

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GUSTAVO DE SOUZA PESSÔA

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA CONTAGEM DE
SACCHAROMYCES CEREVISIAE EM SISTEMAS DE ANÁLISE POR
INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

ALFENAS/MG
2008

GUSTAVO DE SOUZA PESSÔA

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA CONTAGEM DE *SACCHAROMYCES
CEREVISIAE* EM SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Alfenas, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Desenvolvimento e avaliação microbiológica e físico-química de fármacos, toxicantes e medicamentos
Orientador: Pedro Orival Luccas
Co-orientador: Antônio Martins de Siqueira

ALFENAS/MG
2008

Pessoa, Gustavo de Souza.

Avaliação de procedimentos para contagem de *Saccharomyces cerevisiae* em sistemas de análise por injeção em fluxo (FLA) / Gustavo de Souza Pessoa. - Alfenas, 2008.

70 f. : ils., grafis., tabs. -

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – UNIFAL-MG.

Bibliografia.

1. Análise por injeção em fluxo. 2. Microorganismos - Contagem. 3. Turbidimetria. I. Título.

CDD: 543.00579563

GUSTAVO DE SOUZA PESSÔA

AVALIAÇÃO DE PROCEDIMENTOS PARA CONTAGEM CELULAR EM SISTEMAS
DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Alfenas, para obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área
de Concentração: Análise Físico-Química e
Microbiológica de Fármacos

Aprovado em:

Prof.: Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: Unifal - MG

Assinatura:



Prof.: Dr. Edenor Rodrigues Pereira Filho

Instituição: UFSCar - SP

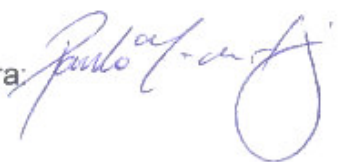
Assinatura:



Prof.: Dr. Paulo Márcio Faria e Silva

Instituição: Unifal - MG

Assinatura:



Ao meu pai,

Pelo amor e amizade incondicionais a mim oferecido. Por fazer desta arte de educar, na qual o senhor é mestre, o alicerce de meu caráter. O senhor sempre será um exemplo de pai e homem.

À minha mãe,

Por me mostrar o sentido do amor, da dedicação e do altruísmo. Por sempre me fazer sentir seguro e em paz em meu lar. Ainda, por me proporcionar uma vida feliz como seu filho.

Às minhas irmãs,

Thamara e Amanda, por sempre me deixarem cuidar um pouquinho de vocês e por cuidarem muito de mim. Pelo apoio e incentivo em todas as etapas da minha vida.

À Lívia,

Pelo amor, carinho e dedicação. A companheira mais fiel, tanto nos momentos felizes quanto nos mais difíceis. Você sempre me passou confiança e me fez acreditar que tudo ao final podia dar certo. Amo-te muito.

A Deus,

Por esta oportunidade sublime de viver.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade,

A Universidade Federal de Alfenas, por ter cedido espaço para que a realização do trabalho se tornasse possível.

Aos funcionários, aos docentes que fazem dessa instituição um segundo lar aos alunos.

Meus sinceros agradecimentos a todos da UNIFAL-MG.

Ao pessoal do laboratório,

Assim como o mar eu descreveria o laboratório. Um dia, sereno e tranqüilo. No outro, revoltado e agitado. Um microcosmo que imita a vida fora dele. Se não há nada mais belo do que esta oportunidade divina de viver, posso dizer o mesmo a vocês. Foi maravilhoso conviver todo esse tempo com vocês.

Obrigado por tudo!

Aos professores Tonhão, Lucia e Célio,

Sem a colaboração de vocês, possivelmente a realização deste trabalho seria inconcebível.

Meus sinceros agradecimentos!

Ao Pedro,

Em mais de quatro anos juntos, cada atitude sua me serviu de exemplo e me trouxe aprendizado. Certamente levarei comigo um pouco de sua determinação, disposição e boa vontade.

Desejo-lhe que as melhores coisas te aconteçam.

Obrigado por tudo!

“A imaginação é mais importante do que o conhecimento, pois o conhecimento tem limites, ao passo que a imaginação abraça o mundo todo.”

Albert Einstein

RESUMO

A contagem celular é uma técnica empregada para se monitorar a reprodução de células em meios de cultivo de interesse em ensaios biológicos. Um sistema de análise por injeção em fluxo foi desenvolvido para a contagem de células como uma alternativa ao sistema convencional, câmara de Neubauer. O método é baseado na proporcionalidade entre o sinal de sulfato de bário e das células. Apesar das diferenças nas propriedades físicas, foi possível estabelecer uma relação entre os sistemas de fluxo. No sistema FIA para determinação de sulfato, foi obtida a seguinte equação para curva analítica: $S = 0,0087C_{\text{sulfato}} + 0,000458$. Para o *Saccharomyces cerevisiae* a curva analítica obtida foi $S = 4,01 \times 10^{-11}C_{S.cerevisiae} + 0,0018$ e a relação entre os sistemas foi $C_{S.cerevisiae} = 2,17 \times 10^8 C_{\text{sulfato}} + 0,002258$. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, $2,37 \times 10^8$ células L^{-1} e $7,90 \times 10^8$ células L^{-1} . O método foi comparado com os resultados obtidos na câmara de Neubauer e não existiram diferenças significativas a um nível de confiança de 95% (teste-t pareado). A determinação com a câmara de Neubauer apresentou menor precisão que o sistema FIA. Além disso, o método permite a monitoração do crescimento microbiano. As principais vantagens do sistema FIA foram a alta frequência, a seletividade, exatidão e repetibilidade satisfatórias.

Palavras-chave: Análise por injeção em fluxo. Microorganismos - Contagem. Turbidimetria.

ABSTRACT

Cell count is a procedure that has been used in screening of cell reproduction in different types of inquiry and science areas. A system of flow injection analysis (FIA) was developed for cell counting how an alternative to conventional system, the Neubauer Chamber. The method is based on the proportionality between the barium sulfate and the cell signals. In spite of differences in the physical properties, it was possible to establish a relationship among the flow systems. In the sulfate FIA system, it was obtained the following equation for calibration curve: $S = 0.0087C_{\text{sulfate}} + 0.000458$. The *Saccharomyces cerevisiae* calibration curve obtained was: $S = 4,01 \times 10^{-11}C_{S.cerevisiae} + 0.0018$ and the relationship between the systems was: $C_{S.cerevisiae} = 2,17 \times 10^8 C_{\text{sulfate}} + 0.002258$. The limits of detection and quantification was respectively equal to $2.37 \times 10^8 \text{ cells L}^{-1}$ and $7.90 \times 10^8 \text{ cells L}^{-1}$. The method was compared with results obtained in the Neubauer chamber and there was no significant difference at confidence level of 95% (paired *t*-test). The determination with classical Neubauer chamber presented lower precision than the FIA system. Besides this, the method has permitted the screening of microbial proliferation. The main advantages of FIA system were the high analytical frequency, the selectivity, accuracy and repeatability satisfactory.

Keywords: Flow injection analysis. Microorganisms - Counting. Turbidimetry.

Lista de figuras

Figura 1 - Preparo das amostras.....	34
Figura 2 - Figura 2 - Desenho esquemático da câmara de Neubauer.....	35
Figura 3 - Módulo do sistema FIA: A = amostra; C = fluxo carregador (solução fisiológica); R1 = 0,3% (m/v) EDTA em 0,07 mol L ⁻¹ NaOH; R2 = 5,0 % (m/v) BaCl ₂ . 2H ₂ O em 0,05% (m/v) álcool polivinílico (PVA) - para determinação de sulfato; solução fisiológica - para determinação da concentração celular; D = detector (espectrofotômetro, λ = 410 nm); W = descarte; L = alça de amostragem (volume = 502 µL). Os valores entre parênteses representam as taxas de fluxo empregadas no sistema FIA (mL/min).....	38
Figura 4 - Figura 4 - Procedimento realizado para o ensaio da curva de crescimento.....	42
Figura 5 - Desenho esquemático da câmara de Neubauer mostrando um resultado da contagem de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
Figura 6 - Curva analítica e registros de sinais dos padrões de sulfato (2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 mg L ⁻¹).....	44
Figura 7 - Curva analítica e registros de sinais dos padrões de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (0,0, 1,47 x 10 ⁹ , 2,93 x 10 ⁹ , 4,41 x 10 ⁹ , 5,87 x 10 ⁹ , 7,34 x 10 ⁹ células L ⁻¹).....	45
Figura 8 - Curva de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52

Lista de tabelas

Tabela 1 -	Concentrações dos interferentes (g/L).....	39
Tabela 2 -	Estudo de interferentes.....	46
Tabela 3 -	Validação do método com relação à linearidade, ao limite de detecção e limite de quantificação do método proposto.....	47
Tabela 4 -	Precisão do método – Repetibilidade.....	48
Tabela 5 -	Comparação entre o método proposto e câmara de Neubauer em amostras simuladas.....	49
Tabela 6 -	Determinação da concentração celular através da Câmara de Neubauer e do sistema FIA em amostras de probiótico e fermentos biológicos.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	O MICRORGANISMO.....	15
1.2	ISOLAMENTO DA CULTURA.....	16
1.3	NUTRIÇÃO MICROBIANA.....	17
1.4	CRESCIMENTO MICROBIANO.....	18
1.4.1	Fases de crescimento.....	18
1.4.2	Efeito das condições ambientais sobre o crescimento.....	19
1.5	APLICAÇÕES DA CONTAGEM CELULAR.....	21
1.5	Alimentos.....	21
1.5.2	Fármacos.....	23
1.5.3	Ambiental.....	23
1.5.4	Análises clínicas.....	24
1.6	MÉTODOS DE CONTAGEM CELULAR.....	25
1.6.1	Método do peso seco.....	26
1.6.2	Método da membrana filtrante.....	26
1.6.3	Método do número mais provável.....	27
1.6.4	Método da contagem em placa.....	27
1.6.5	Método de contagem em câmara de Neubauer.....	28
1.6.6	Métodos automáticos de análise.....	28
1.6.7	Citometria de fluxo.....	29
1.6.8	Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)	29
1.6.9	Ensaio colorimétrico.....	30
1.6.10	Turbidimetria.....	30
1.7	OBJETIVOS.....	31
1.8	JUSTIFICATIVA.....	31
2	MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1	EQUIPAMENTOS.....	32
2.2	REAGENTES.....	33
2.3	PREPARO DAS CULTURAS.....	34
2.4	CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	34

2.5	CONTAGEM EM SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	35
2.5.1	Curva analítica de sulfato de bário.....	36
2.5.2	Curva analítica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
2.5.3	Sistema da análise por injeção em fluxo.....	37
2.6	FIGURAS DE MÉRITO.....	38
2.6.1	Seletividade.....	38
2.6.2	Linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	39
2.6.3	Repetibilidade.....	40
2.6.4	Reprodutibilidade.....	40
2.6.5	Exatidão.....	41
2.7	APLICAÇÃO EM PRODUTOS COMERCIAIS.....	41
2.8	APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA MONITORAR A CURVA DE CRESCIMENTO.....	41
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
3.1	CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	43
3.2	ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS SINAIS.....	44
3.3	FIGURAS DE MÉRITO.....	45
3.3.1	Seletividade.....	45
3.3.2	Linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	46
3.3.3	Repetibilidade.....	47
3.3.4	Reprodutibilidade.....	48
3.3.5	Exatidão.....	48
3.4	APLICAÇÃO EM PRODUTOS COMERCIAIS.....	50
3.5	APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA MONITORAR A CURVA DE CRESCIMENTO.....	51
4	CONCLUSÕES.....	53
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
	APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA ANALYTICAL BIOCHEMISTRY.....	61

1 INTRODUÇÃO

A contagem celular é uma técnica empregada para monitorar a reprodução de células em meios de cultivo de interesse em ensaios biológicos. Esses ensaios envolvem a monitoração do crescimento microbiano e a concentração de componentes do meio, o controle da proliferação de células em tecidos vivos e estudos de cinética celular (MOUTON; VINKS, 2005; FUSSENEGER; BAILEY, 1998; ABU-ABSI et al., 2003).

A quantificação celular é feita através de contagem direta das células presentes em uma solução ou meio de cultura, podendo se diferenciar células viáveis e não viáveis (PARAMESWARAN; HARGREAVE, 2001). A contagem de células viáveis é importante principalmente nas áreas de microbiologia, incluindo a saúde pública, tecnologia de alimentos, biotecnologia e indústria farmacêutica (JEPRAS et al., 1995).

Além disso, a quantificação pode ser realizada através de contagem indireta, sendo que a concentração celular, nesse caso, é uma função da variação do consumo ou produção dos constituintes das vias metabólicas de um microrganismo (LINDBERG et al., 1994). Existem diversos métodos clássicos e instrumentais utilizados como referência. Dentre esses métodos, pode ser citada a microscopia, utilizando câmaras de contagem ou hemocitômetros, a colorimetria, a turbidimetria e a citometria de fluxo (MEUWLY et al., 2006; COLLINS; LYNE; GANGE, 1989; KULSTAD; KULSTAD; LOVELL, 2004; SKLAR et al., 2002).

Entretanto é necessário salientar que mesmo as técnicas automáticas não estão livres de erros. Muitos artigos propõem diferentes modelos que estimam o número total de partículas biológicas em amostras de referência. Essas técnicas podem estar particularmente susceptíveis à interferência do observador. Podem existir diferenças consideráveis entre o número de partículas previstas e as estimadas empiricamente quando modelos matemáticos são aplicados (WEST et al., 1996; SIMIC et al., 1997).

A resolução deste problema é necessária para se obter maior precisão e melhor avaliação da validade e confiabilidade de qualquer dado obtido com essas técnicas. Isto pode ser crucial para maior utilização e aceitação das técnicas de contagem baseadas em esquemas automáticos (SCHMITZ; KORR; HEINSEN,

1999).

Com tantas possibilidades, cabe aos laboratórios, de pesquisa e análises clínicas, utilizar o método que lhes ofereçam mais vantagens, levando em consideração a relação entre custo, benefícios e a frequência analítica. É para atender a essas necessidades que diversos métodos são propostos, ou seja, diminuir os erros aleatórios ou sistemáticos em atividades experimentais, o tempo de análise e, conseqüentemente, o capital investido.

1.1 O MICRORGANISMO

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é utilizada pelos seres humanos por milhares de anos. Desde 8.000 anos atrás, o fungo tem sido empregado na fabricação do vinho, pão, cerveja, dentre outros produtos. Atualmente, é um importante modelo para diversas áreas da ciência como a bioquímica, a genética e a biologia molecular (AKADA, 2002).

A transformação genética do fungo foi estabelecida em 1978 (HINNEN; HICKS; FINK, 1978). Desde então, o fungo é usado como principal microrganismo eucariótico para análise biológica, assim como para produção de proteína heteróloga. Um bom exemplo é dado por Juozapaitis e colaboradores (2008). Em seu trabalho, os autores descrevem a clonagem de genes do vírus da parainfluenza humana, produção e caracterização de partículas tipo-nucleocapsídeo recombinantes expressas pelo fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Os dados apresentados pelos autores foram usados na detecção da imunoglobulina G específica para HPIV em amostras de soro humano.

O fungo tem sido empregado por muitos anos como um agente bioterapêutico para tratamento de desordens entéricas, como diarréias. O fungo coloniza o trato intestinal, onde, com uma função probiótica, combate a bactéria causadora da diarréia. Além disso, subprodutos do fungo, incluindo enzimas, antioxidantes, vitaminas e polissacarídeos são de grande interesse para a saúde humana. É reconhecido que os polissacarídeos da parede celular do fungo podem estimular o sistema imune, diminuir o colesterol sérico, exibir atividade antitumoral e adsorver substâncias como micotoxinas (FLEET; BALIA, 2006; DAWSON, 2002).

