

Astride Euridice Correia Rodrigues

Desenvolvimento de um Método Voltamétrico
para a Avaliação do Crescimento Microbiano

Universidade do Minho
Braga, 2002

Astride Euridice Correia Rodrigues

Desenvolvimento de um método voltamétrico
para a avaliação do crescimento microbiano

*Dissertação apresentada para a
obtenção do grau de Mestre em
Ciências pela Universidade do Minho*

Universidade do Minho
Braga, 2002

Índice

<i>Agradecimentos</i>	v
<i>Sumário</i>	vii
<i>Abstract</i>	ix
<i>Objectivo</i>	xi
<i>Símbolos e abreviaturas</i>	xiii

Capítulo I – Introdução

1. Considerações gerais sobre electroquímica	3
1.1. Características dos microelétrodos	4
1.1.1. Transporte de massa	5
1.1.2. Queda óhmica	6
1.1.3. Corrente capacitiva	8
1.2. Técnicas electroquímicas	9
1.2.1. Voltametria de varrimento linear em estado estacionário	9
1.2.2. Voltametria de onda quadrada	13
1.2.3. Aplicações das técnicas voltamétricas com microelétrodos	16
1.3. Redução electroquímica de ácidos fracos	18
2. Considerações gerais sobre microrganismos	21
2.1. Fundamentos do crescimento microbiano: cinética do crescimento em sistema fechado	26
2.2. Técnicas para a avaliação do crescimento microbiano	29

Capítulo II – Parte Experimental

1. Instrumentação	33
2. Estudos electroquímicos	35
2.1. Material de vidro: descrição e limpeza	35
2.1.1. Células	35

2.1.2. Limpeza do material de vidro	36
2.2. Eléctrodos	36
2.2.1. Eléctrodos de referência	36
a) Eléctrodo de calomelanos saturado	37
b) Eléctrodo de prata-cloreto de prata	38
2.2.2. Microeléctrodos	39
a) Construção	39
b) Calibração	41
c) Limpeza	41
2.3. Procedimento experimental	42
2.3.1. Voltametria de varrimento linear em estado estacionário	42
2.3.2. Voltametria de onda quadrada	43
2.4. Estimativa das incertezas experimentais	43
3. Estudos microbiológicos	47
3.1. Microrganismos	47
3.2. Meios de cultura	47
3.2.1. Meio de manutenção	47
3.2.2. Meio de crescimento	47
3.3. Condições de crescimento	49
3.4. Avaliação do crescimento por turbidimetria	50
3.5. Análise electroquímica de culturas de células	50
3.6. Estudo de suspensões de células	50
4. Estudos cromatográficos	53
4.1. Instrumentação	53
4.2. Preparação da fase móvel	53
4.3. Preparação das amostras	54
4.4. Condições experimentais	54
4.5. Método analítico	54

Capítulo III – Apresentação e Discussão dos Resultados	
1. Respostas voltamétricas em diferentes meios de cultura e em suspensões de células	59
1.1. Caracterização dos meios de cultura	59
1.2. Linearidade e limite de quantificação dos métodos	64
1.2.1. Meio K	64
1.2.2. Meio contendo 0,5 % de etanol	71
1.2.3. Meio contendo 0,5 % de ácido láctico	73
1.3. Análise comparativa dos resultados	77
1.3.1. Efeito da dimensão do microeléctrodo	77
1.3.2. Voltametria de varrimento linear <i>versus</i> voltametria de onda quadrada	81
1.3.3. Métodos voltamétricos <i>versus</i> método turbidimétrico	84
2. Análise voltamétrica da cultura de células ao longo do tempo	89
2.1. Meio K	89
2.2. Meio contendo 0,5% de etanol	103
2.3. Meio contendo 0,5% de ácido láctico	110
3. Análise Cromatográfica	117
3.1. Análise de nutrientes e possíveis metabolitos celulares por HPLC	117
3.2. Determinação de nutrientes e metabolitos celulares nas culturas de leveduras	119
3.2.1. Meio K	119
3.2.2. Meio contendo 0,5 % de etanol	125
3.2.3. Meio contendo 0,5% de ácido láctico	128
Capítulo IV – Conclusão	135
Capítulo V – Bibliografia	139

Agradecimentos

O trabalho experimental desenvolvido e do qual resultou esta tese foi realizado nos Departamentos de Química e de Biologia da Universidade do Minho. Ao finalizar este trabalho são muitas as pessoas a quem quero agradecer por, directa ou indirectamente, me terem apoiado nesta tarefa.

