

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA E DE
TELECOMUNICAÇÕES

RODRIGO BESERRA DE FREITAS

**DISPOSITIVO ÓTICO PARA A CONTAGEM DE LEVEDURAS VIÁVEIS
BASEADO NA REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO**

Niterói
(março/2018)

RODRIGO BESERRA DE FREITAS

**DISPOSITIVO ÓTICO PARA A CONTAGEM DE LEVEDURAS VIÁVEIS
BASEADO NA REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e de Telecomunicações da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Elétrica e de Telecomunicações.

Área de Concentração: Sistemas de Telecomunicações.

Orientador: Prof. Dr. Vinicius Nunes Henrique Silva

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Sorele Batista Fiaux

Niterói
(março/2018)

Ficha catalográfica automática - SDC/BEE

F862d Freitas, Rodrigo Beserra de
DISPOSITIVO ÓTICO PARA A CONTAGEM DE LEVEDURAS VIÁVEIS
BASEADO NA REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO / Rodrigo Beserra de
Freitas ; Vinicius Nunes Henrique Silva, orientador ; Sorele
Batista Fiaux, coorientadora. Niterói, 2018.
69 f. : il.

Dissertação (mestrado)-Universidade Federal Fluminense,
Niterói, 2018.

1. Sensor Ótico. 2. Azul de Metileno. 3. Saccharomyces
cerevisiae. 4. Produção intelectual. I. Título II.
Silva, Vinicius Nunes Henrique , orientador. III. Fiaux, Sorele
Batista, coorientadora. IV. Universidade Federal Fluminense.
Escola de Engenharia.

CDD -

RODRIGO BESERRA DE FREITAS

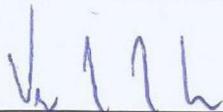
DISPOSITIVO ÓTICO PARA CONTAGEM DE LEVEDURAS VIÁVEIS BASEADO
NA REDUÇÃO DO AZUL DE METILENO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica e de Telecomunicações da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para a Obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Elétrica e de Telecomunicações.

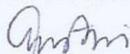
Área de concentração: Sistemas de Telecomunicações

Aprovada em 27/03/2018.

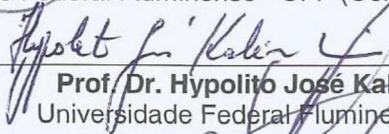
BANCA EXAMINADORA



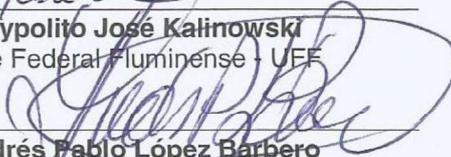
Prof. Dr. Vinicius Nunes Henrique Silva - Orientador
Universidade Federal Fluminense - UFF



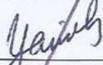
Prof.ª Dra. Sorele Batista Fiaux - Coorientadora
Universidade Federal Fluminense - UFF (Centro de Ciências Médicas)



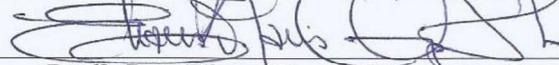
Prof. Dr. Hypolito José Kalinowski
Universidade Federal Fluminense - UFF



Prof. Dr. Andrés Pablo López Barbero
Universidade Federal Fluminense - UFF



Prof.ª Dra. Yanina Madalena de Arruda Calvette
Universidade Federal Fluminense - UFF (Centro de Ciências Médicas)



Prof.ª Dra. Eliana Flavia Camporese Servulo
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, fonte da vida e de toda inspiração, sem o qual nada seria possível. E a Nossa Senhora, mãe intercessora em todos os momentos.

Aos meus pais, Francisco e Graça, e minha irmã Bruna, simplesmente por estar ao meu lado com paciência, palavras de encorajamento e de conforto e por todo apoio no esforço de ver concluída mais esta etapa da minha vida.

À minha esposa Luiza que suportou minhas ausências e me ajudou nos momentos mais difíceis.

Aos meus orientadores, Prof. Vinicius e Professora Sorele, pela dedicação, incentivo e paciência de acompanhar cada passo deste trabalho.

Aos professores da Banca Examinadora Yanina Madalena de Arruda Calvete, Eliana Flavia Camporese Servulo, Hypolito José Kalinowski e Andres Pablo Barbero, por todas as sugestões que serão fundamentais para o engrandecimento deste trabalho.

Aos amigos Vinicius Tremmel, Renan Silva e Gúbio Oliveira que colaboraram no meu desenvolvimento e aprendizagem neste programa de Pós-Graduação.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia Microbiana, em especial aos amigos Ozeias Batista, Danielle Nunes e Manoela Novais que me ensinaram práticas de laboratório na área da Química e da Microbiologia. Além do pessoal do Laboratório de Toxicologia que autorizou o uso do espectrofotômetro durante a pesquisa.