O maior interesse no fungo *Saccharomyces cerevisiae* é sobre o seu processo metabólico. Além dos produtos alimentícios obtidos pela fermentação, há grande entusiasmo na comunidade científica pela pesquisa de fontes alternativas de energia, incluindo então, os biocombustíveis, no caso o etanol. Comparando este combustível ao petróleo, podem-se apresentar como principais vantagens a menor quantidade de produtos gerados no ambiente e por ser um recurso renovável. Tendo-se em vista a importância do produto, qualquer melhoria na tecnologia da fermentação, será economicamente atraente, justificando investimentos de pesquisa e desenvolvimento nas pesquisas sobre fermentação etanólica (BAI; ANDERSON; YOUNG, 2008).

Sob o ponto de vista bioquímico, a principal via envolvida na fermentação etanólica é a glicólise, através da qual uma molécula de glicose é metabolizada e duas moléculas de piruvato são produzidas. Sob condições anaeróbias, o piruvato é reduzido a etanol com liberação de gás carbônico. Dois ATPs produzidos na glicólise são usados na biossíntese do fungo. Logo, a produção de etanol é estritamente ligada com o crescimento celular do fungo (BAI; ANDERSON; YOUNG, 2008).

1.2 ISOLAMENTO DA CULTURA

O isolamento de uma cultura pura de um microrganismo é essencial para estudar as propriedades de crescimento. Culturas puras são comumente isoladas pelo espalhamento de células de uma amostra, em um meio apropriado. Uma colônia isolada pode fornecer uma cultura pura para estudos subseqüentes de crescimento e propriedades de resistência a drogas. É uma prática adequada inserir cada colônia em um meio similar para assegurar a ausência de qualquer bactéria contaminante (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1996a). Há meios que favorecem o crescimento de determinadas espécies, inibindo o crescimento de outras, ou seja, meios seletivos. A seletividade pode ser obtida pela adição de antibióticos, por exemplo, cloranfenicol, ao meio de cultivo, agar extrato de levedura glicosado (YGC), suprimindo a flora bacteriana. Também existem meios que permitem a diferenciação de microrganismos, baseados em suas propriedades bioquímicas, ou

seja, meios diferenciais. Por exemplo, o meio usado para a distinção entre *Zygosaccharomyces bailii* e *Saccharomyces cerevisiae*. Enquanto o *Zygosaccharomyces bailii* apresenta colônias de cor azul, as colônias formadas por *Saccharomyces cerevisiae* são predominantemente brancas (SCHÜLLER, 1998).

1.3 NUTRIÇÃO MICROBIANA

Os microrganismos podem ser estudados em seu hábitat natural ou em meios de cultura apropriados. Quando os microrganismos são removidos do seu meio e cultivados em laboratório, busca-se simular ou até mesmo melhorar as condições naturais. Assim sendo, o desenvolvimento do microrganismo depende do fornecimento de elementos químicos essenciais. Estes elementos são necessários tanto para a síntese, como para desempenho das funções normais dos componentes celulares (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1996a).

Dentre os nutrientes essenciais para o crescimento microbiano, o carbono é requerido por todos os microrganismos. Uma fonte de carbono é importante para a maioria dos processos metabólicos, pois é o material sobre o qual se obtém a energia requerida para o crescimento. Outro elemento de importância substancial é o nitrogênio, já que é constituinte de proteínas e ácidos nucleicos e muitos outros constituintes celulares. Poucos organismos têm a capacidade de converter o nitrogênio atmosférico em amônia e incorporá-lo em seus constituintes celulares. A maioria das bactérias pode usar fontes inorgânicas de nitrogênio, tais como íons amônio ou nitrato. Outras bactérias, menos versáteis, requerem o nitrogênio sob forma de algum aminoácido, como por exemplo, glutamina, glutamato, asparagina, arginina ou extratos de peptídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

Além desses elementos, hidrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo e ferro são necessários ao crescimento microbiano. O hidrogênio tem seu suprimento relacionado à água presente no meio. O oxigênio pode ser encontrado na atmosfera gasosa do meio. O enxofre é necessário para a síntese de cisteína e metionina. Sob a forma de sulfeto, o enxofre pode ser importante fonte de processos enzimáticos microbianos. O fósforo é utilizado na síntese de ácidos nucleicos, lipídios e de adenosina trifosfato (ATP). O ferro é um constituinte da catalase e citocromo. Alguns

compostos inorgânicos podem ser adicionados por serem co-fatores de várias enzimas, como Mg^{+2} , K^+ , Na^+ e Ca^{+2} (TRABULSI et al., 2005).

1.4 CRESCIMENTO MICROBIANO

O crescimento microbiano é definido pela capacidade destes formarem colônias ou de proliferarem em meios de cultura. Estes ensaios são morosos, principalmente se o microrganismo em estudo apresenta uma baixa taxa de crescimento, refletindo-se em longos tempos de incubação (horas ou dias). Por outro lado, os sistemas de detecção do crescimento são dependentes do crescimento dos microrganismos em ambientes artificiais. Este fato limita a interpretação dos resultados obtidos por estes métodos, uma vez que a escolha de um meio de cultura inadequado pode resultar numa contagem imprecisa. Além disso, algumas células crescem apenas em condições anaeróbias, outras em condições aeróbias e, outras em ambas as condições. Portanto, a contagem realmente representativa de todos os microrganismos de uma determinada população apenas poderá ser feita através de métodos ópticos (COLLINS; LYNE; GANGE, 1989).

1.4.1 Fases de crescimento

O aumento da população como um todo é relacionado à multiplicação de qualquer célula nesta população. Para a maioria dos microrganismos inseridos em meio de cultura adequado, cada célula cresce com um aumento balanceado de seus constituintes. No caso do *Saccharomyces cerevisiae*, há reprodução por divisão binária. Assim, após um determinado período em seu ciclo celular, cada microrganismo que reproduz por divisão binária se divide em duas células idênticas. Cada uma delas tem a mesma capacidade de crescimento e divisão a uma mesma taxa, como a célula-mãe. Isto significa dizer que o número de células na população cresce em relação exponencial ou logarítmica, já que a população dobra no mesmo intervalo de tempo, ou seja, tempo de geração. Entretanto, o número de células que

participam em cada divisão dobra com cada nova geração (TRABULSI et al., 2005).

Quando o microrganismo é inoculado no meio, o crescimento não ocorre rapidamente. A fase lag é conhecida como a fase em que o microrganismo cultivado se adapta ao meio. A duração desta fase depende do tipo de microrganismo, da idade e tamanho do inóculo, da natureza do meio de origem do inóculo e dos nutrientes presentes no novo meio de cultura. Durante a fase lag, a massa e o tamanho celular começam a aumentar antes do aumento do número de células. A síntese de enzimas e de outras macromoléculas necessárias para a divisão celular ocorre nesta fase (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Durante a fase exponencial de crescimento (fase log), número e massa celular aumentam em escala logarítmica, com um tempo de geração constante. Este é o período de crescimento equilibrado, durante o qual todos os constituintes celulares são produzidos em proporção constante. A taxa de divisão celular é dependente do tipo de microrganismo, da natureza do meio, da temperatura e, para os organismos aeróbicos, a taxa de aeração (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1996a).

Eventualmente, o crescimento logarítmico desacelera por causa do acúmulo da produção de resíduos, escassez de nutrientes, mudanças no pH, ou diminuição de oxigênio. A população entra na fase estacionária, na qual o número de células viáveis se mantém constante. Frequentemente, existe o estado estacionário, marcado por ser um estado de equilíbrio entre as taxas de reprodução e a de mortalidade, no qual algumas células morrem e outras continuam se dividindo (BURTON; ENGELKIRK, 1998).

Finalmente, quando a taxa de mortalidade excede a taxa de reprodução, o número de células viáveis declina. O tempo para que todas as células morram difere para cada microrganismo. Durante esta fase, células assumem formas não normal, de tal maneira que se torna difícil o reconhecimento do microrganismo em cultivos antigos (TRABULSI et al., 2005).

1.4.2 Efeito das condições ambientais sobre o crescimento

Além de uma combinação de nutrientes apropriados, o cultivo bem sucedido dos vários tipos de microrganismos depende também de uma condição física

apropriada. Desta maneira, é importante determinar os parâmetros que influenciam o meio físico de um microrganismo como temperatura, pH, atmosfera gasosa e pressão osmótica.

A temperatura é específica para cada espécie microbiana, de tal maneira que ela pode bloquear ou acelerar o crescimento. Sabe-se que todas as reações metabólicas ocorrem mais rapidamente com aumentos da temperatura até o ponto no qual as enzimas são desnaturadas. Entretanto, proteínas tornam-se limitantes a baixas temperaturas, no que diz respeito ao desempenho de suas funções biológicas. Assim sendo, a estabilidade da proteína é o principal fator que determina o ajuste de máxima temperatura no crescimento (FORSYTHE, 2002).

A taxa de crescimento também pode ser afetada pelo pH da cultura. Existe um valor ótimo e uma faixa sobre a qual ocorre o crescimento. Organismos que fermentam açúcar para produzirem ácidos podem diminuir o pH do meio até o ponto em que o crescimento é impedido. A maioria das bactérias mantém um pH interno constante de 7,4. Este pH interno se torna difícil de manter quando o gradiente de pH supera duas ou três unidades. Além disso, ácidos orgânicos produzidos pela fermentação são acumulados no interior da célula e inibem reações metabólicas (FRANCO; LANDGRAF, 2004).

A pressão osmótica do meio influencia a taxa de crescimento, de tal maneira que as bactérias devem se adaptar a mudanças nesse parâmetro. Sabe-se que a transferência para meios de pressão osmótica elevada é seguida pelo aumento no acúmulo de íons. Em conseqüência, ocorre o aumento da pressão osmótica interna como uma medida de adaptação do microrganismo. Crescimento em meios com pressão osmótica elevada (maior que $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ de cloreto de sódio) requer a produção de substâncias as quais estabilizam proteínas em concentrações salinas adequadas, tais como prolina e glicina-betaína (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Uma das principais chaves de classificação para microrganismos é sua resposta à presença de oxigênio. O oxigênio pode ser letal para microrganismo que são incapazes de destruir os produtos tóxicos formados no metabolismo aeróbio. Além disso, o oxigênio é suficientemente reativo para adquirir elétrons de outras substâncias químicas, especialmente as flavoproteínas e quinonas do sistema de transporte de elétrons. A transferência de dois elétrons para o oxigênio pode resultar na formação de radicais livres, agentes tóxicos para células através de suas reações com lipídios, ácidos nucléicos e proteínas (ADAMS; MOSS, 1995).

1.5 APLICAÇÕES DA CONTAGEM CELULAR

Um estudo sobre contagem celular demonstra como tal técnica é presente e essencial para diversos ramos da ciência, seja pela formação de subprodutos oriundos do crescimento microbiano ou para realização de diagnósticos, para fazer inferências sobre a saúde humana. Além dos benefícios diretos, a quantificação celular também tem sua relevância nas questões relacionadas aos processos de controle de qualidade. Dessa maneira, tornam-se nítidos os fundamentos para justificar o desenvolvimento de pesquisas sobre os sistemas de contagem celular.

1.5.1 Alimentos

O número de microrganismos em alimentos é um importante índice de higiene de produtos alimentícios industriais, produzidos em larga escala. Dessa maneira, são facilmente contaminados por uma grande variedade de espécies microbiológicas. Os danos causados vão desde a deterioração do alimento até o desenvolvimento de intoxicações alimentares ou infecções transmitidas por alimentos (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1996b). Sabe-se que o *Clostridium botulinum* é um importante patógeno alimentício. Aproximadamente 450 casos de botulismo são registrados anualmente (Hatheway, 2005). A maioria dos casos é causada pela má preservação dos alimentos nos domicílios. Entretanto, casos de botulismo associados aos produtos comerciais embalados a vácuo também são verificados (KORKEALA et al., 1998).

Fica evidente então que a análise microbiológica de alimentos é questão de saúde pública. Assim sendo, são necessários padrões e regulamentos para assegurar que o alimento recebido pelo consumidor seja saudável, seguro e apresente a qualidade especificada na embalagem do produto. Diversas agências internacionais têm cooperado para definir estes padrões e regulamentações, por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), “Food Agriculture Organization (FAO)”, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e o “Food and Drug Administration (FDA)”. Este último tem desenvolvido critérios específicos para os

alimentos (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1996b). A aceitação microbiológica do produto leva em consideração questões como a garantia de qualidade, ou seja, procedimentos que assegurem a adequação do produto aos padrões exigidos. Além disso, estimam-se também as boas práticas de fabricação, o controle de qualidade, um alto nível de sanitização e higiene e a validação dos procedimentos. Essas práticas são executadas por indústrias que zelam pela saúde e opinião pública. Práticas mais simples também asseguram a validade dos produtos alimentícios, tais como a manutenção de condições próprias durante o processo de distribuição, de estocagem e refrigeração (KUDA; SHIMIZU; YANO, 2004).

Um dos exames laboratoriais típicos para se verificar o risco de crescimento de microrganismos patogênicos e produção de toxinas em alimentos são os ensaios de alimentos inoculados (RIBEIRO et al., 2003). Nesses ensaios, uma quantidade conhecida do microrganismo é inoculada do produto, verificando-se somente após o crescimento microbiano o número e tipos de microrganismos e os produtos do seu metabolismo. Outros exames são baseados na monitoração de populações microbianas, modelos que descrevem a mudança do número de microrganismos de acordo com o tempo, as mudanças das condições ambientais do inóculo, tais como pH, temperatura, atmosfera gasosa e pressão osmótica (HYTYIÄ et al., 1999).

Além dos aspectos referentes ao controle de qualidade, existem alimentos que são obtidos pelo crescimento microbiano, tendo a fermentação como principal atividade metabólica. Nesse caso, o crescimento pode conferir a preservação e fornecer características desejáveis ao produto. Um exemplo desse último caso é verificado na produção de vinhos. Para produção de vinhos tintos, são necessários baixos teores de ácido málico como pré-requisito para sua comercialização o que confere a diminuição da acidez que suaviza o paladar, quesito indispensável para os vinhos tintos. Esti e colaboradores (2004) desenvolveram dois biossensores para monitorar a fermentação malolática, avaliando aspectos como a concentração celular e os teores de ácido málico e lático.

1.5.2 Fármacos

Um dos aspectos básicos do controle de qualidade de fármacos e

medicamentos é garantir que tais produtos não sejam veículos de transmissão de doenças. A principal ferramenta de monitoração da presença de microrganismos contaminantes em medicamentos é a contagem celular. A Farmacopéia brasileira indica a contagem microbiana como parâmetro para utilização da água como matéria-prima na produção de medicamentos. Segundo essa farmacopéia, a água pode ser utilizada desde que a contagem não exceda 100 unidades formadoras de colônia por mililitro.

Dois casos de acidentes veiculados à administração de medicamentos contaminados foram verificados na China. No primeiro caso, pacientes foram contagiados com hepatite C, devido à utilização de imunoglobulina, na província de *Guangdong*. No segundo caso, seis pessoas morreram após receberem injeções de imunoglobulina contaminada na cidade de *Nanchang*, capital da província de *Jiangxin*. Esses exemplos demonstram a falta de garantias na segurança, na produção e venda de medicamentos (VACINA, 2008).