Às Doutoras Dulce Geraldo e Fátima Bento que sempre me acompanharam, desejo expressar a minha gratidão pelo empenho com que sempre estiveram envolvidas neste trabalho, orientando-me e dando-me sugestões que em muito contribuíram para o meu enriquecimento. Agradeço ainda o carinho, apoio e incentivo que sempre me deram. Muito obrigado por tudo “Professoras”.

À Doutora Fernanda Cássio do Departamento de Biologia agradeço a orientação, o interesse, o empenho e o carinho sempre demonstrados no decorrer de todo o trabalho.

A todos os elementos do grupo da Doutora Fernanda agradeço a ajuda indispensável na parte experimental que envolvia o manuseamento dos microorganismos, uma área nova para mim.

À Fátima agradeço todo o apoio e as palavras amigas que me incentivaram em momentos mais difíceis.

Às meninas do laboratório agradeço a paciência que tiveram para me ouvir em momentos menos bons, o carinho e a boa disposição sempre demonstrados. Quero ainda agradecer de uma forma especial à Carla Rodrigues que me acompanhou em muitas madrugadas no laboratório, a sua disponibilidade, o carinho e o apoio que sempre me deu.

A todos os meus colegas do Mestrado, e de uma forma muito especial à Romi, Anabela e Carla Canhoto agradeço o auxílio e a amizade.

Aos Docentes e funcionários do Departamento de Química quero agradecer o apoio sempre prestados.

A toda a minha família e de uma forma especial à minha avó agradeço todo o apoio que me deram.

A ti Ismael, obrigada pela paciência e compreensão que tiveste, principalmente na fase final deste trabalho.

A vocês, meus pais, que sempre confiaram em mim e estiveram sempre presentes obrigado por tudo.

Sumário

O crescimento microbiano ocorre com o consumo das fontes de energia presentes no meio e a libertação de metabolitos para o meio extracelular. A variação da concentração destas espécies serviu de base para o desenvolvimento de um método electroquímico de avaliação do crescimento de leveduras.

As espécies utilizadas neste estudo foram a *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meios contendo diferentes fontes de carbono e energia: glucose, etanol e ácido láctico.

Os voltamogramas registados nos diferentes meios de cultura apresentaram sinais bem definidos cujas intensidades de corrente variaram ao longo do tempo. Os resultados obtidos por voltametria de varrimento linear (LSV) e voltametria de onda quadrada (SWV), foram semelhantes. Os valores de intensidade de corrente – corrente de pico (para SWV) e corrente limite (para LSV) – nas culturas de células foram comparáveis aos correspondentes valores de densidade óptica, em termos da sua variação ao longo do tempo. Estes resultados apresentam uma tendência similar quando são representados como curvas de crescimento. Com base no método proposto foi possível estimar taxas de crescimento comparáveis às obtidas por turbidimetria.

O método proposto foi caracterizado tendo em vista o estabelecimento do intervalo de aplicabilidade, e os efeitos da variação da dimensão do microeléctrodo e da técnica voltamétrica.

A análise por cromatografia de HPLC das soluções sobrenadantes permitiu o estabelecimento de correlações entre as concentrações de nutrientes e a intensidade de corrente medida ao longo do tempo.

Abstract

Microbial growth is accomplished by the consumption of nutrients and by the release of metabolites into the extracellular media. Based on changes in the concentration of electroactive species, an electrochemical method is proposed to evaluate microbial growth.

The yeasts *Candida utilis* and *Saccharomyces cerevisiae* grown in liquid media containing either glucose, ethanol or lactic acid as carbon and energy sources were used.

The voltammograms obtained in the different growth media displayed well-developed responses which current intensity varies along time. Similar results were reached with either linear sweep voltammetry (LSV) or square wave voltammetry (SWV). The current intensity values – peak current (for SWV) and limiting current (for LSV) – in the growing cultures were comparable to the corresponding optical densities, in terms of their variation along time. These data displayed similar trends when plotted as growing curves. For both yeast species, the growth rates estimated with the electrochemical method were similar to those obtained by the optical method.