Aos colegas de trabalho do Centro de Tecnologia da Informação da Marinha do Brasil que colaboraram no meu aprendizado e desenvolvimento profissional, em especial aos amigos da divisão de enlaces que me ajudaram e incentivaram durante essa jornada.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desta pesquisa de mestrado.

Obrigado!

RESUMO

A determinação da viabilidade celular é um dos parâmetros mais importantes na condução de fermentações alcoólicas, sendo igualmente importante a utilização de métodos e equipamentos apropriados para isso. A dificuldade de executar esta tarefa por cervejeiros caseiros motivou a pesquisa para obter o equipamento objetivo deste trabalho. Com isto, procedeu-se a construção de um equipamento simples e de baixo custo, que possibilite medir a viabilidade celular de leveduras da linhagem *Saccharomyces cerevisiae* baseado na taxa de redução do azul de metileno. O equipamento foi desenvolvido usando o princípio da absorvância para as medições, sendo composto basicamente de uma fonte de luz, uma cubeta para acondicionar a amostra em estudo, um detector e um dispositivo de controle. O comprimento de onda da fonte de luz escolhido foi 650 nm e a concentração de azul de metileno para a redução foi de 10 mg/L. Os experimentos foram realizados com leveduras crescidas em anaerobiose e aerobiose. A faixa de concentração de células crescidas em anaerobiose medidas no equipamento foi da ordem 10^3 a 10^8 cels/mL e a faixa medida com células crescidas em aerobiose foi de 10^5 a 10^9 cels/mL. Ao final foi possível construir uma curva padrão mostrando a relação linear entre as medições no equipamento e aquelas obtidas pelos métodos de contagem em placas e contagem em câmara de Neubauer com leveduras crescidas em aerobiose.

Palavras-chave: Sensor ótico. Azul de Metileno. *Saccharomyces cerevisiae*.

ABSTRACT

The determination of cell viability is one of the most important parameters in the conduction of alcoholic fermentations, being equally important the use of appropriate methods and equipment for this. The difficulty of performing this task by homemade brewers motivated the research to obtain the objective equipment of this work. With this, a simple and low-cost equipment was developed, which makes it possible to measure the cell viability of yeast *Saccharomyces cerevisiae* lineage based on the reduction rate of methylene blue. The equipment was developed using the principle of absorbance for measurements, consisting basically of a light source, an cuvette to put the sample in study, a detector and a control device. The wavelength of the chosen light source was 650 nm and the concentration of methylene blue for reduction was 10 mg/L. The experiments were made with yeasts growth in anaerobiosis and aerobiosis. The range of the concentration of cells growth in anaerobiosis measured in the equipment was in the order of 10^3 to 10^8 cels/mL and the range measured with cells growth in aerobiosis were 10^5 to 10^9 cels/mL. At the end it was possible to construct a standard curve showing the linear relation between the measurements in the equipment and those obtained by the methods of counting in plates and counting in chamber of Neubauer with yeasts growth in aerobiosis.

