



Determinação Potenciométrica de Efluxo de Potássio em Bactérias Lácticas do Vinho Sujeitas a Stress Químico

Francisco M. Campos, José A. Couto, Timothy A. Hogg, António O. S. S. Rangel, Ildikó V. Tóth

Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa
Rua Dr. António Bernardino de Almeida, 4200-072 Porto

Introdução

O efluxo celular de potássio (K^+) é um dos principais indícios de danos na membrana citoplasmática de células sujeitas a stresses químicos ou físicos [1]. A saída de K^+ pode ser medida indirectamente utilizando métodos potenciométricos ou fotométricos (fotometria de chama), os quais quantificam a concentração do ião no meio de suspensão [2].

A presença de alguns ácidos fenólicos no meio extracelular constitui um stress químico para as bactérias. Os ácidos atravessam a membrana citoplasmática provocando uma elevação do pH extracelular.

O objectivo principal deste trabalho é obter um sistema potenciométrico de monitorização simultânea da concentração extracelular de K^+ e de H^+ . Pretende-se ainda, comparar o efeito de vários ácidos fenólicos presentes no vinho no efluxo de potássio.

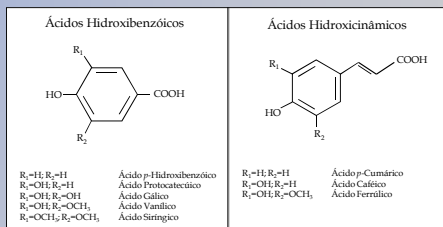
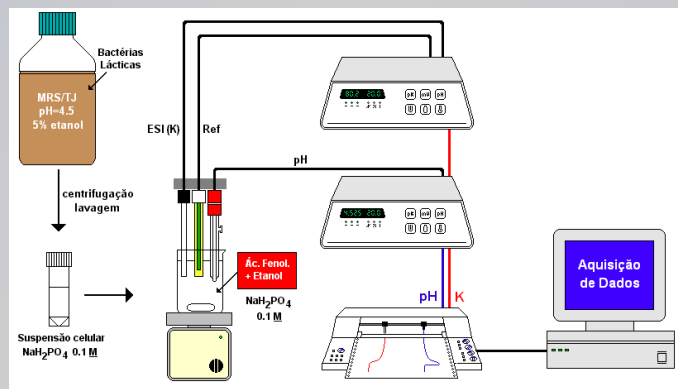


Figura 1 – Fórmulas estruturais de ácidos fenólicos existentes no vinho

Sistema de monitorização



Materiais e Métodos

Neste estudo foram utilizadas uma estirpe de *Lactobacillus hilgardii* e outra de *Oenococcus oeni*, ambas bactérias lácticas do vinho. Após crescimento em meio de cultura (MRS/TJ modificado [3]), as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em solução-tampão 0.1 M de NaH_2PO_4 . Em seguida, foram submetidas a um stress químico com soluções alcoólicas concentradas de ácidos fenólicos. Um ESI com configuração convencional, sem solução interna de referência foi utilizado para medir a variação da concentração de K^+ . O sistema sensor [4] era composto de uma mistura de valinomicina, tetraquis(4-clorofenil)borato de potássio e dioctil-sebacato. A variação de pH da suspensão foi monitorizada utilizando um electrodo combinado de pH. Foi usado um sistema computadorizado para a fazer a aquisição dos dois sinais potenciométricos.

Discussão

- Os ácidos hidroxicinâmicos provocaram maior efluxo de K^+ que os ácidos hidrobenzóicos
- O ácido *p*-cumárico foi o composto testado que provocou maior stress químico, provocando um efluxo acelerado de K^+ em ambas as bactérias.
- O aumento de concentração de ácido *p*-cumárico provoca um aumento do efluxo de K^+ e uma diminuição da concentração de H^+ do meio de suspensão.
- A metodologia de análise usada mostrou-se apropriada à medição do efluxo de K^+ como indício de danos provocados nas membranas biológicas.

Referências:

[1] M. D. Johnston et al. (2003) J. App. Microbiol., 94, 1015
 [2] S. Denyer & W. B. Hugo (1990), Mechanisms of action of chemical biocides, Society of Applied Bacteriology Technical Series n°27, 1ª Ed. Blackwell Publishing, London, UK
 [3] Campos, F. M., Couto, J. A., Hogg, T. A. (2003), J. App. Microbiol., 94, 167-174
 [4] T. A. Nieman & G. Horvai (1985) Anal. Chim. Acta, 170, 359

Agradecimentos:

F.M.Campos e I.V.Tóth gostariam de agradecer à Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) as bolsas PRAXIS XXI/BD/1990/99 e SFRH/BPD/5631/2001, respectivamente. Os autores gostariam ainda de agradecer à FCT o financiamento através do projecto POCTI/AGG/40724/2001.

Resultados

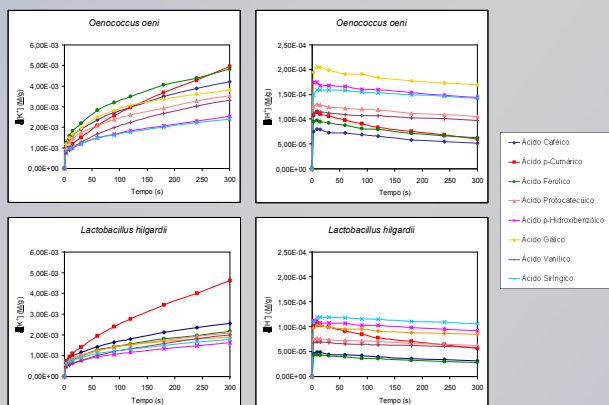


Figura 2 – Variação da concentração de K^+ e de H^+ em bactérias lácticas do vinho sujeitas a stress em meio tampão de fosfato com 11% de etanol e 2,22 g/L de ácidos fenólicos. Os valores apresentados correspondem a variações de concentração por peso húmido das células centrifugadas subtraídas dos valores obtidos no ensaio de controlo (sem ácidos fenólicos).

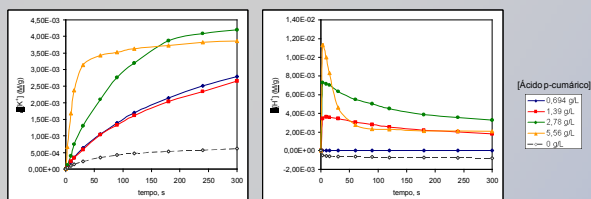


Figura 3 – Variação da concentração de K^+ e de H^+ em *Oenococcus oeni* sujeito a stress em meio tampão de fosfato com 11% de etanol e diferentes concentrações de ácido *p*-cumárico. Os valores apresentados correspondem a variações de concentração por peso húmido das células centrifugadas.