The proposed method was characterized by evaluating the applicability range and the effects of the microelectrode dimension and the voltammetric technique.

During the growth of the yeasts, samples of the spent growth media were analysed by HPLC and the nutrient/ metabolite concentrations were related to the intensity currents.

Objectivo

A turbidimetria figura entre os métodos mais amplamente utilizados para a avaliação do crescimento microbiano em meio líquido. No entanto, a utilização deste método está restrita a populações de células que se desenvolvem formando suspensões homogéneas. No caso de espécies microbianas que formam filamentos ou agregados celulares, tal como os fungos filamentosos, é necessário desenvolver métodos igualmente expeditos que permitam avaliar o crescimento das populações.

A utilização de métodos electroquímicos recorrendo a microelctrodos permite detectar e quantificar espécies electroactivas num vasto conjunto de condições experimentais, nomeadamente em meios complexos como os normalmente utilizados para o cultivo de microrganismos.

Durante o crescimento microbiano ocorre o consumo dos nutrientes presentes no meio e a excreção de compostos resultantes do metabolismo dos microrganismos. Se a concentração dessas espécies ao longo do crescimento microbiano se relacionar com a biomassa celular presente, a quantificação dessas espécies poderá servir de base ao desenvolvimento de um método alternativo que possibilite a avaliação do crescimento microbiano, independentemente do grau de homogeneidade da cultura.

Pretende-se com este método que as análises nas culturas sejam rápidas, de simples manipulação e isentas de qualquer tipo de tratamento prévio das amostras.

A validação deste método será efectuada com base em estudos de crescimento de leveduras que metabolizam a fonte de carbono e energia através de mecanismos diferentes – respiração e fermentação – em meios contendo, como fonte de carbono e energia, espécies de natureza química diferente – glucose, etanol e ácido láctico.

Símbolos e Abreviaturas

Símbolos Romanos

Símbolo	Significado / Unidade usual
A	área ou absorvância
a	ordenada na origem da recta de calibração
A _a	área do pico relativa à arabinose
A _N	absorvância normalizada
A _P	área do pico relativa à solução padrão
b	declive da recta de calibração
C _d	capacidade da dupla camada
C _{HA}	concentração analítica do ácido molecular (M)
C _P	concentração analítica da solução padrão (M)
C _{pi}	concentração da solução de padrão interno (M)
C _O	concentração inicial da espécie O (M)
C' _O	concentração da espécie O no seio da solução (M)
D	coeficiente de difusão (cm ² s ⁻¹)
D _{H⁺}	coeficiente de difusão do ião hidrogénio (cm ² s ⁻¹)
D _{HA}	coeficiente de difusão do ácido molecular (cm ² s ⁻¹)
D _O	coeficiente de difusão da espécie O (cm ² s ⁻¹)
D _R	coeficiente de difusão da espécie R (cm ² s ⁻¹)
E	potencial aplicado (V)
E _f	potencial final (V)
E _i	potencial inicial (V)

E^0	potencial padrão de redução (V)
$E_{1/4}$	potencial para qual a intensidade de corrente é $1/4$ da intensidade de corrente máxima (V)
$E_{3/4}$	potencial para qual a intensidade de corrente é $3/4$ da intensidade de corrente máxima (V)
E_{SW}	meia amplitude de patamar em patamar em SWV (mV)
f	frequência (s^{-1})
F	constante de Faraday ($96\,480\text{ C mol}^{-1}$)
f_d	factor de diluição
f_P	factor de resposta da solução padrão
f_{Pi}	factor de resposta da solução de padrão interno
g	factor de convergência
I	intensidade de corrente (A)
I_c	intensidade de corrente capacitiva (A)
I_d	intensidade de corrente directa ou intensidade de corrente de difusão (A)
I_f	intensidade de corrente faradaica (A)
I_i	intensidade de corrente inversa (A)
I_L	intensidade de corrente limite (A)
I_{LN}	intensidade de corrente limite normalizada ($A\text{ m}^{-1}$)
I_p	intensidade de corrente de pico (A)
I_{pN}	intensidade de corrente de pico normalizada
ΔI	intensidade de corrente diferencial ou variação da intensidade de corrente relativamente ao valor de referência (A)
ΔI_p	variação da intensidade de corrente de pico (A)