A produção de drogas terapêuticas para o tratamento de doenças é uma das aplicações emergentes da indústria farmacêutica. Através da manipulação do material genético, um microrganismo pode adquirir novas habilidades bioquímicas, incluindo a produção de novas substâncias. Dentre essas novas habilidades, podem ser citadas a produção de insulina, de hormônio do crescimento humano, interferons e interleucina-2 (PELCZAR JR.; CHAN; KRIEG, 1996b). Uma das maneiras de se monitorar microrganismos recombinantes, como por exemplo, a *Escherichia coli*, é através da contagem de células totais, da concentração de células viáveis e do número de unidades formadoras de colônia (SCHÜGERL et al., 1993).

1.5.3 Ambiental

Dentre os microrganismos de interesse ambiental mais freqüentemente encontrados, podem ser citados os rotíferos, o fitoplâncton, zooplâncton, cladóceros, copépodos e larvas de dípteros. Esses organismos têm sua importância porque sua presença no ambiente é compreendida como resposta de um sistema biológico a um agente estressor, como forma de se analisar sua ação e planejar formas de controle e monitoramento da recuperação da normalidade. São assim conhecidos como

indicadores biológicos ou bioindicadores. A presença e o número dos bioindicadores podem sugerir o grau de poluição ou de degradação de um ambiente (ODUM, 1983). A *Escherichia coli* é um bioindicador importante, no que diz respeito à qualidade da água. Segundo a portaria n.º 518 do Ministério da Saúde, a água para consumo humano deve estar ausente do bacilo, bem como de coliformes termotolerantes para cada 100 mililitros de água.

Na Limnologia, o número de indivíduos pode expressar a biomassa, ou seja, o peso total dos indivíduos de uma população ou comunidade por unidade de área ou de volume num determinado tempo. O aumento da biomassa corresponde à produção primária no ambiente aquático. Contribuem para tal aumento a quantidade de matéria orgânica acrescida pela fotossíntese ou quimiossíntese, e as perdas com demais processos (respiração, excreção, secreção, morte, herbivorismo) (REYNOLDS; TUNDISI; JINO, 1983).

A contagem celular pode ser utilizada para demonstrar as relações favoráveis ou desfavoráveis entre microrganismos. Sabe-se que certas diatomáceas podem causar insucesso reprodutivo em espécies de copépodos. Segundo Leising (2005), é necessário quantificar com precisão a contribuição de diferentes espécies de diatomáceas utilizadas na alimentação dos copépodos. Tais algas contêm uma classe de aldeídos que estão associadas à redução da produção de ovos, redução da viabilidade dos ovos e redução da população na fase larval (naupliar) sobrevivente.

1.5.4 Análises clínicas

A contagem celular tem no campo das análises clínicas a sua aplicação mais evidenciada. Diversas patologias têm sido associadas à concentração de tipos celulares específicos. Sabe-se que a contagem de células brancas do sangue pode evidenciar a arteriosclerose na carótida e no arco aórtico (ELKIND et al., 2001). Um outro estudo demonstrou relações significantes entre o número elevado de leucócitos e a apoplexia, durante ou após cirurgias cardíacas (ALBERT et al., 2003).

Além disso, preconiza-se que o tratamento da asma com drogas antiinflamatórias seja realizado após contagens reprodutíveis das células

inflamatórias das vias aéreas. As contagens celulares diferenciais e totais ajudam a compreender a cinética das mudanças das células inflamatórias na asma após a redução de corticosteróides e subsequente re-introdução do tratamento. A contagem celular também é utilizada para estudar os potenciais efeitos antiinflamatórios de drogas como teofilina, agonistas de longo espectro de ação dos receptores da adrenalina, antagonistas do leucotrieno e novas drogas em desenvolvimento (PARAMESWARAN; HARGREAVE, 2001).

A contagem celular pode caracterizar através da perda de linfócitos T CD4+ a infecção pelo vírus HIV-1, particularizada pela imunodeficiência, doenças oportunistas e morte (HAMMER, 1997). Uma relação inversa existe entre o número linfócitos CD4+ no sangue periférico e o risco de doenças associadas à HIV-1 (BATTEGAY et al., 2006). Essa relação possibilita descrever a contagem celular como uma ferramenta para monitorar a progressão do HIV e a terapia anti-retroviral (HAMMER et al., 1997; PATTANAPANYASAT; THAKAR, 2005; BATTEGAY et al., 2006).

1.6 MÉTODOS DE CONTAGEM CELULAR

Nos métodos de contagem, reconhece-se que erros são inevitáveis. Alguns erros são inerentes ao material, outros à técnica. Erros de $\pm 90\%$ na contagem da ordem de 10000 a 100000/mL podem ocorrer mesmo com as melhores técnicas disponíveis. Por isso, é necessário combinar o máximo de cuidado na técnica com uma interpretação imparcial dos resultados (COLLINS; LYNE; GANGE, 1989). A escolha de um método adequado torna-se fundamental para a confiabilidade dos resultados, como pode demonstrar o trabalho de Nunes da Silva e colaboradores (2007). Nesse trabalho, são comparados os seguintes métodos de contagem de plaquetas: câmara de Neubauer, considerada o método oficial e o método automático eletrônico, onde ocorre a detecção das células através da impedância. Foi verificada uma tendência dos analisadores automáticos em subestimar a contagem de plaquetas, por não diferenciarem corretamente eritrócitos de plaquetas, resultando em uma contagem inexata de plaquetas. Esse é um erro grave, pois pode levar a um diagnóstico impreciso de trombocitopenia.

1.6.1 Método do peso seco

A determinação da massa e do número de células viáveis na amostra é necessária em medições dos parâmetros de crescimento e dos efeitos de antibióticos. Alguns antibióticos causam queda da viabilidade celular, mas não muda a massa celular. Outros inibem somente o crescimento, enquanto que alguns causam a lise celular. A massa celular pode ser determinada através do peso seco, embora esta técnica requeira grande quantidade de amostra e um longo tempo. Esse método é satisfatório para quantificar o aumento de massa de fungos filamentosos. Nesse procedimento, o fungo é removido do meio de cultura por filtração, para eliminar outros materiais, seco em dessecador para posterior pesagem (OLSSON; NIELSEN, 1997).

1.6.2 Método da membrana filtrante

A aplicação deste método permite que o microrganismo seja encontrado sobre a superfície de uma membrana de filtro de poros muito pequenos, após a passagem de um determinado volume. Esse filtro é transferido para uma placa de Petri contendo um suporte embebido em nutriente líquido, que permite que as colônias se desenvolvam sobre a membrana do filtro. Esse método é usado rotineiramente na detecção e registro de coliformes, considerados indicadores de poluição fecal, em amostras de alimentos e água (TORTORA; FUNKE e CASE, 2005).

1.6.3 Método do número mais provável (NMP)

Essa é uma técnica estatística com base no seguinte princípio: quanto maior o número de bactérias em uma amostra, maior será o número de diluições necessárias para eliminar totalmente o crescimento em tubos contendo meio de

cultura. Esse método é mais utilizado quando as bactérias a serem contadas não cresceriam em meio sólido. O método também é usado quando o crescimento de bactérias em um meio líquido diferencial é usado para identificar os microrganismos. É preciso salientar que o método fornece somente uma estimativa de 95% de probabilidade de a população bacteriana conter um número de bactérias (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005).

1.6.4 Método da contagem em placa

O método de contagem em placa considera que cada colônia é originada do crescimento e da multiplicação de um microrganismo. Isso nem sempre é verdade, uma vez que esses freqüentemente crescem em cadeias ou como grumos. Para refletir essa realidade, as contagens em placa são representadas como unidades formadoras de colônia.

No procedimento deste método, placas de Petri são sistematicamente organizadas e o inóculo é diluído em uma série de tubos de diluição. Cada tubo de diluição subsequente conterá um décimo do número de bactérias presentes na anterior. Posteriormente, as amostras destes tubos são transferidas para placas de Petri contendo meio de cultura onde ocorrerá o crescimento das colônias e a contagem. O número de colônias é utilizado na determinação da quantidade de bactérias presentes na amostra original (TORTORA; FUNKE; CASE, 2003).

Cabe mencionar que as principais vantagens da contagem em placa são a contagem somente das células viáveis, a possibilidade do isolamento das colônias, que podem ser sub-cultivadas em culturas puras, as quais podem ser facilmente estudadas e identificadas. Além disso, há maior chance de crescimento de microrganismos menos resistentes à presença de oxigênio.

No entanto, algumas desvantagens são apresentadas, dentre elas, a ausência de um meio que permita o crescimento de todos os microrganismos, a necessidade da incubação apropriada para permitir o desenvolvimento das colônias e ser um método trabalhoso. Além disso, a necessidade de manipulação pode originar erros nas contagens devido a erros de diluição e/ou plaqueamento (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994).

1.6.5 Método de contagem em câmara de Neubauer

A contagem direta é realizada em uma câmara de contagem celular, por exemplo, a Câmara de Neubauer. Esta câmara consiste em uma lâmina dupla adaptada à leitura em microscópio de campo claro ou ao de contraste de fase. É considerado um método sensível para determinar densidade celular (WIGG et al., 2003).

A câmara de Neubauer é amplamente utilizada para contagem de células sanguíneas, na identificação da atividade imunotóxica de pesticidas e avaliação da viabilidade celular em culturas cujo consumo de glicose é monitorado (VOHR; RÜHL-FEHLERT, 2001; MEUWLY et al., 2006).

1.6.6 Métodos automáticos de contagem

A contagem de células é trabalhosa e demanda muito tempo. Métodos rápidos são desejados, mas devem ser confiáveis, sensíveis e específicos. Esses métodos têm sido usados para contagem eletrônica de partículas, medições da produção de ATP por bactérias através da bioluminescência, mudança nas propriedades ópticas, microcalorimetria e mudanças de pH, potencial redox, impedância ou condutividade pelo crescimento microbiano (COLLINS; LYNE; GANGE, 1989).

1.6.7 Citometria de fluxo

A Citometria de fluxo é uma técnica utilizada para contar, examinar e classificar partículas microscópicas suspensas em meio líquido em fluxo. Um feixe de luz (normalmente laser) de um único comprimento de onda é direcionado a um meio líquido em fluxo. Detectores são apontados ao local onde o fluxo passa através do feixe de luz; um na linha do feixe de luz e vários perpendiculares a este. Cada

partícula suspensa passando através do feixe dispersa a luz de uma forma, emitindo luz de menor frequência do que o da fonte de luz (Bacal; Faulhaber, 2003).

Os principais componentes de um citômetro de fluxo são: uma célula de fluxo, uma fonte de luz, um detector e conversor sistema analógico para digital (ADC), um sistema de amplificação e um computador para análise de sinais.

Os parâmetros possíveis de medir são: volume e complexidade morfológica das células, pigmentos celulares, análise de tipo de células, cinética celular, análise e classificação de cromossomos, proteínas, antígenos, atividade enzimática, pH, cálcio ionizado intracelular, magnésio, potencial de membrana, apoptose, viabilidade celular, caracterização da multi resistência a fármacos em células tumorais, glutathione (Bacal; Faulhaber, 2003).

1.6.8 Sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA)

Uma das alternativas que atualmente se apresentam como eficientes são os sistemas de análise por injeção em fluxo. Nesses sistemas, amostras e reagentes são inseridos em um fluxo carregador, impulsionados através de uma bomba peristáltica numa vazão previamente estudada. Um gradiente de concentração é gerado em consequência de um processo de dispersão devido à interpenetração na parte frontal da amostra e no espaço ocupado pela mesma a cada instante até o detector. As principais vantagens são: baixo consumo de reagentes e amostra, alta frequência de amostragem, são úteis em processos de automatização de instrumentos de análise e evita a precipitação de células na cela de fluxo por ser um sistema dinâmico (SKOOG; WEST; HOLLER, 1996).

O sistema FIA foi descrito para contagem celular com detectores eletroquímicos, como biossensores, monitorando o crescimento de bacteriano durante da fermentação malolática (ESTI et al., 2004). Além disso, também foram utilizados citômetros de fluxo, cuja detecção é baseada na radiação laser para descrever mudanças da distribuição da população como função do tempo (LINDBERG et al., 1994; ABU-ABSI et al., 2003).

1.6.9 Ensaios colorimétricos

Vários sistemas usam a modificação de testes bioquímicos convencionais, baseados na mudança de cor de indicadores de pH no meio para indicar a presença de metabólitos ou produtos finais (COLLINS; LYNE; GANGE, 1989).

Sabe-se que sais de tetrazólio são usados como indicadores do número de bactérias aeróbias. Esses sais são solúveis em água, intensamente corados e formam cristais quando são reduzidos. Além disso, podem ser extraídos com solventes orgânicos para quantificação espectrofotométrica (STOWE et al., 1995; KUDA; SHIMIZU; YANO, 2004). Um corante que também pode ser usado para avaliar a viabilidade celular é o azul de tripan (VOHR; RÜHL-FEHLERT, 2001). Este corante penetra por rupturas da membrana celular, corando somente as células não viáveis. Dessa maneira, permite uma contagem diferencial.

1.6.10 Turbidimetria

A técnica mais simples e freqüentemente empregada é a medição da turbidez de uma cultura líquida (KULSTAD; KULSTAD; LOVELL, 2004). Estes ensaios são baseados no desvio de radiação por partículas, tais como células, que são relacionadas aos seus números, tamanhos e massa.

Turbidez é a habilidade das partículas em suspensão para desviar radiação eletromagnética. A medição da turbidez pode ser efetuada em um espectrofotômetro. O sensor fotoelétrico converte a radiação luminosa que emerge na superfície de uma cubeta ou cela de fluxo a um impulso elétrico, que pode ser quantificado. Além disso, a medição da turbidez pode ser obtida por um nefelômetro. Neste caso, os detectores são colocados em diferentes ângulos, medindo a radiação que é de fato desviada. A quantidade de radiação desviada é dependente do número e tamanho das partículas em suspensão. Medições da turbidez podem detectar a presença de um organismo em uma amostra clínica ou determinar o crescimento de uma bactéria ou fungo na presença de inibidores específicos (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994).

1.7 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo propor um sistema de análise por injeção em fluxo para a contagem de células como uma alternativa ao sistema convencional, câmara de Neubauer. Visando a esse objetivo, as culturas de *Saccharomyces cerevisiae* foram submetidas a um fármaco de ação anti-microbiana conhecida, para contagem em câmara de Neubauer. Foram avaliadas características analíticas em termos de seletividade, sensibilidade e exatidão.

Após a comparação das técnicas supracitadas de contagem, o sistema proposto foi avaliado para medições em amostras de fermento biológico e probiótico, bem como acompanhamento de proliferação celular.

1.8 JUSTIFICATIVA

Os diversos métodos tradicionais utilizados para contagem de microrganismos são laboriosos e dependem do adequado treinamento de técnicos por vários meses, visando a resultados precisos e confiáveis. Assim sendo, almejam-se métodos rápidos e que dependam menos de um longo período de adaptação a sua prática adequada. Nesse contexto, é plausível a aplicação, alternativa, de sistemas automáticos, em especial os sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA). A alta frequência analítica e a facilidade de se utilizar sistemas FIA unidas ao baixo custo de construção e implantação justificam a pesquisa proposta.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Abaixo seguem equipamentos, reagentes e metodologias utilizadas no presente trabalho.

2.1 EQUIPAMENTOS

Os equipamentos utilizados no presente trabalho encontram-se nos Laboratórios de Análise Química de Fármacos e Microbiologia e Imunologia da Universidade Federal de Alfenas.