Keywords: Optical Sensors. Methylene Blue. *Saccharomyces cerevisiae*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Técnica da diluição seriada. Diluições de dez vezes são conseguidas por transferência de 1 mL da diluição anterior para tubos de ensaio contendo 9 mL de água, tampão ou solução salina estéril.	16
Figura 2: Etapas do procedimento realizado na técnica “ <i>Pour Plate</i> ”	17
Figura 3: Etapas do procedimento realizado na técnica por espalhamento	17
Figura 4: Câmara de Neubauer. Círculos indicam a localização das câmaras de contagem. ...	19
Figura 5: Representação da malha de leitura na Câmara de Neubauer. A leitura de leveduras é realizada no campo central, marcado com círculos.	20
Figura 6: Esquema simplificado do funcionamento de um citômetro de fluxo.	24
Figura 7: Experiência realizada pelo autor para a verificação da redução do azul de metileno em leite fora da validade (redução em 15 minutos).....	25
Figura 8: Ilustração da medição da taxa de redução do azul de metileno. Parte linear do decaimento representando o trecho de interesse para definição da TRAM.	26
Figura 9: Curva de calibração para associação da taxa de redução do AM com outro método	27
Figura 10: Esquema básico de medição da redução do azul de metileno.....	29
Figura 11: Na cinética enquanto o azul de metileno descora, a potência óptica recebida no fotodetector vai aumentando com o tempo.....	30
Figura 12: Relação entre a concentração e a velocidade de descoloramento. Círculos vazios representam células viáveis descoradas; círculos cheios representam células mortas coradas com o AM. Quanto maior a concentração de células viáveis, mais rápido será o descoloramento.	31
Figura 13: Diagrama do equipamento com seus estágios e componentes.....	32
Figura 14: Durante o tempo de redução do azul de metileno pode ocorrer a sedimentação das células para o fundo da cubeta, com a medição simultânea do branco e a redução fica menos provável a ocorrência de erros na medida de absorbância.	33
Figura 15: Curva de caracterização dos lasers utilizados no equipamento.	34
Figura 16: Espectro de emissão de um dos laser utilizados no equipamento, centro em 655 nm	35
Figura 17: Primeira versão do equipamento: (a) Realizando medições com o conversor analógico digital NI-USB-6216. (b) Câmara de medição do protótipo inicial vista de cima com dois conjuntos de medição. Configuração atual do equipamento: (c) Realizando as medições com três réplicas simultaneamente. (d) Vista de cima do equipamento com o estágio de medição com quatro conjuntos laser-cubeta-detector à esquerda, o circuito de ativação do laser na parte direita acima e o circuito controlador (Arduino Due) conectado ao conversor AD (placa azul abaixo) na parte direita inferior.	38
Figura 18: Relação entre a absorbância e a concentração de azul de metileno é exibida em (a) 600 nm e em (b) 650 nm, em ambos os gráficos a partir de 60 mg/L os valores das absorbâncias permaneceram os mesmos e não foram representados nos gráficos. (c) Relação entre a absorbância e a concentração de azul de metileno em 700 nm. A partir de 400 mg/L o valor da absorbância permaneceu o mesmo e não foi representado no gráfico. Nos três gráficos são apresentadas as duas réplicas.	41

Figura 19: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 10 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $1,0496 \times 10^6$ cels/mL no espectrofotômetro; (b) $1,0496 \times 10^6$ cels/mL medido no novo equipamento; (c) $0,9968 \times 10^6$ cels/mL no espectrofotômetro; (d) $1,744 \times 10^7$ cels/mL no espectrofotômetro; (e) $1,0088 \times 10^7$ cels/mL no espectrofotômetro ; e (f) $1,0088 \times 10^7$ cels/mL novo equipamento.....	45
Figura 20: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 10 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $5,066 \times 10^7$ cels/mL no espectrofotômetro; (b) $5,066 \times 10^7$ cels/mL no novo equipamento; e (c) $3,77 \times 10^8$ cels/mL no espectrofotômetro. ...	46
Figura 21: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 10 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $1,17 \times 10^2$ cels/mL no espectrofotômetro; (b) $0,9968 \times 10^5$ cels/mL no espectrofotômetro; (c) $1,0224 \times 10^3$ cels/mL no espectrofotômetro; (d) $1,0224 \times 10^3$ cels/mL novo equipamento; (e) $0,9800 \times 10^4$ cels/mL no espectrofotômetro; e (f) $0,9800 \times 10^4$ cels/mL no novo equipamento.....	47
Figura 22: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 15 mg/L para as concentrações celulares de: (a) de $1,0528 \times 10^5$ cels/mL e (b) $3,13 \times 10^9$ cels/mL.....	49
Figura 23: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 15 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $1,049 \times 10^6$ cels/mL no espectrofotômetro; (b) $1,049 \times 10^6$ cels/mL no novo equipamento; (c) $1,0088 \times 10^7$ cels/mL no espectrofotômetro; (d) $1,0088 \times 10^7$ cels/mL no novo equipamento; (e) $5,066 \times 10^7$ cels/mL no espectrofotômetro; e (f) $5,066 \times 10^7$ cels/mL no novo equipamento.....	50
Figura 24: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 20 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $1,049 \times 10^6$ cels/mL no espectrofotômetro; (b) $1,049 \times 10^6$ cels/mL no novo equipamento; e (c) $0,9968 \times 10^6$ cels/mL no espectrofotômetro. .	52
Figura 25: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 20 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $1,0224 \times 10^3$ cels/mL no espectrofotômetro; (b) $1,0224 \times 10^3$ cels/mL no novo equipamento; (c) $0,9800 \times 10^4$ cels/mL no espectrofotômetro; (d) $0,9800 \times 10^4$ cels/mL no novo equipamento; (e) $0,9968 \times 10^5$ cels/mL no espectrofotômetro; (f) $0,9968 \times 10^5$ cels/mL no espectrofotômetro; (g) $1,0528 \times 10^5$ cels/mL no espectrofotômetro; e (h). $1,17 \times 10^2$ cels/mL no espectrofotômetro.....	53
Figura 26: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 20 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $1,74 \times 10^7$ cels/mL no espectrofotômetro; (b) $1,74 \times 10^7$ cels/mL no novo equipamento; (c) $5,066 \times 10^7$ cels/mL no espectrofotômetro; (c) $5,066 \times 10^7$ cels/mL no novo equipamento; e (e) $3,77 \times 10^8$ cels/mL no espectrofotômetro.	55
Figura 27: Exemplos de réplicas reduzidas na concentração de azul de metileno de 30 mg/L para as concentrações celulares de: (a) $1,17 \times 10^2$ cels/mL (b) $0,98 \times 10^4$ cels/mL (c) $1,744 \times 10^7$ cels/mL . Todas leituras realizadas no espectrofotômetro.....	57
Figura 28: Exemplos de réplicas reduzidas com as concentrações celulares de: (a) $1,0152 \times 10^7$ cels/mL; (b) $5,126 \times 10^7$ cels/mL; (c) $7,7600 \times 10^8$ cels/mL (parte linear do decaimento até seu descoramento); e (d) $7,7600 \times 10^8$ cels/mL completa.....	61
Figura 29: (a) Medição de réplica da suspensão de concentração celular de $1,188 \times 10^6$ cels/mL aumento da absorção (b) Medição de réplica da suspensão de concentração celular de $1,034 \times 10^8$ cels/mL	62
Figura 30: (a) Correlação entre a TRAM e a contagem na câmara de Neubauer (cels/mL); e (b) Correlação entre a TRAM e a contagem em placas (UFC/mL).	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Comprimentos de onda de absorção e fluorescência de alguns corantes usados na microscopia de fluorescência	22
Tabela 2: Tempos para classificação da qualidade do leite através do teste de redução do azul de metileno	25
Tabela 3: Comparação entre os métodos estudados, com os valores dos equipamentos e o tempo para os resultados.....	28
Tabela 4: Custo de cada componente que forma o dispositivo.	38
Tabela 5: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 10 mg/L no espectrofotômetro.	48
Tabela 6: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 10 mg/L no novo equipamento.	49
Tabela 7: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 15 mg/L no espectrofotômetro.	51
Tabela 8: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 15 mg/L no novo equipamento.	52
Tabela 9: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 20 mg/L no espectrofotômetro.	56
Tabela 10: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 20 mg/L no novo equipamento.	56
Tabela 11: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 30 mg/L no espectrofotômetro.	58
Tabela 12: Valores de todas as medições com a concentração de AM de 30 mg/L no novo equipamento.	58
Tabela 13: todos os valores medidos no experimento com leveduras crescidas em aerobiose	62

