtOH	$5,21 \times 10^{-3}$	$6,56 \pm 0,23$	$7,70 \pm 0,20$	$1,14 \pm 0,30$
Propanol-1	$5,51 \times 10^{-3}$	$7,03 \pm 0,30$	$8,58 \pm 0,20$	$1,55 \pm 0,36$
Butanol-1	$4,51 \times 10^{-3}$	$5,01 \pm 0,40$	$6,49 \pm 0,23$	$1,48 \pm 0,46$
Pentanol-1	$3,82 \times 10^{-3}$	$3,57 \pm 0,20$	$6,07 \pm 0,20$	$2,50 \pm 0,28$
Hexanol-1	$4,51 \times 10^{-3}$	$2,46 \pm 0,01$	$5,97 \pm 0,07$	$3,51 \pm 0,07$
Heptanol-1	$2,30 \times 10^{-3}$	$2,46 \pm 0,14$	$6,07 \pm 0,07$	$3,43 \pm 0,16$
Octanol-1	$1,96 \times 10^{-3}$	$0,50 \pm 0,02$	$4,33 \pm 0,07$	$3,83 \pm 0,07$

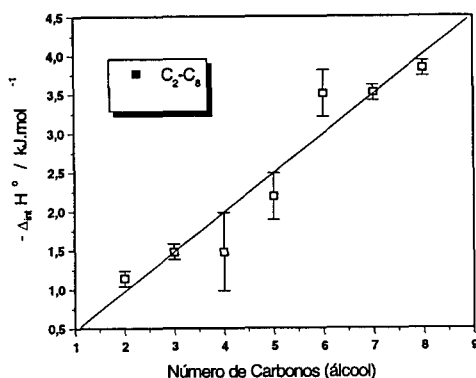


Figura 3. Entalpia de interação de álcoois alifáticos com suspensões de Sc.

aeróbico e mesma sensibilidade no calorímetro. Desta maneira, os dados foram calculados para se ter uma idéia do efeito térmico envolvido na transferência do álcool para as suspensões de células de Sc a contribuição aditiva por grupo $-\text{CH}_2$ do álcool. Observou-se que a tendência linear, apresentou uma boa correlação ($r = 0,99344$), tendo uma representação da equação da reta para a entalpia de transferência álcool/células de Sc ($\Delta_{\text{int}}H^\circ = 0,47(\text{CH}_2) + 0,14$), e um desvio padrão para os sete pontos menor que 0,01%. Desta forma, a interação álcool/células de Sc é um processo exotérmico e que torna-se mais exotérmico com o aumento de grupos $-\text{CH}_2$ do álcool resultando num valor de $\Delta_{\text{int}}H^\circ$ na faixa de $-1,14$ a $-4,0$ kJ/mol. Os estudos mais recentes feitos por Battley e colaboradores²⁵ descrevem que medidas de capacidade de calor (C_p) para um grande número de moléculas biológicas com diferentes graus de complexidade, incluindo açúcares, aminoácidos, proteínas e DNA tem sido determinados através da técnica calorimétrica, e utilizando esta técnica determinaram valores das funções termodinâmicas C_p , ΔS° , ΔG° e ΔH° , para composições liofilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* na faixa de temperatura de 10 a 300 K, sendo que na temperatura de 298,15 K a entropia é $1,30 \text{ J.K}^{-1}.\text{g}^{-1}$ e concluem que o efeito termodinâmico sobre a organização celular em células liofilizadas de Sc é desprezível.

Este estudo forneceu novas informações sobre o efeito térmico produzido em sistemas biológicos, e acrescentamos à regra de Traube¹¹ a condição de que não só as séries homólogas de tensoativos seguem uma linearidade em meio aquoso, com o aumento do grupo $-\text{CH}_2$, mas também isto é verdadeiro para séries homólogas de álcoois em suspensões de *Saccharomyces cerevisiae*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAP o apoio

financeiro recebido durante a realização deste trabalho. Agradecem também à Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia (FTPT) pela preparação das suspensões de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc).

REFERÊNCIAS

1. Blokzijl, W.; Engberts, J. B. F. N.; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 1545.
2. Kauzmann, W.; *Advances in Protein Chemistry*, **1959**, 14, 1.
3. Tanford, C.; *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes*, 2a ed.; Wiley-Interscience Publication: New York 1973.
4. Katherine, E.; Hecht, M.; Cooper, A.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1993**, 89, 2693.
5. Volpe, P. L.; *Quím. Nova* **1993**, 16, 49.
6. Beezer, A. E.; *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, London 1980, 343.
7. Johnson, E. R.; Biltonen, R. L.; *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, 97, 2349.
8. Stahl, J. W.; *Pure & Appl. Chem.* **1994**, 66, 2487.
9. Wadsö, I.; *Thermochim. Acta* **1985**, 96, 313.
10. Volpe, P. L.; Montanari, C. L.; *Quím. Nova* **1997**, 20, 125.
11. Nakagawa, T.; Shinoda, K.; *Colloidal Surfactants*, Academic Press, New York 1963.
12. Kirsop, B. E.; Snell, J. J.; In *Maintenance of Microorganisms*, Academic Press, New York 1984.
13. Battley, E. H. e DiBiase, G.; *Biotechnol. Bioeng.* **1980**, 22, 2417.
14. Vogel, A. I.; *Practical Organic Chemistry*, 3ª ed.; Longman: London 1962.
15. Marcus, Y.; Glikberg, S.; *Pure & Appl. Chem.* **1985**, 57, 855.
16. Wadsö, I.; *Acta Chem. Scand.* **1968**, 22, 927.
17. Herington, E. F. G.; *Pure & Appl. Chem.* **1974**, 40, 392.
18. Poore, V. M.; Beezer, A. E.; *Thermochim. Acta* **1983**, 63, 83.
19. Koch, W. F.; Bigg, D. L.; Dieh, H.; *Talanta* **1975**, 22, 637.
20. Gunn, S. R.; *J. Chem. Thermodyn.* **1970**, 2, 535.
21. Hill, J. O.; Ojelund, G.; Wadsö, I.; *J. Chem. Thermodyn.* **1969**, 1, 111.
22. Silva Filho, E. A.; *Dissertação de Mestrado*, Instituto de Química, Unicamp, Campinas, SP, 1988.
23. Volpe, P. L. O. e Silva Filho, E. A.; *Thermochim. Acta* **1995**, 257, 59.
24. Beezer, A. E.; Volpe, P. L. O.; Miles, R. J.; Hunter, W. H.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I.* **1986**, 82, 2929.
25. Battley, E. H.; Putnam, R. L.; Boerio-Goates, J.; *Thermochim. Acta* **1997**, 298, 37.