Agitador magnético - FISATOM[®], utilizado no preparo das soluções padrão e na curva de crescimento;

Agitador de tubos tipo vórtex - PHOENIX[®], modelo AP-56, usado para homogenizar as suspensões;

Balança analítica - SARTORIUS[®] modelo BP 210S, para pesagem dos reagentes;

Bomba peristáltica - ISMATEC[®] (Zurique, Suíça, modelo 7618-40), utilizada para propulsão dos fluidos;

Câmara de Neubauer, usada para a contagem pelo método em câmara;

Capela de fluxo laminar - LABCONCO[®], para realização dos procedimentos em ambiente estéril;

Cela de fluxo de vidro, com 1 cm de passo óptico (FEMTO[®]);

Deionizador de água Milli – Q Academic - MILLIPORE[®] para a purificação da água;

Espectrofotômetro - FEMTO[®] (UV – Vis) modelo 435, detector da turbidez em ambas curvas analíticas;

Estufa - FANEM[®], utilizada para o controle de temperatura durante o crescimento microbiano;

Injetor comutador 2:3:2 - CENA - USP, para a inserção da amostra no fluxo carregador ou solução de limpeza;

Interface modelo PCI 711 - ADVANTECH[®], utilizada para a aquisição de

dados;

Microsoft Excel[®] e Origin[®], utilizado para tratamento dos dados;

Microcomputador PC - IBM, processador PENTIUM 133 MHZ, 64 MB de memória RAM, usado para aquisição de dados;

Microscópio óptico - OLYMPUS[®] BX41 e OLYMPUS[®] CX40, usados para contagem em câmara.

Refrigeradores - CLÍMAX[®] e BRASTEMP[®], usadas no armazenamento dos meios de cultivo e soluções;

2.2 REAGENTES

Agar Sabouraud (BIOTEC[®]), utilizado para o crescimento das leveduras;

Álcool polivinílico (BIOTEC[®]), para estabilizar a suspensão;

Caldo Sabouraud (BIOTEC[®]), com cloranfenicol (ANALYTICA[®]), usado no crescimento das leveduras e eliminação das bactérias contaminantes;

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601), utilizado para o preparo das soluções estoque e padrões;

Cloreto de bário (SIGMA[®]), para o preparo de padrões de sulfato de bário;

Cloreto de sódio (SIGMA[®]), usado no preparo da solução fisiológica;

Ácido etilenodiaminotetracético (SIGMA[®]) e hidróxido de sódio (SIGMA[®]), utilizado para o preparo da solução de limpeza do sistema FIA;

Kit de coloração Gram (NEWPROV[®]), para verificar a eliminação de bactérias;

Reagentes usados no teste de interferentes: ácido ascórbico (SIGMA[®]), ácido fólico (SIGMA[®]), albumina (SIGMA[®]), amido (REAGEN[®]), cloreto de cálcio diidratado (QUIMEX[®]), cloreto de sódio (SIGMA[®]), sulfato ferroso heptaidratado (VETEC[®]), fosfato de potássio monobásico (VETEC[®]), glicose (MERCK[®]), histidina (ACROS[®]), cloreto de magnésio heptaidratado (MERCK[®]), piridoxina (SIGMA[®]), cloreto de potássio (SIGMA[®]) e tiamina (SIGMA[®]).

Sulfato ferroso heptaidratado (VETEC[®]) utilizado no preparo a solução estoque e padrões de sulfato;

Timerosal (BIOTEC[®]), para cessar o crescimento das leveduras.

2.3 PREPARO DAS CULTURAS

Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2601) foram cultivadas em caldo Sabouraud com cloranfenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2O_5$), um antibiótico de espectro de ação amplo, usado para eliminar a contaminação por bactérias. Para confirmar a eliminação das bactérias, foi realizada a coloração Gram. Posteriormente, estas cepas foram inoculadas em Agar Sabouraud, sem o antibiótico. Após cinco dias de cultivo a temperatura de 28° C em estufa, as células foram transferidas com alça de platina para uma solução fisiológica. A suspensão celular foi centrifugada e o sedimento foi adicionado a 500 mL de uma solução fisiológica contendo timerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$), numa turbidez similar ao tubo n.º 5 da escala de MacFarland (figura 1). Todo processo de tratamento da amostra foi realizado na câmara de fluxo laminar.

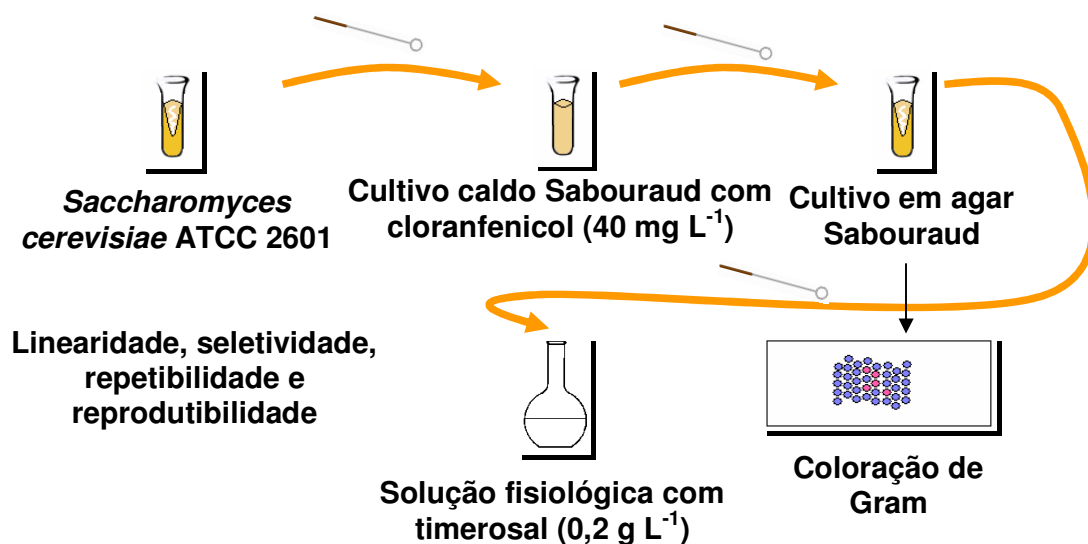


Figura 1 - Preparo das amostras

2.4 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

Para a contagem das células em câmara de Neubauer, foram utilizadas as lamínulas fornecidas em conjunto com a câmara, colocada sobre a área demarcada

na câmara de contagem. A suspensão celular foi homogeneizada por agitação em vórtex por 30 segundos. Encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula, a câmara de contagem foi cuidadosamente preenchida, de tal forma que a suspensão celular preenchesse apenas um lado da câmara e não chegasse aos canais de cada lado da área de contagem. Após dois minutos, a contagem foi realizada com auxílio de um microscópio óptico, nos quadrantes *A*, *B*, *C* e *D*, indicados na figura 2. Para se inferir a concentração celular pelo método da câmara de Neubauer, foi utilizada a seguinte equação:

equação (I) **C (células/mL) = 10000 x $N/4$,**

onde N é igual as células contadas nos quatro quadrantes da câmara.

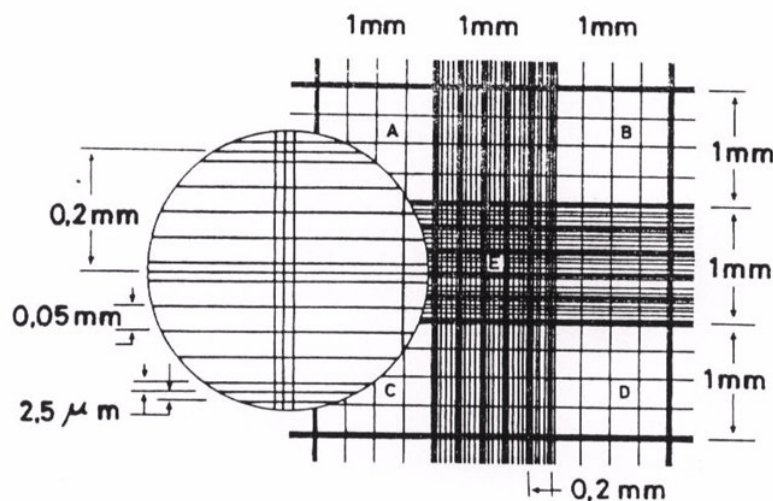


Figura 2 - Desenho esquemático da câmara de Neubauer.

2.5 CONTAGEM EM SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO

O método de determinação da concentração celular é baseado no desvio de radiação gerado pela presença dos microrganismos. Para tanto, uma curva analítica

de sulfato de bário e outra de *Saccharomyces cerevisiae* foram preparadas. A determinação da concentração é calculada através da combinação de um sistema de duas equações lineares das duas curvas analíticas. Assim sendo, igualando as duas equações tem-se:

equação (II)
$$m_1 \times C_1 + b_1 = m_2 \times C_2 + b_2$$

onde:

m_1 é o coeficiente angular da curva de sulfato;

C_1 é a concentração de sulfato;

b_1 é o coeficiente linear da curva de sulfato;

m_2 é o coeficiente angular da curva de *Saccharomyces cerevisiae*;

C_2 é a concentração de *Saccharomyces cerevisiae*;

b_2 é o coeficiente linear da curva de *Saccharomyces cerevisiae*.

Rearranjando a equação II temos a relação entre as concentrações das espécies (equação III).

equação (III)
$$C_2 = m_1/m_2 \times C_1 + (b_1-b_2)$$

2.5.1 Curva analítica de sulfato de bário

A determinação de sulfato é baseada na reação entre os íons sulfato e bário, em meio micelar de álcool polivinílico. Uma vez que o produto formado se precipita

na cela espectrofotométrica, a linha de base é instável. Portanto, uma solução de 0,3% (m/v) EDTA em NaOH $0,07 \text{ mol L}^{-1}$ foi empregada para solubilizar o precipitado.

A solução estoque de sulfato foi preparada com sulfato ferroso e as soluções padrão (2,5 a $25,0 \text{ mg L}^{-1}$) foram preparadas por diluições apropriadas a partir da solução estoque.

2.5.2 Curva analítica de *Saccharomyces cerevisiae*

A determinação da concentração celular é baseada na relação diretamente proporcional entre a radiação dispersa e a quantidade de microrganismos em solução fisiológica.

A solução estoque de *Saccharomyces cerevisiae* foi preparada como descrito ao final do procedimento no item 2.3 e as soluções padrão ($1,47 \times 10^9$ a $7,34 \times 10^9$ células L^{-1}) foram preparadas por diluições a partir da solução estoque.

2.5.3 Sistema de análise por injeção em fluxo

As leituras para ambos sistemas foram realizadas em 410 nanômetros, em espectrofotômetro, equipado com cela de fluxo ótica de 1cm. A bomba peristáltica foi usada para realizar o transporte dos líquidos nos tubos do polietileno (d.i. = 0.8mm) e Tygon. A aquisição de dados foi realizada por uma interface (PCL-711 AD/DA).

O módulo do sistema FIA, para a determinação de sulfato, é mostrado na figura 3. Através do injetor comutador (2: 3: 2), as amostras são introduzidas no fluxo carregador. Na primeira confluência, a reação turbidimétrica ocorre devido à mistura entre a amostra e o cloreto do bário (R2), de tal forma que o produto formado é medido pelo espectrofotômetro. Quando o injetor comutador é movido para a posição inicial, o EDTA (R1) é introduzido no lugar do cloreto do bário, e a linha base do sistema é restabelecida (KRUG et al., 1983).

Para a determinação da concentração celular utilizou-se o mesmo módulo do

sistema FIA (figura 3) empregado para a determinação de sulfato. A principal modificação é a troca do cloreto de bário usado na formação de sulfato de bário (R2) por solução fisiológica. Através do injetor comutador (2: 3: 2), as amostras são introduzidas no fluxo carregador. Na primeira confluência, ocorre a mistura da amostra com a solução fisiológica (R2). A fração de luz que emerge da cela de fluxo é detectada pelo espectrofotômetro. Quando o injetor comutador é movido para a posição inicial, o EDTA (R1) é introduzido no lugar da solução fisiológica, e a linha base do sistema é restabelecida.

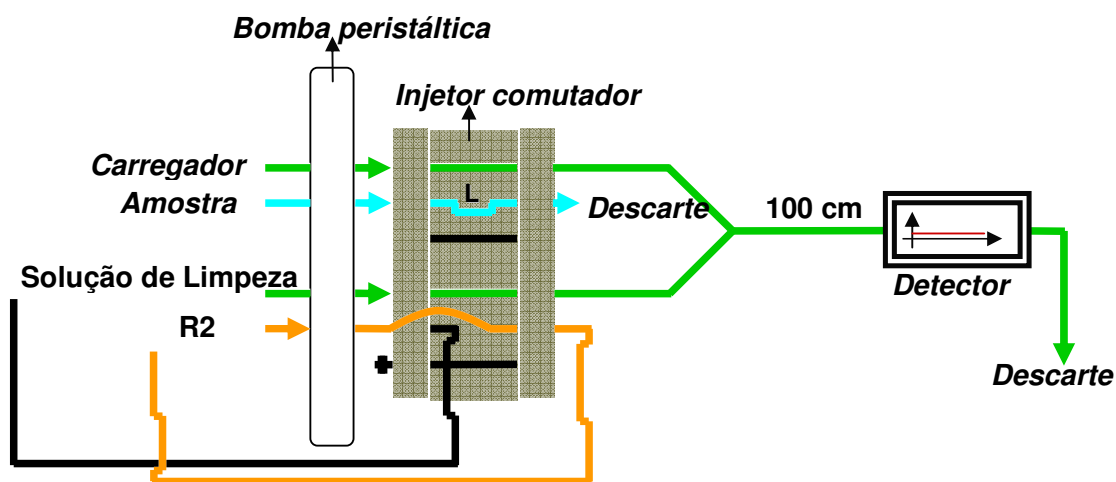


Figura 3 - Módulo do sistema FIA: A = amostra; C = fluxo carregador (solução fisiológica); R1 = 0,3% (m/v) EDTA em $0,07 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaOH}$; R2 = 5,0 % (m/v) $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 0,05% (m/v) álcool polivinílico (PVA) - para determinação de sulfato; solução fisiológica - para determinação da concentração celular; D = detector (espectrofotômetro, $\lambda = 410 \text{ nm}$); W = descarte; L = alça de amostragem (volume = $502 \mu\text{L}$). Os valores entre parênteses representam as taxas de fluxo empregadas no sistema FIA (mL/min).

2.6 FIGURAS DE MÉRITO

2.6.1 Seletividade

Em geral, uma forma simples de verificar a seletividade de um método é através do teste de interferentes. A seletividade do método proposto foi testada

frente a interferentes comumente presentes em probióticos e fermentos comerciais comuns (como ácido ascórbico, ácido fólico, amido, cálcio, cloreto de sódio, ferro, fósforo, glicose, histidina, magnésio, proteínas totais, piridoxina, potássio, e tiamina). Alíquotas de soluções desses interferentes foram introduzidas juntamente com um padrão de *Saccharomyces cerevisiae* ($3,83 \times 10^9$ células L⁻¹) a fim de produzir concentrações próximas aos níveis dessas substâncias nas amostras em questão. A concentração 1 é igual à concentração informada no rótulo dos produtos, obedecido o fator de diluição da amostra. As concentrações dois e três são iguais respectivamente a dez e cem vezes a informação fornecida no rótulo dos produtos, conforme segue na tabela 1.

Tabela 1 - Concentrações dos interferentes (g/L).