ΔI_N	variação da intensidade de corrente relativamente ao valor de referência normalizada
ΔE_S	incremento em potencial em técnicas de impulso (V)
k	coeficiente turbidimétrico ($\text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$)
k_C	taxa específica do crescimento (h^{-1})
k_d	constante de velocidade heterogénea da reacção directa (cm s^{-1})
k_i	constante de velocidade heterogénea da reacção inversa (cm s^{-1})
l	percurso óptico (cm)
m	número de réplicas do sinal medido numa amostra
n	número de réplicas ou número de pontos experimentais nas rectas
O	espécie oxidada
O^S	espécie O junto à superfície do eléctrodo
O'	espécie O no seio da solução
q	carga da dupla camada
r	distância medida desde o centro de uma esfera ou coeficiente de correlação linear
R	resistência da solução ou espécie reduzida
r_a	distância entre um eléctrodo de trabalho de disco e um eléctrodo de referência
r_d	raio do microdisco
r_e	raio do eléctrodo esférico ou hemisférico
R^S	concentração da espécie R junto à superfície do eléctrodo
R'	concentração da espécie R no seio da solução
s	desvio padrão

s_a	desvio padrão da ordenada na origem da recta de regressão linear
s_b	desvio padrão do declive da recta de regressão linear
$s_{y/x}$	desvio padrão dos pontos experimentais y à recta de regressão
S_{x_0}	desvio padrão relativo às concentrações determinadas por interpolação numa recta de calibração
S	turbidância
t	tempo (s) ou parâmetro t na distribuição de student
T	transmitância
t_D	tempo de duplicação da densidade populacional (h)
t_m	instante em que se efectua a medição (s)
t_p	largura de cada impulso (s)
t_r	tempo de retenção (min.)
v	velocidade de varrimento
X	densidade populacional
X_t	densidade populacional no tempo t
X_0	densidade populacional no tempo zero
x_i	valor da réplica i
\bar{x}	média aritmética

Símbolos Gregos

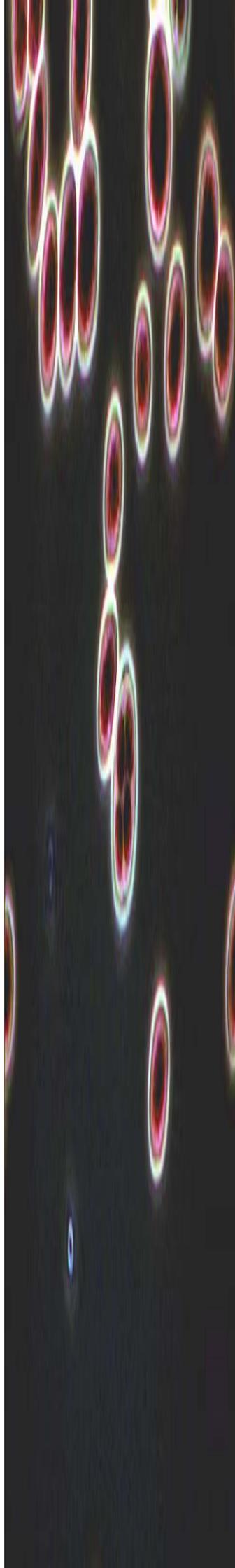
Símbolo	Significado / Unidade usual
ϕ	parâmetro adimensional dado por D_O/r_e^2
ψ	parâmetro adimensional constante na equação 1.18
Λ	parâmetro adimensional constante na equação 1.20
κ	condutividade da solução ($S\text{ cm}^{-1}$)
τ	período de onda (s^{-1})

Abreviaturas

Símbolo	Significado
ECS	eléctrodo de calomelanos saturado
l.d.d	limite de detecção
l.d.l	limite de linearidade
l.d.q	limite de quantificação
LSV	voltametria de varrimento linear
SWV	voltametria de onda quadrada

Capítulo I

Introdução



1. Considerações gerais sobre electroquímica

A Química é uma ciência central estabelecendo interfaces com a Biologia, a Física, a Geologia, a Matemática entre outras. Destas interfaces desenvolveram-se áreas de conhecimento de grande importância tais como a Bioquímica, a Química-Física, a Química Inorgânica, a Química Teórica e a Química Analítica. O presente trabalho insere-se na área de Química Analítica, mais precisamente na aplicação da electroanálise em sistemas biológicos.