LISTA DE SIGLAS

AB	Absorbância do branco
ABS	Absorbância
AC	Antes de Cristo
AM	Azul de Metileno
ASBC	American Society of Brewing Chemists
CC	Concentração de células
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
IDA	Índice de diluição da amostra original
IN	Instrução Normativa
LTM	Laboratório de Tecnologia Microbiana
MCD	Método de Contagem Direta
MCP	Método de Contagem em Placas
NCA	Número de células da amostra original
NCC	Número de campos contados
NCCN	Número de campos da câmara de Neubauer
NCP	Número de células contadas na placa
PBS	Tampão fosfato salino
RAM	Redução do azul de metileno
TC	Total de células
TFTC	Too few to count
TNTC	Too numerous to count
TRAM	Taxa de Redução de Azul de Metileno
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
VCL	Volume do campo de leitura

SUMÁRIO

1	Introdução	12
1.1	Motivação	14
1.2	Objetivos	14
1.3	Organização	14
2	Métodos de Medição de Viabilidade Celular	15
2.1	Método da Contagem em Placas (MCP).....	15
2.2	Método da Contagem Direta.....	18
2.3	Citometria de Fluxo	22
2.4	Taxa de Redução do Azul de Metileno (TRAM).....	24
2.5	Considerações sobre os métodos de medida de viabilidade celular	27
3	Equipamento para Medição da Redução do Azul de Metileno	29
3.1	Princípios básicos do equipamento.....	29
3.2	Funcionamento do equipamento	32
3.2.1	Estágio de medição.....	33
3.2.2	Estágio de supervisão	35
3.3	Alterações no equipamento ao longo da pesquisa	37
4	Validação Experimental	40
4.1	Experimentos Iniciais	40
4.2	Experimentos com leveduras crescidas em Anaerobiose	42
4.2.1	Metodologia	42
4.2.2	Medições das TRAM	44
4.3	Experimentos com leveduras crescidas em Aerobiose	59
4.3.1	Metodologia	60
4.3.2	Medições da TRAM	61
5	Conclusões e Sugestões.....	64
	REFERÊNCIAS	65