Interferentes	Concentração 1	Concentração 2	Concentração 3
Ácido ascórbico	$1,55 \times 10^{-3}$	$1,55 \times 10^{-2}$	$1,55 \times 10^{-1}$
Ácido fólico	$2,01 \times 10^{-8}$	$2,01 \times 10^{-2}$	$2,01 \times 10^{-6}$
Amido	$1,01 \times 10^{-1}$	1,01	$1,01 \times 10^{+1}$
Cálcio	$3,61 \times 10^{-3}$	$3,61 \times 10^{-2}$	$3,61 \times 10^{-1}$
Cloreto de sódio	$5,95 \times 10^{-1}$	5,95	$5,95 \times 10^{+1}$
Ferro	$1,21 \times 10^{-6}$	$1,21 \times 10^{-5}$	$1,21 \times 10^{-4}$
Fósforo	$4,20 \times 10^{-5}$	$4,20 \times 10^{-4}$	$4,2 \times 10^{-3}$
Glicose	$5,01 \times 10^{-1}$	5,01	$5,01 \times 10^{+1}$
Histidina	$9,14 \times 10^{-3}$	$9,14 \times 10^{-2}$	$9,14 \times 10^{-1}$
Magnésio	$2,11 \times 10^{-6}$	$2,11 \times 10^{-5}$	$2,11 \times 10^{-4}$
Proteínas totais	$4,43 \times 10^{-1}$	4,43	$4,43 \times 10^{+1}$
Piridoxina	$2,69 \times 10^{-5}$	$2,69 \times 10^{-4}$	$2,69 \times 10^{-3}$
Potássio	$1,33 \times 10^{-5}$	$1,33 \times 10^{-4}$	$1,33 \times 10^{-3}$
Tiamina	$1,35 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-4}$	$1,35 \times 10^{-3}$

2.6.2 Linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação, obtido pelo gráfico relacionado à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito. Para o estudo da linearidade do sistema FIA, foram realizadas leituras de padrões de sulfato de bário e *Saccharomyces cerevisiae*, cujas concentrações

variaram, respectivamente, entre 2,5 e 100 mg L⁻¹ e 1,47 x 10⁹ e 1,47 x 10¹⁰ células L⁻¹(USP30, 2007).

Para inferência dos limites de detecção e quantificação, foram realizadas dez leituras do branco, no caso, solução fisiológica, para células e água, para sulfato. O cálculo de ambos os limites é baseado na razão entre desvio padrão das dez leituras do branco e o coeficiente angular de cada curva de calibração. No caso do limite de detecção e quantificação, o valor obtido foi, respectivamente, igual a três e dez vezes a essa razão.

2.6.3 Repetibilidade

Para o ensaio da precisão intra-dia, foram realizadas três curvas analíticas distintas de sulfato de bário e *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se três equações que demonstram a relação entre os sinais de sulfato e do fungo. Foram preparadas três réplicas autênticas de três amostras contendo *Saccharomyces cerevisiae* com concentrações distintas (1,86 X 10⁹, 3,24 X 10⁹, 7,94 X 10⁹ células L⁻¹). A repetibilidade foi demonstrada pela média dos coeficientes de variação (%CV) das três amostras (USP30, 2007).

2.6.4 Reprodutibilidade

A precisão interdias é obtida por meio de alteração de condições, como mudança de analista, reagentes ou equipamento, ou utilização do método durante várias semanas. Para o ensaio da precisão interdias, foram realizadas curvas analíticas distintas de sulfato de bário e *Saccharomyces cerevisiae*, obtendo-se três equações que demonstram a relação entre eles, em três dias distintos e consecutivos. A precisão foi determinada através da análise de três réplicas autênticas de uma amostra com concentração igual a 3,24 x 10⁹ células L⁻¹. A reprodutibilidade foi demonstrada pela média dos coeficientes de variação (%CV) das três amostras obtidas em cada dia (USP30, 2007).

2.6.5 Exatidão

Para se avaliar a exatidão do método proposto, utilizou-se como método de comparação a câmara de Neubauer. Assim, amostras simuladas e produtos comerciais foram analisados em ambos os métodos, submetidos ao teste F e ao teste t pareado.

No caso das amostras simuladas, foram preparados, dez tubos contendo solução fisiológica, os quais receberam quantidades diferentes de microrganismos presentes no agar Sabouraud mencionado no item 2.3. Além disso, o método proposto foi aplicado na determinação de *Saccharomyces cerevisiae* nos produtos comerciais: fermentos secos Fleischmman[®] e Dona Benta[®], fermento fresco Fleischmman[®] e o probiótico Organonew[®].

2.7 APLICAÇÃO EM PRODUTOS COMERCIAIS

Na determinação do fungo em amostras comerciais, as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* foram preparadas adicionando 2,0 g da amostra a 1000 mL de solução fisiológica contendo timerosal e cloranfenicol, sob agitação à temperatura ambiente. Após o período de uma hora, as amostras foram lidas no sistema FIA. Para checar a exatidão, a contagem também foi feita ao microscópio óptico, retirando-se uma alíquota de 200 µL diluída em 800 µL da solução fisiológica. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 20 µL e colocada na câmara de Neubauer.

2.8 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA MONITORAR A CURVA DE CRESCIMENTO

No preparo das curvas de crescimento, cepas de *Saccharomyces cerevisiae* previamente isoladas foram transferidas para um tubo de ensaio contendo 50 mL de caldo Sabouraud, com cloranfenicol. Após 48 horas, um mL deste caldo, foi transferido para um erlenmeyer contendo um novo caldo, estéril, totalizando um

volume final de 50 mL. As amostras para monitorização da curva de crescimento foram mantidas a 25° C, sob agitação. Todo procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar.

Curvas analíticas de sulfato de bário e *Saccharomyces cerevisiae* foram realizadas para calibração do sistema FIA. Alíquotas de 0,2 mL das amostras foram transferidas para tubos de ensaios esterilizados, adicionando-se 14,8 mL de solução fisiológica. Ao mesmo tempo, o volume do meio foi ajustado com a adição de 0,2 mL de meio de cultivo esterilizado. As leituras foram realizadas a cada hora, até que a população microbiana atingisse a fase de crescimento estacionário (figura 4). Entende-se que a fase de crescimento estacionário é aquela que não se percebe aumento de sinal independente das diluições efetuadas na amostra. Para a contagem na câmara de Neubauer foram necessárias novas diluições da amostra a partir da oitava hora do procedimento para facilitar as contagens ao microscópio.

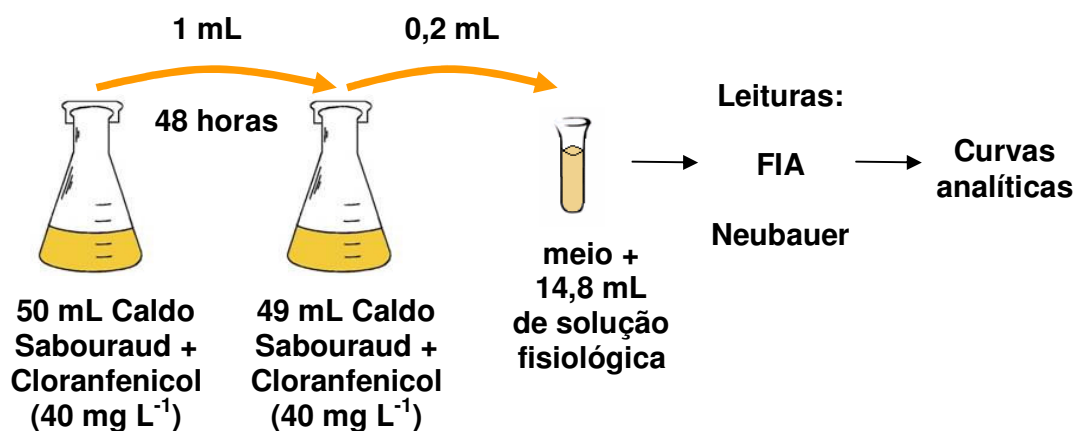


Figura 4 - Procedimento realizado para o ensaio da curva de crescimento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CONTAGEM EM CÂMARA DE NEUBAUER

A figura 5 representa a leitura de uma réplica da solução estoque obtida ao final do procedimento 2.3. O procedimento de leitura foi realizado como descrito em 2.4, sendo utilizada a equação I. Uma distribuição celular na câmara de Neubauer também é demonstrada por Pereira (1995). Notam-se discrepâncias entre as médias de cada quadrante, maiores que a verificada nesse estudo. São comuns variações entre os quadros adjacentes de leituras entre 10 e até 15 células. Isso demonstra que um dos maiores problemas da câmara de Neubauer é a falta de homogeneidade na amostra.

Os erros nas contagens são comuns principalmente por causa da falta de habilidade do operador. Também é freqüente associar os erros da contagem à amostragem errada, resultando em contagens imprecisas. Para minimizar esses erros, foram padronizados o tempo de agitação (igual a trinta segundos) e a rotação dos tubos de ensaios (3800 rpm), usados tanto para a contagem ao microscópio quanto para a contagem no sistema FIA.

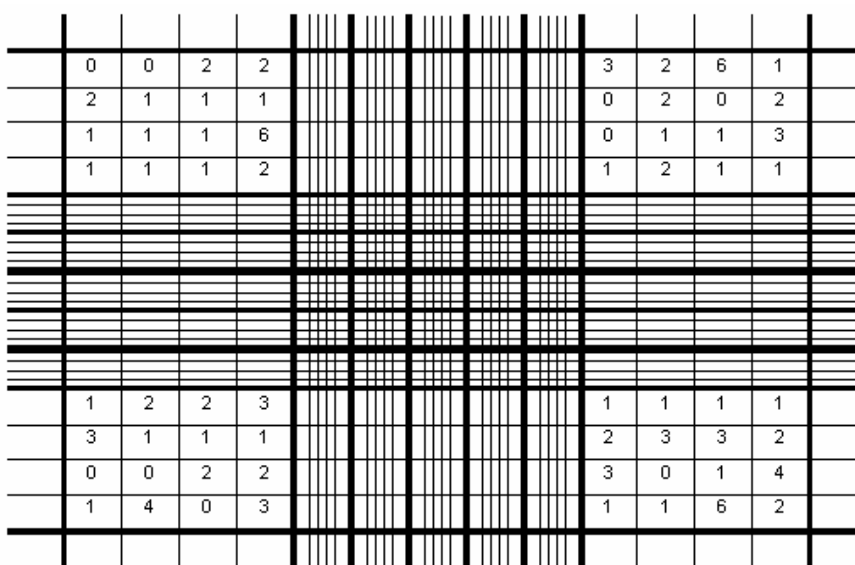


Figura 5 - Desenho esquemático da câmara de Neubauer mostrando um resultado da contagem de células de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE OS SINAIS

Nas figuras 6 e 7 estão apresentados os registros dos sinais obtidos no sistema proposto: as leituras foram feitas em triplicata para o sistema FIA, para a determinação de sulfato (figura 6) e *Saccharomyces cerevisiae* (figura 7). Pode-se notar a boa precisão das medidas, o coeficiente de variação foi menor que 4,55% e 2,95% para as concentrações de sulfato e *Saccharomyces cerevisiae*, respectivamente.

As equações lineares de ambas curvas analíticas foram relacionadas como proposto no item 2.5, para estabelecer a proporcionalidade entre a concentração de sulfato e a concentração de *Saccharomyces cerevisiae*. Assim, a equação obtida ($C_{S. cerevisiae} = 2,17 \times 10^8 C_{Sulfato} + 2,26 \times 10^{-3}$) foi usada para inferir a concentração de leveduras nas amostras. Uma das vantagens do método proposto é a possibilidade de quantificação células através da curva analítica de sulfato de bário, sendo dispensada a curva analítica de *Saccharomyces cerevisiae*. Esse fato, além de simplificar as análises, aumenta a frequência analítica e evita erros do operador durante os procedimentos microbiológicos de calibração do sistema.

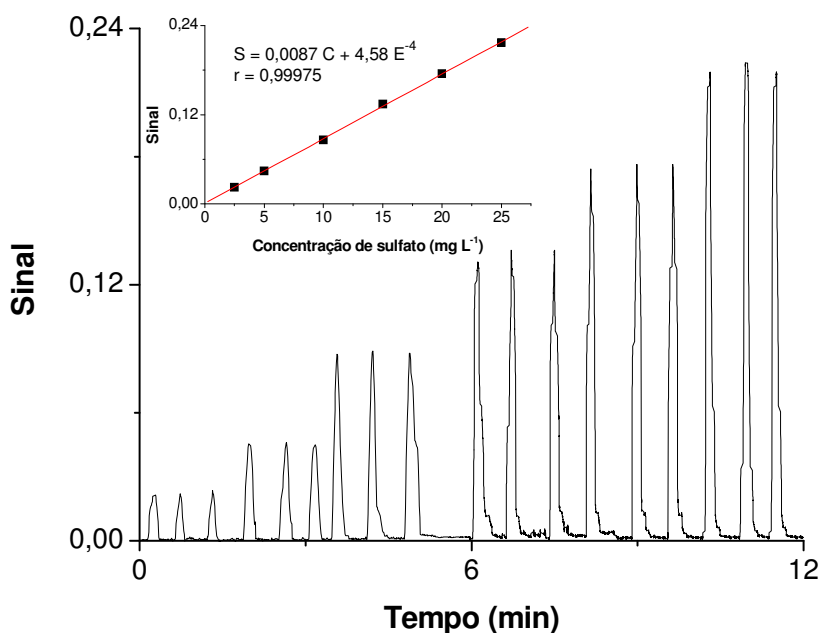


Figura 6 - Curva analítica e registros de sinais dos padrões de sulfato (2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 20,0 e 25,0 mg L⁻¹).

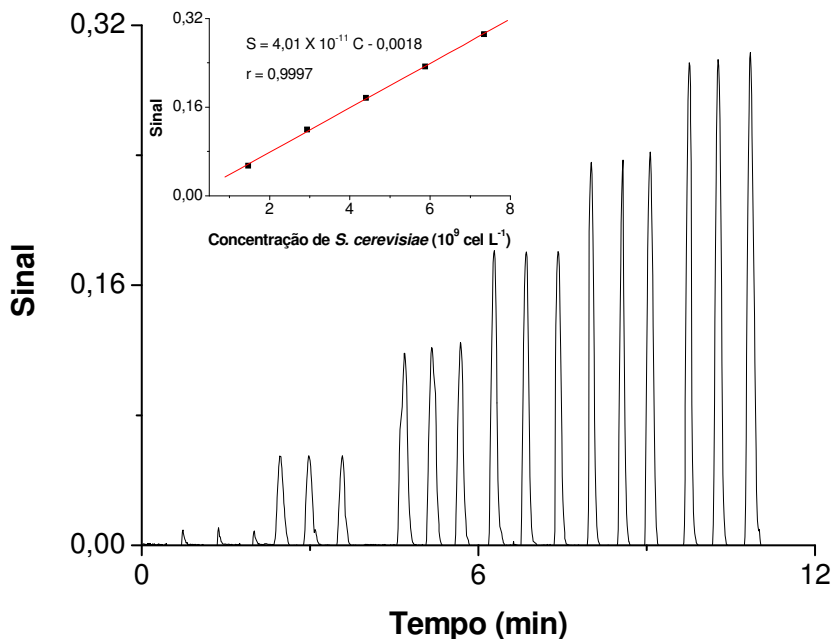


Figura 7 - Curva analítica e registros de sinais dos padrões de *Saccharomyces cerevisiae* ($0,0$, $1,47 \times 10^9$, $2,93 \times 10^9$, $4,41 \times 10^9$, $5,87 \times 10^9$, $7,34 \times 10^9$ células L^{-1}).

3.3 FIGURAS DE MÉRITO

3.3.1 Seletividade

A farmacopéia americana define a seletividade de um método analítico como sua habilidade em medir, de forma exata, um analito na presença de interferências, as quais se espera que estejam presentes na matriz da amostra. (USP30, 2007).