A electroquímica estuda fenómenos associados a processos de separação de cargas que conduzem, na maior parte dos casos, à transferência de carga que podem ocorrer numa única fase (transferência homogénea) e entre diferentes fases (transferência heterogénea).

As técnicas electroquímicas podem classificar-se em dois grupos. No primeiro, a intensidade de corrente é nula e corresponde às técnicas potenciométricas. No segundo, a intensidade de corrente pode variar durante a experiência, ou mesmo ser constante, como por exemplo, a amperometria e a coulometria. No trabalho experimental realizado foram utilizadas técnicas amperométricas, nomeadamente, a voltametria de varrimento linear e a voltametria de onda quadrada.

Nas técnicas voltamétricas é registada a intensidade de corrente em função do potencial aplicado, obtendo-se voltamogramas a partir dos quais é possível identificar as espécies electroactivas e determinar as suas concentrações. O potencial é aplicado a um eléctrodo de trabalho de dimensões reduzidas e a intensidade de corrente registada é normalmente baixa, na ordem dos μA . As duas técnicas voltamétricas utilizadas serão referidas nas secções 1.2.1 e 1.2.2.

A utilização de eléctrodos com reduzidas dimensões designados na literatura por microeléctrodos ou ultramicroeléctrodos, confere às técnicas electroquímicas diversas vantagens, tais como elevada sensibilidade e baixos limites de detecção.

1.1. Características dos microeléctrodos

A denominação de microeléctrodos está associada à sua pequena dimensão, sendo no entanto difícil estabelecer limites numéricos, na prática estes deverão apresentar uma dimensão que varie entre 0,1 a 50 μm .

Os microeléctrodos apresentam uma resposta voltamétrica estacionária quando sujeitos a perturbações eléctricas suficientemente longas, isto é, respostas que são independentes do tempo. Este estado estacionário que teoricamente nunca é atingido, na prática pode ser obtido com microeléctrodos. Em estado estacionário as concentrações na vizinhança do eléctrodo não variam com o tempo, devido ao transporte de massa ser muito efectivo [1].

Quando se utilizam microeléctrodos em soluções contendo uma concentração elevada de electrólito suporte, o transporte das espécies electroactivas para a sua superfície é assegurado pela difusão convergente e a intensidade de corrente é directamente proporcional à menor dimensão do eléctrodo. A camada de difusão de estado estacionário é semelhante em termos de grandeza física às dimensões do microeléctrodo que por sua vez deverá ser inferior à espessura da camada estagnante, para que as concentrações não sejam significativamente afectadas pela convecção natural [2].

Os microeléctrodos podem apresentar geometrias diferentes tais como esférica, hemisférica, de disco, de anel e de fio (figura 1.1), e por conseguinte obter-se geometrias de difusão diferente [3].