Foram testados os seguintes interferentes: ácido ascórbico, ácido fólico, amido, cálcio, cloreto de sódio, ferro, fósforo, glicose, histidina, magnésio, piridoxina, potássio, proteínas totais e tiamina. Para os testes, a quantidade de *Saccharomyces cerevisiae* mantida durante todo o experimento foi de $3,83 \times 10^9$ células L^{-1} . Todos os interferentes foram estudados em três concentrações conforme descrito no item 2.6.1. Os interferentes foram escolhidos considerando a composição das amostras

comerciais, sendo a concentração 1 do teste de interferente igual à mencionada no rótulo do produto, observada a diluição no preparo da amostra.

Como pode ser visto na tabela 2, a maior interferência, para a concentração 1, foi menor que 6%, o que pode ser considerado aceitável, devido à complexidade da amostra.

As interferências mais severas foram observadas para as proteínas. Esse composto provavelmente absorve radiação eletromagnética no comprimento de onda estudado, provocando aumento do sinal analítico.

Cabe lembrar que as concentrações que causaram maior interferência, para as proteínas, no presente trabalho, consistem de concentrações altas e diferentes das que são normalmente encontradas nas amostras estudadas, a concentração 1 apresentou interferência desprezível (3,85 %).

Tabela 2 - Estudo de interferentes.

Interferentes	Concentração 1	Concentração 2	Concentração 3
Ácido ascórbico	1,50%	2,52%	3,50%
Ácido fólico	5,99%	5,35%	6,29%
Amido	0,55%	1,57%	9,44%
Cálcio	0,25%	1,92%	4,55%
Cloreto de sódio	0,45%	0,46%	0,70%
Ferro	4,90%	3,86%	4,55%
Fósforo	2,45%	3,14%	4,00%
Glicose	3,18%	3,20%	4,20%
Histidina	0,74%	1,57%	1,40%
Magnésio	5,24%	5,03%	6,29%
Proteínas totais	3,85%	16,35%	54,20%
Piridoxina	0,34%	0,63%	2,10%
Potássio	0,64%	0,09%	2,45%
Tiamina	1,50%	2,52%	3,50%

3.3.2 Linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A linearidade é a resposta obtida em função da concentração do analito, a qual deve ser estudada em um intervalo de concentração apropriado. A faixa linear

de resposta é dependente do composto analisado e do tipo de detector utilizado. A linearidade foi determinada pelo coeficiente de correlação (R), obtido pelo gráfico relacionado à resposta do equipamento em função de várias concentrações do analito. O número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 7 pontos (DANZER; CURRIE, 1998; INMETRO, 2003).

A tabela 3 compila os parâmetros referentes à regressão linear. Observa-se que o método apresentou boa linearidade com $r > 0,999$ para ambas as determinações realizadas, nas faixas de concentração estudadas.

Os critérios utilizados para determinar o LOD e LOQ foram baseados nos parâmetros referentes ao coeficiente angular da curva analítica (m) e o desvio padrão de dez leituras consecutivas de uma solução branco (σ). Dessa maneira, os limites de detecção para sulfato e *Saccharomyces cerevisiae* foram, respectivamente, $0,109 \text{ mg L}^{-1}$ e $2,37 \times 10^8 \text{ células L}^{-1}$. Os limites de quantificação para sulfato e *Saccharomyces cerevisiae* foram, respectivamente, $0,363 \text{ mg L}^{-1}$ e $7,90 \times 10^8 \text{ células L}^{-1}$.

Tabela 3 - Parâmetros analíticos do método com relação à linearidade, ao limite de detecção e limite de quantificação do método proposto.

Parâmetros	Curva analítica de sulfato	Curva analítica de <i>S. cerevisiae</i>
Faixa linear	2,5 a 25 mg L^{-1}	1,47 a $7,34 \times 10^9 \text{ células L}^{-1}$
Coeficiente linear	$4,58 \times 10^{-4}$	$1,81 \times 10^{-3}$
Coeficiente angular (m)	$8,7 \times 10^{-3} \text{ L mg}^{-1}$	$4,01 \times 10^{-11} \text{ L células}^{-1}$
Coeficiente de correlação (r)	0,9997	0,9993
Desvio padrão (σ)	$3,16 \times 10^{-4}$	$3,16 \times 10^{-4}$
LOD ^a	$1,09 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$	$2,37 \times 10^8 \text{ células L}^{-1}$
LOQ ^b	$3,63 \times 10^{-1} \text{ mg L}^{-1}$	$7,90 \times 10^8 \text{ células L}^{-1}$

^a LOD = $3 * (\sigma / m)$

^b LOQ = $10 * (\sigma / m)$

3.3.3 Repetibilidade

A precisão intra-dia foi determinada através da análise das amostras em três níveis de concentração ($1,86 \times 10^9$, $3,24 \times 10^9$, $7,94 \times 10^9 \text{ células L}^{-1}$) com três

determinações para cada nível. A repetibilidade foi demonstrada pela média dos coeficientes de variação (%CV) (Palmigiani, 2005), onde o valor obtido foi de 1,5. Os dados apresentados na tabela 4 mostram uma boa precisão, uma vez que não foram superiores a 2%.

Tabela 4 – Precisão do método – Repetibilidade

Concentração da amostra ^a	% CV
1,86 X 10 ⁹ células L ⁻¹	1,7
3,24 X 10 ⁹ células L ⁻¹	1,6
7,94 X 10 ⁹ células L ⁻¹	1,3
CV ^b (%)	1,5

^a três determinações para cada nível

^b CV (nove determinações)

3.3.4 Reprodutibilidade

A precisão foi determinada através da análise de uma amostra (3,24 x 10⁹ células L⁻¹) em três dias diferentes. A reprodutibilidade foi demonstrada pela média dos coeficientes de variação (%CV), onde o valor obtido foi de 11,49%. Segundo Palmigiani (2005), o coeficiente de variação deveria ser menor que 4% para produtos farmacêuticos.

É oportuno lembrar que além de prover estimativas da repetitividade e da reprodutibilidade de um método analítico, esses estudos fornecem uma estimativa objetiva do desempenho do Laboratório, encorajando a autocrítica e a percepção dos erros cometidos durante análises e, sobretudo, ajuda na identificação das necessidades de treinamento de pessoal.

3.3.5 Exatidão

Para se avaliar a exatidão das medidas foi empregada comparação com o método de contagem em câmara de Neubauer, no caso, amostras de próbióticos e

fermento biológico. Na tabela 5, é verificado que o intervalo de confiança do método proposto é menor que a contagem em Câmara de Neubauer.

Tabela 5 - Comparação entre o método proposto e câmara de Neubauer em amostras simuladas.

Amostras	Câmara de Neubauer (10^9 células L^{-1})	Sistema FIA (10^9 células L^{-1})
A	$4,35 \pm 2,41^1$	$4,73 \pm 0,06$
B	$6,38 \pm 7,02$	$6,63 \pm 0$
C	$9,35 \pm 7,94$	$10,53 \pm 0,05$
D	$1,20 \pm 1,58$	$1,29 \pm 0,09$
E	$1,85 \pm 0,65$	$1,92 \pm 0,03$
F	$2,81 \pm 0,69$	$2,90 \pm 0,04$
G	$2,17 \pm 0,71$	$2,42 \pm 0,02$
H	$0,51 \pm 1,58$	$0,76 \pm 0,03$
I	$5,67 \pm 1,06$	$5,62 \pm 0,20$
J	$11,62 \pm 4,92$	$10,44 \pm 0,78$

¹ Valores são mostrados como média \pm intervalo de confiança (média $\pm \frac{ts}{\sqrt{n}}$) com $\alpha=0,05$, ($n=3$).

Os resultados do método FIA foram comparados com os resultados da câmara de Neubauer e não houve diferença significativa em 95% do nível de confiança (teste-t pareado). Nesse caso, os resultados entre os métodos convencional e proposto não foram submetidos ao teste F. Pode ser percebida na tabela 5 que quanto maior a concentração das amostras, maior o desvio verificado, especialmente no tocante aos resultados do método convencional.

Na câmara de Neubauer, as causas mais freqüentes de erros que modificam os resultados da contagem são: câmaras ou pipeta mal calibradas; mal ajuste da lamínula, da adsorção das células na pipeta, da distribuição heterogênea na câmara, falta de experiência do operador e amostragem não representativa da suspensão celular. A determinação para a câmara de Neubauer apresentou menor precisão como pode ser verificado pelo intervalo de confiança mostrado na tabela 5. Na determinação através do sistema FIA, as características vantajosas devem ser destacadas como a rapidez na determinação (freqüência da determinação = $120 h^{-1}$), além da precisão.

3.4 APLICAÇÃO EM PRODUTOS COMERCIAIS

Na tabela 6, é verificado que o intervalo de confiança do método proposto é menor que a contagem em Câmara de Neubauer. Os resultados do método FIA foram comparados com os resultados da câmara de Neubauer e não houve diferença significativa em 95% do nível de confiança (teste-t pareado). Esse fato demonstra a aplicabilidade do método proposto para quantificação de *Saccharomyces cerevisiae* em produtos comerciais. Segundo Fleet (2007), novas ferramentas analíticas que tenham a habilidade para quantificar cepas são fundamentais para compreensão da ocorrência e significância das cepas em alimentos e bebidas.

Maukonen e colaboradores (2006) avaliaram diferentes métodos de contagem para probióticos, dentre eles, métodos de fluorescência ao microscópio, citometria de fluxo e contagem em placa. É concluído neste trabalho que técnicas fluorescentes provaram ser adequadas para uma rápida avaliação da quantidade de células em amostras de probióticos. Entretanto admitem as limitações dessa técnica, relacionadas principalmente à necessidade do pré-tratamento da amostra. Com relação a esse aspecto, o presente trabalho apresenta-se como alternativa viável para enumeração de leveduras em probióticos, uma vez que não foi necessário nenhum pré-tratamento das amostras. Além disso, podem ser mencionadas características como a simplicidade, o baixo custo, a precisão e a exatidão satisfatórias.

Tabela 6 - Determinação da concentração celular através da Câmara de Neubauer e do sistema FIA em amostras de probiótico e fermentos biológicos.

Amostras	Câmara de Neubauer (10 ⁹ células L ⁻¹)	Sistema FIA (10 ⁹ células L ⁻¹)
Organonew [®]	0,897 ± 0,070 ¹	0,802 ± 0,017
Dona Benta [®]	1,35 ± 0,05	1,37 ± 0,01
Fleischmman [®] seco	2,10 ± 0,16	2,05 ± 0,05
Fleischmman [®] fresco	1,01 ± 0,10	1,11 ± 0,02

¹ Valores são mostrados como média ± intervalo de confiança (média ± $\frac{ts}{\sqrt{n}}$) com $\alpha=0,05$, (n=3).

3.5 APLICAÇÃO DO MÉTODO PARA MONITORAR A CURVA DE CRESCIMENTO

Depois de otimizado, o método foi usado para monitorar o crescimento celular (figura 8). Durante o experimento, a cultura de leveduras foi mantida sob agitação a 25°C. A cultura permaneceu em fase lag até um período de quatro horas. A partir de então, a cultura exibe uma fase logarítmica até a décima quarta hora e, em seguida, fase estacionária atingindo uma concentração celular igual a $1,98 \times 10^{11}$ células L⁻¹. Assim como no trabalho de Esti e colaboradores (2004), por se tratar de um sistema FIA, diluições das amostras são facilmente aplicáveis quando a concentração celular ultrapassa a faixa linear do método. Ao invés de se diluir a amostra previamente, pode-se optar pela diluição em linha, no sistema FIA, pelo aumento da vazão da solução fisiológica. Dessa maneira, minimiza os erros do operador durante as etapas de diluição.

No trabalho de Muller (2007), a densidade óptica de uma solução contendo *Saccharomyces boulardii* é comparada à massa celular da amostra (g L⁻¹). Os autores elaboraram uma curva analítica correlacionando a massa celular à medida de densidade óptica (DO). Por regressão linear estimaram uma equação linear para calcular a massa celular das amostras. A solução foi filtrada por uma membrana de 0,22 µm. No procedimento de crescimento celular não foi observado a fase lag devido à utilização de um pré-inóculo. A fase log é evidenciada a partir da quinta hora, sendo que curva apresenta uma inclinação acentuada até a décima segunda hora.

Já o trabalho Weiss, Delproposto e Girouw (2004) corrobora com o presente trabalho, com relação ao tempo de duração das fases lag e log, durante o crescimento do fungo *Saccharomyces cerevisiae*. Segundo esses autores, culturas inoculadas com uma concentração inicial de 1×10^8 células L⁻¹ são altamente reprodutíveis e têm um tempo médio para alcançar o máximo de crescimento 13.9 ± 0.21 h. Ainda afirmaram que esta reprodutibilidade permite a medida quantitativa precisa do parâmetro do crescimento.

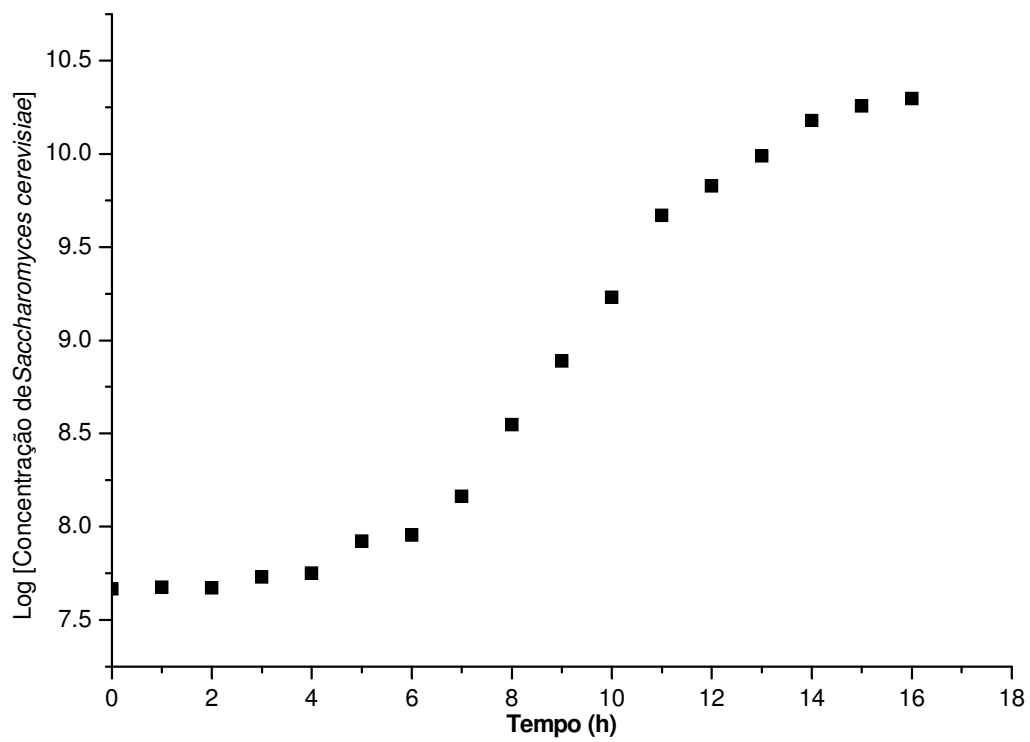


Figura 8 - Curva de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

4 CONCLUSÕES

O presente trabalho fornece um método alternativo da contagem de célula que apresenta diversas vantagens sobre a câmara de Neubauer. O método é mais rápido, já que a frequência analítica é igual a 120 determinações por hora, aproximadamente 30 vezes maior que a contagem manual.

O método de determinação turbidimétrico exige menos tempo do treinamento de operador. Por isso, a principal característica do método desenvolvido é a simplicidade de operação para determinação da concentração celular em amostras de probióticos e fermento biológico.

O método apresentou seletividade satisfatória, uma vez que as interferências mais severas foram observadas apenas para as proteínas, sendo nas concentrações dez e cem vezes maior que o encontrado nas amostras de probiótico e fermento biológico.

Quanto à exatidão, não houve diferença significativa em 95% do nível de confiança entre os resultados do método FIA e os resultados da câmara de Neubauer.

Adicionalmente, a repetibilidade evidenciada pelo intervalo de confiança (menor que 0,8) e o ensaio de precisão intra-dia é notavelmente boa (menor que 2,0%).

Quanto à monitoração do crescimento microbiano, os resultados foram satisfatórios, mostrando a possibilidade de utilização do método nesses ensaios.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABU-ABSI, N. R. et al. Automated flow cytometry for acquisition of time-dependent population data. **Cytometry**, v. 51, n. 2, p. 87-96, Feb. 2003.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. O. **Food microbiology**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. p 23-66.

ALBERT, A. A. et al. Preoperative high leukocyte count: a novel risk factor for stroke after cardiac surgery. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 75, n. 5, p. 1550-1557, May 2003.

AKADA, R. Genetically modified industrial yeast ready for application. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 94, n. 6, p. 536-544, Aug. 2002.

BACAL, N. S.; Faulhaber, M.H.W. Aplicação prática em citometria de fluxo. São Paulo: Editora Atheneu, 2003

BAI, F. W.; ANDERSON, W. A.; YOUNG, M. M. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 89-105, Jan. 2008.

BARON, E. J. O.; PETERSON, L. R.; FINEGOLD, S. M. **Bailey & Scott diagnostic microbiology**. 9. ed. Saint Louis, USA: Mosby-Year Book, 1994. 958 p.

BATTEGAY, M. et al. Immunological recovery and antiretroviral therapy in HIV-1 infection. **The Lancet Infectious Diseases**, May 2006, v. 6, n. 5, p. 280-287.

BROOKS, G. I.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Jawetz, Melnick & Sodelberg's medical microbiology**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p 39-51.

BURTON, G. R. W.; ENGELKIRK, P. G. **Microbiology for the health sciences**. 5. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1998. p 82-117.

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GANGE, J. M. **Collins and Lyne's microbiological methods**. 6. ed. Oxford: Butterworth, 1989. p 127-140.

DANZER, K.; CURRIE, L. A. Guidelines for Calibration in Analytical Chemistry, Part

1: Fundamentals and Single Component Calibration, IUPAC Recommendation. **Pure and Applied Chemistry**, v. 70, n. 4, p. 993-1014, Aug. 1998.

DAWSON, K. A. Not just bread or beer: new applications for yeast and yeast products in human health and nutrition. In: LYONS, T. P.; HOWER, J. M. (Ed.). **Nutrition Biotechnology in the Feed and Food Industry**. Nottingham: University Press, 2002. cap. 8, p. 225-232.

ELKIND, M. S. et al. Elevated white blood cell count and carotid plaque thickness : the northern Manhattan stroke study. **Stroke**, v. 32, n. 4, p. 842-849, Apr. 2001.

ESTI, M. et al. Electrochemical biosensors for monitoring malolactic fermentation in red wine using two strains of *Oenococcus oeni*. **Analytica Chimica Acta**, v. 513, n. 1, p. 357-364, June. 2004.

FLEET, G. H. Yeast in foods and beverages impact on product quality and safety. **Current Opinion in Biotechnology** v. 18, n. 2, p. 170-175, abr.2007.

FLEET, G. H.; BALIA, R.; The public health and probiotics significance of yeast in foods and beverages. In: QUEROL, A. (Ed.). **Yeast in Food and Beverages**. Berlin: Springer, 2006. cap. 12, p. 381-398.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. p 21-64.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. p. 13-26.

FUSSENEGGER, M.; BAILEY, J. E. Molecular regulation of cell-cycle progression and apoptosis in mammalian cells: implications for biotechnology. **Biotechnology Progress**, v. 14, n. 6, p.807-833, Dez. 1998.

HAMMER, S. M. et al., A controlled trial of two nucleoside analogues plus indinavir in persons with human immunodeficiency virus infection and cd4 cell counts of 200 per cubic millimeter or less. **The New England Journal of Medicine**, v. 337, n. 11, p. 725-733, Sept. 1997.

HINNEN, A.; HICKS, J. B.; FINK, G.R. Transformation of yeast. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 75, n. 4, p. 1929-1933, Apr. 1978.

HYTTIÄ, E. et al. Predicted and observed growth and toxigenesis by *Clostridium botulinum* type E in vacuum-packaged fishery product challenge tests. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 161-169, Mar. 1999.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Mar. 2003. p. 14.

JEPRAS, R. I. et al. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 2696-2701, July 1995.

JUOZAPAITIS, M. et al. Synthesis of recombinant human parainfluenza virus 1 and 3 nucleocapsid proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Virus Research**, v. 133, n. 2, p. 178-186, May 2008.

KOREN-MORAG, N.; TANNE, D.; GOLDBOURT, U. White blood cell count and the incidence of ischemic stroke in coronary heart disease patients. **The American Journal of Medicine**, v. 118, n. 9, p. 1004-1009, Sept. 2005.

KORKEALA, W. H. et al. Type E botulism associated with vacuum-packaged hot-smoked. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 1-5, Aug. 1998.

KRUG, F. J. et al.; Turbidimetric determination of sulphate in plant digests and natural waters by flow injection analysis with alternating streams. **Analytica Chimica Acta**. v. 145, p. 179-187, 1983.

KUDA, T.; SHIMIZU, K.; YANO, T. Comparison of rapid and simple colorimetric microplate assays as an index of bacterial count. **Food Control**, v. 15, n. 6, p. 421-425, Sept. 2004.

KULSTAD, E. B.; KULSTAD, C. E.; LOVELL, E. O. A rapid quantitative turbidimetric d-dimer assay has high sensitivity for detection of pulmonary embolism in the ED. **American Journal Of Emergency Medicine**, v. 22, n. 2, p. 111-114, Mar. 2004.

LEISING, A. W. et al. Copepod grazing during spring blooms: Does *Calanus pacificus* avoid harmful diatoms? **Progress in Oceanography**, v. 67, n. 3, p. 384-405, Nov. 2005.

LENNETTE, E. H. et al. **Manual of clinical microbiology**. 4. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1985. p. 336-352.

LINDBERG, W. et al. D. Fast kinetic measurements and on-line dilution by flow injection cytometry. **Cytometry**, v. 16, n. 4, p. 324-330, Aug. 1994.

MAUKONEN, J. et al. Suitability of the Fluorescent techniques for the enumeration of probiotic bacteria in commercial non-dairy drinks and in pharmaceutical products. **Food Research International**, v. 39, n. 1, p. 22-32, Jan. 2006.

MEUWLY, F. et al. Use of glucose consumption rate (GCR) as a tool to monitor and control animal cell production processes in packed-bed bioreactors. **Journal of Biotechnology**, v. 122, n. 1, p. 122-129, Mar. 2006.

MOUTON, J. W.; VINKS, A. A. Pharmacokinetic/Pharmacodynamic modelling of antibacterials in vitro and in vivo using bacterial growth and kill kinetics: the minimum inhibitory concentration versus stationary concentration. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 44, n. 2, p. 201-210, Feb. 2005.

MULLER, J. L. et al. Comparação do crescimento de *Saccharomyces boulardii* em fermentador batelada tipo air lift e shaker. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, v. 27 n.4, p. 787-792, Out.-Dez. 2007

NUNES DA SILVA, P. F. et al. Correlação entre o hemocítômetro e outras técnicas de rotina para a contagem do número de plaquetas em cães atendidos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (H. V.-UEL). **Semina: Ciências Agrárias**, v. 28, n. 4, p. 659-664, Out.-Dez. 2007.

ODUM, E. P. **Basic ecology**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988. p. 141-182.

OLSSON, L.; NIELSEN J. On-line and in situ monitoring of biomass in submerged cultivations. **Trend in Biotechnology**, v. 15, n. 12, p. 517-522, Dez. 1997.

PALMIGIANI, A.L. M. L. **Avaliação das Incertezas de Medições Analíticas em Implementação de um Modelo de Controle**. 2005. 119f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Imunobiológicos) - Departamento de Qualidade, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

PARAMESWARAN, K.; HARGREAVE, F. E. The use of sputum cell counts to evaluate asthma medications. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 52, n. 2, p. 121-128, Aug. 2001.

PATTANAPANYASAT, K.; THAKAR, M. R. CD4+ T cell count as a tool to monitor HIV progression & anti-retroviral therapy. **Indian Journal of Medical Research**, v. 121, n. 4, p. 539-549, Apr. 2005.

PELCZAR JR., J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996, v. 1, p. 145-182. a

PELCZAR JR., J. M.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R., **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996, v. 2, p. 371-416. b

PEREIRA, R. S. **Fermento Biológico de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*): Aspectos Bioquímicos e Microbiológicos e a influência deles em síntese orgânica assimétrica**. 1995. 137f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química Orgânica, UNICAMP, Campinas, 1995.

REYNOLDS, C. S.; TUNDISI, J.G.; JINO, K. Observations on a metalimnetic *Lyngya* Population in a stably stratified tropical lake (Lagoa Carioca Eastem Brazil). **Archiv für Hydrobiologie**, v. 97, p.1-17, 1983.

RIBEIRO, T. et al. Development, validation, and applications of a new laboratory-scale indirect impedancemeter for rapid microbial control. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 1, p. 35–41, Nov. 2003.

SCHMITZ, C.; KORR, H.; HEINSEN, H. Design-based counting techniques: the real problems. **Trends in Neurosciences**, v. 22, n. 8, p. 345, Aug. 1999.

SCHÜGERL, K. et al. Monitoring and control of recombinant protein production. **Analytica Chimica Acta**, v. 279, n. 1, p. 3-16, July 1993.

SCHULLER, D. E. **Desenvolvimento de um meio de culturaselectivo/diferencial para a levedura de contaminação alimentar *Zygosaccharomyces bailii*** 1998. 133f. Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente) - Departamento de Biologia, Universidade do Minho, Braga.

SIMIC, G. et al. Volume and number of neurons of the human hippocampal formation in normal aging and Alzheimer's disease **The Journal of Comparative Neurology**, v. 379, n. 4, p. 482-494, Mar. 1997.

SKLAR, L. A. et al. Flow cytometric analysis of ligand-receptor interactions and molecular assemblies. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 31, p. 97-119, June 2002.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J. **Fundamentals of analytical chemistry**. 7. ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1996. p. 456.

STOWE, R. P. et al. Nondestructive and continuous spectrophotometric measurement of cell respiration using a tetrazoliumformazan microemulsion. **Journal of Microbiological Methods**, v. 22, n. 3, p. 283-292, June 1995.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiology: an introduction**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p. 111-209.

TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. p. 21-36.

United States Pharmacopeia, **USP30**. 30 ed. Rockville USA Convention, 2007, p. 549-680.

VACINA contaminada matou seis pessoas na China. **Jornal Tribuna de Macau**. Macau, 03 jun. 2008. n. 2822.

VITTORIO, C. C.; MUGLIA, J. J. Anticonvulsant hypersensitivity syndrome. **Archives of Internal Medicine**, v. 155, n. 21, p. 2285-2290, Nov. 1995.

VOHR, H.-W.; RÜHL-FEHLERT, C. Industry experience in the identification of the immunotoxic potential of agrochemicals. **The Science of the Total Environment**, v. 270, n.1-3, p. 123-133, Apr. 2001.

WEISS, A.; DELPROPOSTO, J.; GIROUX, C. N. High-throughput phenotypic profiling of gene-environment interactions by quantitative growth curve analysis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Analytical Biochemistry**, v. 327, n. 1, p. 23-34, Apr. 2004.

WEST, M. J. et al. Estimation of the number of somatostatin neurons in the striatum: An in situ hybridization study using the optical fractionator method. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 370, n. 1, p. 11-22, June. 1996.

APÊNDICE A - ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA ANALYTICAL BIOCHEMISTRY

Elsevier Editorial System(tm) for Analytical Biochemistry
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: Development of a Turbidimetric Flow Injection Analysis System for Cell Counting

Article Type: Notes and Tips

Section/Category: Physical Techniques

Keywords: FIA; Neubauer Chamber; Cell count; Turbidimetry; *Saccharomyces cerevisiae*.

Corresponding Author: Doctor Pedro Orival Luccas,

Corresponding Author's Institution: Universidade Federal de Alfenas

First Author: Gustavo S Pessôa

Order of Authors: Gustavo S Pessôa; Marina N Magalhães; Siqueira M Antônio; Wisniewski Célio; César R Tarley; Pedro Orival Luccas

Abstract: A flow injection analysis (FIA) system with turbidimetric determination for cell counting was developed. Similar to the McFarland's method, the present work is based on the proportionality between the turbidimetric signals obtained for barium sulfate suspension and cell suspension. The results obtained, using the proposed procedure, were compared with results obtained in the Neubauer Chamber and there was no significant difference at confidence level of 95% (paired t-test). The main advantages of the FIA system were high sample throughput and good precision; both parameters proved to be better than conventional counting system into Neubauer Chamber. The method was also tested to monitor the cells growth and showed satisfactory results.

Alfenas, September 18th August, 2008.

Dear Editor,

We are sending you a paper named: Development of a Turbidimetric Flow Injection Analysis System for Cell Counting, with intention to publish in the Analytical Biochemistry. In the best of our knowledge, it is the first time that is done.

Sincerely,

Dr. Pedro Orival Luccas

Departamento de Ciências Exatas
Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, Centro, Alfenas, Minas Gerais, Brazil
Zip code: 37130000
e-mail: pedro@unifal-mg.edu.br
phone/fax number: 21+ 55 35 3299 1262

Development of a Turbidimetric Flow Injection Analysis System for Cell Counting¹

Development of FIA System for Cell Counting

Gustavo de Souza Pessôa, Marina Nali de Magalhães, Antônio Martins de Siqueira, Célio Wisniewski, César Ricardo Teixeira Tarley, Pedro Orival Luccas*

Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714, CEP 37130-000, Alfenas, Minas Gerais, Brazil

Category: Labeling procedures

*Corresponding author. Tel +55 35 3299 1047; fax +55 35 3299 1262;
E-mail address: pedro@unifal-mg.edu.br (P.O. Luccas)

¹ We acknowledge financial support from the Capes, Finep and also the CNPq by M.N.M. scholarships.

Keywords: FIA, Neubauer Chamber, Cell count, Turbidimetry, *Saccharomyces cerevisiae*.

Abstract

A flow injection analysis (FIA) system with turbidimetric determination for cell counting was developed. Similar to the McFarland's method, the present work is based on the proportionality between the turbidimetric signals obtained for barium sulfate suspension and cell suspension. The results obtained, using the proposed procedure, were compared with results obtained in the Neubauer Chamber and there was no significant difference at confidence level of 95% (paired *t*-test). The main advantages of the FIA system were high sample throughput and good precision; both parameters proved to be better than conventional

counting system into Neubauer Chamber. The method was also tested to monitor the cells growth and showed satisfactory results.

Introduction

Cell count is a procedure that has been used in various areas of science and can be executed basically by three ways: direct count¹, turbidimetric methods² and viable cells count³. This parameter is important, for example, to monitor microorganism growth in culture media which are used in microbiology, food technology, biotechnology and pharmaceutical industry studies⁴.