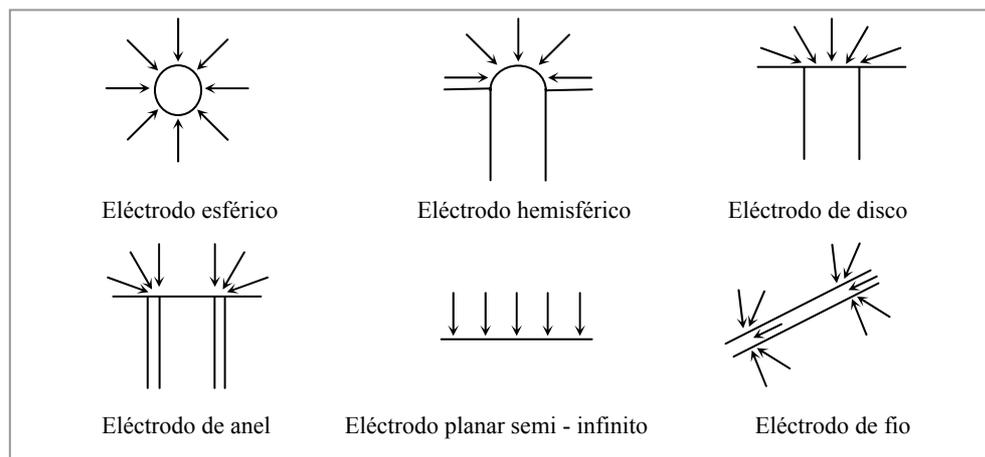


Figura 1.1 – Representação esquemática de microelétrodos com geometrias mais usuais e respectivos fluxos difusionais

As características anteriormente enumeradas que valorizam a utilização dos microelétrodos em Química Analítica, são consequências das suas propriedades intrínsecas de transporte de massa, queda óhmica e intensidade de corrente capacitiva, que são apresentadas em seguida.

1.1.1. Transporte de massa

Numa voltametria, processo durante o qual ocorre uma electrólise, verifica-se um gradiente de concentração junto ao eléctrodo, provocado pelo consumo de espécies electroactivas. Ainda que exista uma agitação mecânica muito forte na solução, junto ao eléctrodo existe sempre uma camada em que a solução não é homogênea. A difusão ocorre como resultado do gradiente de concentração tendendo a eliminá-lo.

A difusão é o processo de transporte de massa mais importante, podendo no entanto ocorrer associado a este, outros tais como a convecção e a migração.

A convecção pode ocorrer naturalmente devido à temperatura na solução, à ocorrência de vibrações e a gradientes de densidade associados à redução electroquímica. Este processo está associado ao movimento de volumes reduzidos de solução, que transportam os iões ou as moléculas das espécies activas, assim como dos electrólitos. Os fluxos devidos à convecção predominam no seio da solução e tendem para zero à superfície do eléctrodo.

A migração é o movimento de partículas carregadas, devido à existência de um campo eléctrico. Pode-se minimizar a migração das espécies electroactivas através da adição de um excesso de electrólito que assegura a electroneutralidade junto do eléctrodo onde ocorre a reacção de redução ou oxidação.

Numa experiência de cronoamperometria em condições de controlo por difusão, isto é, quando a concentração das espécies que sofrem electrólises é nula à superfície do microeléctrodo, a intensidade de corrente pode ser calculada com base na segunda lei de Fick nas coordenadas mais adequadas à geometria do eléctrodo.

Para tempos elevados de perturbação a difusão para a periferia dos microeléctrodos tende a ser mais significativa, estando na origem das elevadas densidades de corrente observadas nos microeléctrodos comparativamente às relativas aos eléctrodos de maiores dimensões.

1.1.2. Queda óhmica

A queda óhmica é um processo que resulta da utilização de uma fracção RI do potencial aplicado por qualquer corrente que flui numa célula, em que I é a intensidade de corrente e R a resistência da célula. Como consequência deste processo as respostas experimentais são normalmente distorcidas, sendo importante usar condições em que o factor RI seja normalmente inferior a 1 mV. Este facto significa que experiências realizadas em intervalos de tempo curtos, em soluções cuja concentração de espécie electroactiva é elevada ou em meios resistivos originam respostas distorcidas não permitindo uma análise correcta dos resultados.

Quando são usados microeléctrodos a queda óhmica é reduzida devido às baixas intensidades de corrente medidas (na ordem dos nanoampères), mesmo em soluções de elevada concentração de espécie electroactiva.