Some methods, common in instrumental analytical chemistry, have also been used for cells count including both viable and non-viable cells^{5,6}. One of the most important instrumental techniques for cells counting is turbidimetry⁷.

The present work was inspired in the McFarland method in which turbidity of cells suspensions was compared with standard suspensions of barium sulfate⁸. One intrinsic difficulty of the McFarland technique is the instability of the suspensions due to its precipitations. Such problem is also present in the conventional instrumental turbidimetric measurements. However, this drawback can be circumvented by using flow injection analysis (FIA)⁹ system as will be demonstrated in the present work.

The aims of this work were to propose and evaluate a turbidimetric FIA system for *Saccharomyces cerevisiae* cell counting. Initially, analytical curves (equations) for the analytes, with the same FIA system, were obtained with barium sulfate and *S. cerevisiae* standards and a linear combination between linear equations, obtained for both analytes, resulted in the correlation between $C_{Saccharomyces}$ and $C_{sulfate}$. As in the McFarland technique, after the determination of the correlation between analyzed standards, only the analytical curve with barium sulfate was enough for cells count.

Experimental

Saccharomyces cerevisiae strains (ATCC 2601) were cultivated in Sabouraud broth with chloramphenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2O_5$), which is an antibiotic of wide use, thus, contaminants bacteria are eliminated. A kit for gram coloration (NEWPROV) was used to confirm the bacteria elimination. Following that, the strains were inoculated in Sabouraud agar without antibiotic. After five days cultivation at 28° C in incubator (FANEM), the cells were collected and inoculated in physiological solution. The cellular suspension was centrifuged and the sediment was added in 0.9% (m/v) NaCl suspension (stock solution) containing 2×10^{-3} w/v thimerosal ($C_9H_9HgNaO_2S$) to stop the yeast growth. All the sample treatment process was done in the flow laminar chamber (LABCONCO).

Reagents and solutions: The sulfate determination is based on the reaction between sulfate and barium ions (barium chloride - Reagen) in micellar medium of polyvinyl alcohol (SIGMA)¹⁶. Sulfate stock solution was prepared with ferrous sulfate (VETEC) and reference solutions (5.0 to 100.0 mg L⁻¹) were prepared by appropriate dilutions from the stock solution.

Saccharomyces cerevisiae stock solution was prepared with turbidity similar to the tube number 5 of McFarland scale⁸ and reference solutions (1.46×10^9 to 7.34×10^9 cell L⁻¹) were prepared by appropriate dilutions from the stock solution.

Flow Injection Analyses (FIA): The readings for both systems were done at 410 nm in a UV-Vis (FEMTO - model 482) spectrophotometer, with 1cm optical path flow cell. A peristaltic pump (Ismatec- Zurich, Switzerland, 7618-40 model) was used to propel the fluids through polyethylene tubes ($\phi = 0.8$ mm). The data were recorded by a PCL-711

(ADAVANTECH) AD/DA interface. The FIA system, for sulfate signals, is shown in Figure 1. For the best comparison the sign for cells suspensions were obtained with the same FIA system used for barium sulfate (Figure 1), but, a physiological solution was introduced into the carrier stream, R1 and R2 channels.

Cell count in Neubauer chamber: Aliquots of 10 until 15 μL of homogenized suspension were introduced into a Neubauer Chamber⁵. The count was made through the stereoscopic microscope (OLYMPUS BX41 and CX40).

Interference studies: The selectivity of the proposed method was tested considering the composition of studied samples (two ferments and one probiotic samples). Thus, the studied interferents were: ascorbic acid, folic acid, amide, calcium, sodium chloride, iron, phosphorous, glucose, hystidine, magnesium, proteins, pyridoxine, potassium and thiamine). Aliquots of solutions of those interferents were mixed with *Saccharomyces cerevisiae* solution (3.83×10^9 cells L^{-1}). Three interferent concentrations were examined: the first one was the same found in the sample and the others were ten times and a hundred times higher than the first one.

Application in real samples: The samples were prepared adding 2.0 g of the samples to 1000 mL of physiologic solution containing thimerosal and chloramphenicol, under agitation and constant temperature. After the period of one hour, the samples were determined in the FIA system. To check the accuracy, the determination by the optical microscope was also done, leaving an aliquot of 200 μL diluted in 800 μL of the physiologic solution. Soon after, an aliquot of 20 μL was removed and placed in the camera of Neubauer.

Cells growth studies: *Saccharomyces cerevisiae* strains had been inoculated into an assay tube containing 10 mL of Sabouraud broth with chloramphenicol. After 48 hours 1 mL of the Sabouraud broth was transferred to an erlenmeyer containing a sterile new broth, totalizing a final volume equal to 50 mL. Samples were kept at 25° C under continuous shaking throughout the procedure. The microbial growth was followed by the proposed method, and for this, measurements were done each hour, until the microbial population reached the steady state of growth phase.

Results and discussion

After optimization, the obtained sulfate analytical curve was: ($S = 0.0087C_{\text{sulfate}} + 0.0005$) and the *S. cerevisiae* analytical curve: ($S = 4.01 \times 10^{-11} C_{S.cerevisiae} - 0.0018$).

The linear equations of both analytical curves have been combined in order to establish proportionality between the sulfate concentration and the *S. cerevisiae* concentration. Thus, the obtained linear equation ($C_{S.cerevisiae} = 1.088 C_{\text{sulfate}} + 0.0023$) can be used to determine the microorganisms concentrations in the unknown samples.

The interference studies: There is no significant interference, based on reduced increase of the analytical signal (in percentage) of the *Saccharomyces cerevisiae* solution (3.83×10^9 cells L^{-1}). For the concentration two and three the main interference is caused by protein, nevertheless, these concentrations are not present in real sample, so these results indicate that analyst should be attentive with this interfering. The accuracy test, presented below, confirm the no occurrence of interference for the studied samples.

Precision and Accuracy studies: In order to check the accuracy of the proposed method samples of *Saccharomyces cerevisiae* were prepared and the results obtained with the FIA method were compared with the Neubauer Chamber results. According to results there was no significant difference at 95% of confidence level (paired t-test). In the determination through FIA system advantageous characteristics were obtained such as high sample throughput (120 h^{-1}), besides the excellent precision (Figure 1a). The limit of detection was 2.53×10^8 cell L^{-1} .

Cells growth studies: The method was also used to monitor cells growth studies and a typical growth curve was obtained (Fig. 1b). During the experience a yeast culture was kept under shaking at 25°C, in lag phase, during four hours. From that point on it exhibits a logarithmic phase up to the fourteenth hour and, from that, a stationary phase plateau of 1.98×10^{10} cells L⁻¹. Growth curves of 3 replicate yeast cultures, inoculated at an initial strain with 1×10^8 cells L⁻¹ from the same starter culture in phase growth, are highly reproducible and have a mean average time to reach half-maximum growth of 13.9 ± 0.21 h. This reproducibility allows precise quantitative measurement of growth parameter¹⁰.

Conclusion: This paper proposes an alternative method of cell counting and presents several advantages on the Neubauer Chamber counting. The turbidimetric determination method is more practical because it requires less time for operator training. The FIA counting method is also faster, since the sample throughput is *ca.* 120 determinations per hour, about 30 times faster than the manual counting. Additionally, the precision evidenced by the confidence interval was notably better. The FIA system proposed was applied efficiently to monitor cell growth studies. Finally, the system is also simpler and presents low cost in comparison to Neubauer Chamber.

References

1. A. Maruyama, M. Sunamura, Simultaneous direct counting of total and specific microbial cells in seawater, using a deep-sea microbe as target, *Appl. Envir. Microbiol.* 66 (2000) 2211-2215.
2. E. B. Kulstad, C. E. Kulstad, E. O. Lovell, A rapid quantitative turbidimetric d-dime assay has high sensitivity for detection of pulmonary embolism in the ED, *Am. J. Emerg. Med.* 22, (2004) 111-114.
3. J. Baudart, A. Olaizola, J. Coallier, V. Gauthier; P. Laurent, Assessment of a new technique combining a viability test, whole-cell hybridization and laser-scanning cytometry for the direct counting of viable Enterobacteriaceae cells in drinking water, *FEMS Microbiol. Lett.* 243 (2005) 405-409.
4. R. I. Jepras, J. Carter, S. C. Pearson, F. E. Paul, M. J. Wilkinson, Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Appl. Envir. Microbiol.* 61 (1995) 2696-2701.
5. A. J. Wigg, J. W. Phillips, L. Wheatland, M. N. Berry, Assessment of cell concentration and viability of isolated hepatocytes using flow cytometry, *Anal. Biochem.* 317 (2003) 19-25.
6. C. H. Collins, P. M. Lyneand, J. M. Grange., *Microbiological Methods*, 6th ed., Butterworth Heinemann, London, 1989.
7. T. A. McMeekin, J. N. Olley, T. Ross, D. A. Ratkowsky, *Optical density methods. Predictive Microbiology*, Wiley, Chichester, UK, 1993.
8. E. J. O. Baron, L. R. Peterson, S. M. Finegold, *Bailey & Scott Diagnostic Microbiology*, 9th ed., Mosby-Year Book, Saint Louis, USA, 1994.

9. F. J. Krug, E. A. G. Zagatto, B. F. Reis, O. Bahia Filho, O. Jacintho, S. S. Jørgensen, Turbidimetric determination of sulphate in plant digests and natural waters by flow injection analysis with alternating streams, *Anal. Chim. Acta.* 145 (1983) 179-187.
10. A. Weiss, J. Delproposto, C. N. Giroux, High-throughput phenotypic profiling of gene-environment interactions by quantitative growth curve analysis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Anal. Biochem.* 327 (2004) 23-34.

Figure 1

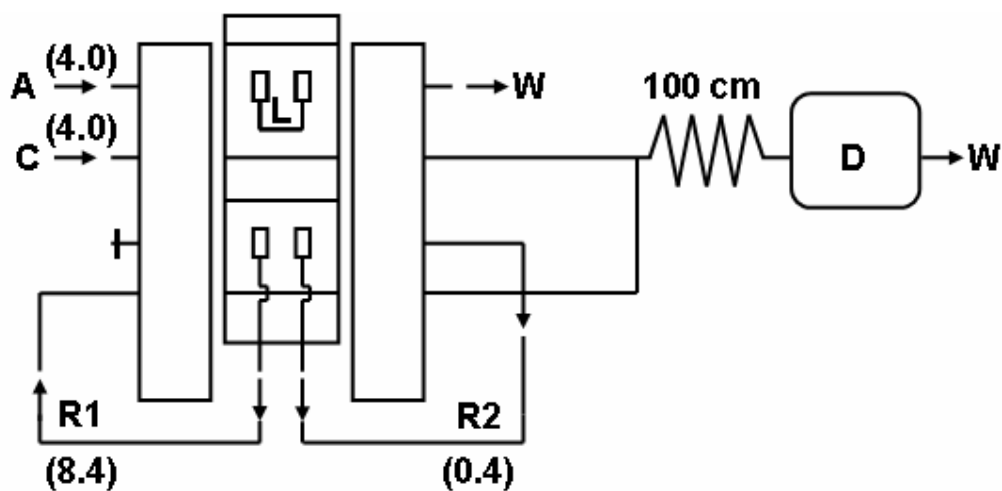


Figure 1: FIA Manifold: A = sample; C = carrier flow (H_2O); R1 = 5.0 % (m/v) $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ in 0.05% (m/v) polyvinyl alcohol (PVA); R2 = 0.3% (m/v) EDTA in 0.07 mol L^{-1} NaOH; D = detector (spectrophotometer , 410 nm); W = waste; L = sample loop (volume = $502 \mu\text{L}$). The values between parentheses are the flow rates (mL/min).

Figure 2

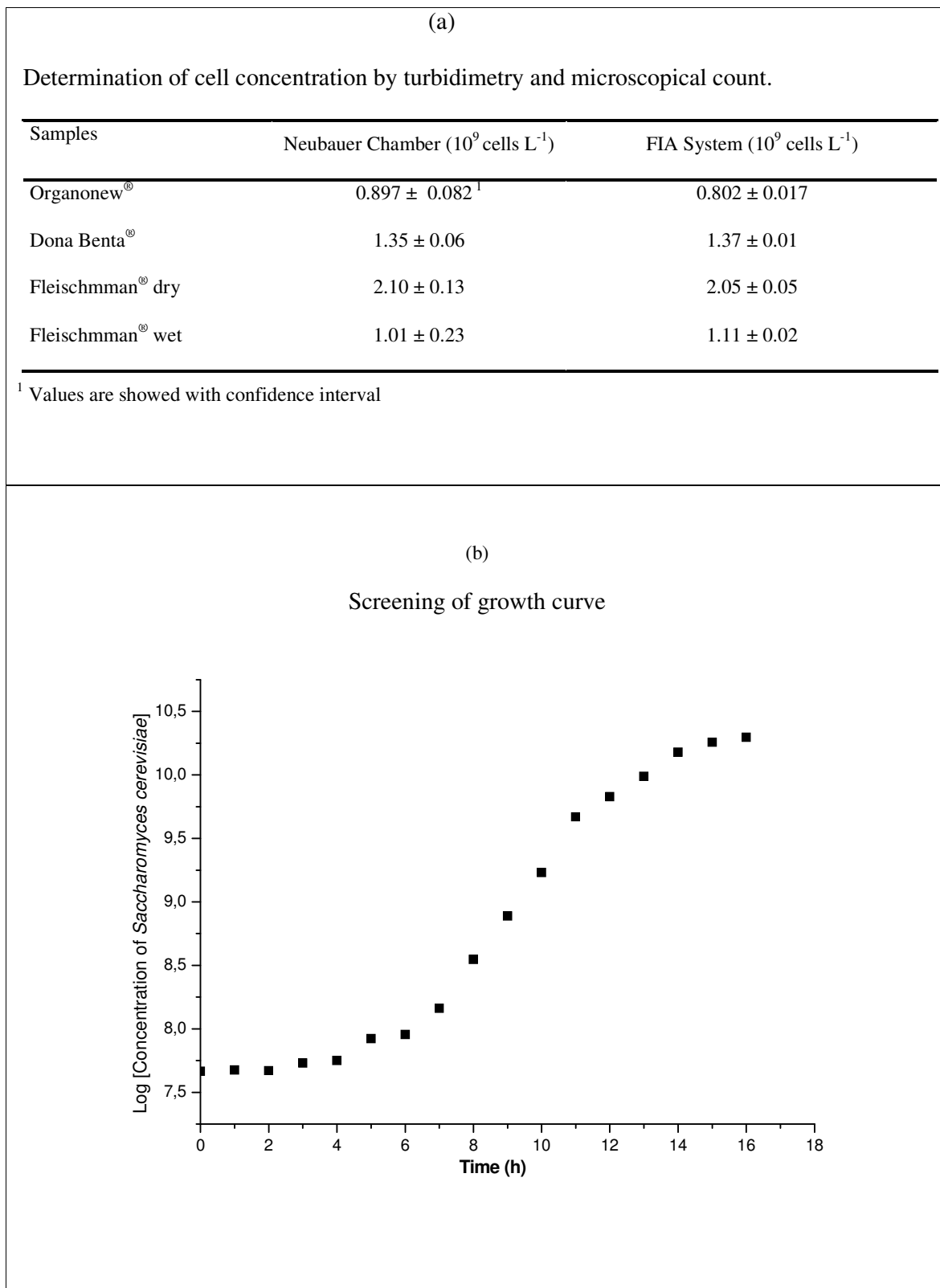


Figure 2: Applications of method (a) market samples (b) Screening of growth curve