Com microeléctrodos normalmente usa-se uma célula de dois eléctrodos. A distribuição primária de corrente numa célula em que ambos os eléctrodos são de disco é cilíndrica [4], neste caso a resistência da solução contida entre os dois eléctrodos é dada por:

$$R = \frac{1}{4\kappa} \left(\frac{1}{r_e} - \frac{1}{r_a} \right) \quad (1.1)$$

onde κ é a condutividade da solução, r_e é o raio do eléctrodo de trabalho e r_a é a distância que separa os dois eléctrodos. Quando os eléctrodos de trabalho utilizados são microeléctrodos, $r_e \ll r_a$ e a equação 1.1 pode ser simplificada:

$$R = \frac{1}{4\kappa r_e} \quad (1.2)$$

Esta equação mostra que a distância entre o eléctrodo auxiliar e o eléctrodo de trabalho não influencia a resistência da célula, sendo inversamente proporcional ao raio do eléctrodo de trabalho e à condutividade da solução. De forma a diminuir-se a resistência da célula electroquímica utilizam-se normalmente concentrações elevadas de electrólitos em solventes com constante dieléctrica elevada.

Em regime de estado estacionário a intensidade de corrente é proporcional à dimensão do microeléctrodo prevendo-se que RI seja independente do tamanho do eléctrodo. No entanto, diferentes estudos mostram que o efeito da queda óhmica em soluções de baixa concentração de electrólito suporte é menor quando se utilizam microeléctrodos de menores dimensões [5]. Quando a intensidade de corrente é proporcional à área do eléctrodo, em regime de difusão planar, a queda óhmica depende do raio do microeléctrodo.

$$RI \propto \frac{1}{r_e} r_e^2 \propto r_e \quad (1.3)$$

A equação 1.3 mostra que a queda óhmica afecta tanto mais as respostas voltamétricas quanto maior é a dimensão do microeléctrodo. Assim, os microeléctrodos são uma ferramenta de trabalho em electroquímica que permite a simplificação da instrumentação. Neste caso, não há necessidade de controlo do potencial através de um potenciostato, numa célula electroquímica de três eléctrodos, como acontece quando se utilizam eléctrodos de tamanho convencional [6]. O potencial pode ser aplicado

directamente através de um gerador de ondas, sendo a função do eléctrodo secundário desempenhada pelo de referência.

1.1.3. Corrente capacitiva

Nos processos electroquímicos, a intensidade de corrente total deve-se não só a fenómenos faradaicos mas também a capacitivos. Estes últimos são originados pela transferência de carga associada à formação da dupla camada eléctrica. [7].

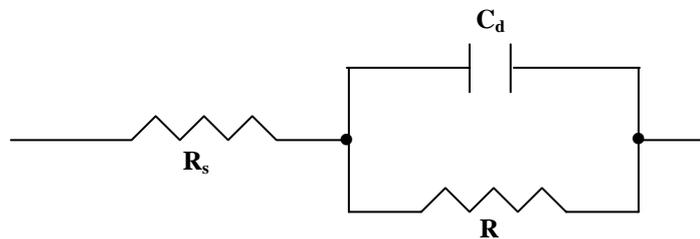


Figura 1.2 – Circuito equivalente numa interface simples. C_d , R e R_s representam a capacidade da dupla camada, a resistência faradaica e a resistência da solução, respectivamente.

O comportamento da interface entre um eléctrodo idealmente polarizável e a solução pode ser traduzido pelo circuito equivalente representado na figura 1.2 [8]. A capacidade de dupla camada eléctrica, C_d depende da carga eléctrica acumulada, q , e do potencial aplicado:

$$C_d = \frac{q}{E} \quad (1.4)$$

Considerando uma variação linear de potencial ($E = E_i + vt$) a resposta em corrente deste circuito pode traduzir-se por:

$$I_c = v C_d + \left[\left(\frac{E_i}{R} - v C_d \right) \exp \left(- \frac{t}{RC_d} \right) \right] \quad (1.5)$$

em que I_c é a intensidade de corrente capacitiva, v a velocidade de varrimento do potencial, E_i o potencial inicial e t o tempo da perturbação. Esta intensidade de corrente que é adicionada à corrente faradaica, pode ser considerável em situações de baixa concentração de espécie electroactiva ou em escalas de tempo reduzidas, distorcendo as

respostas obtidas. Geralmente o que se procura obter é uma razão elevada entre a intensidade de corrente faradaica, I_f , e a intensidade de corrente capacitiva, I_c . Em condições de difusão planar prevê-se que a dimensão do eléctrodo não tenha qualquer efeito sobre esta razão. No entanto, em regime de estado estacionário em que a intensidade de corrente de difusão é proporcional ao raio do eléctrodo e a intensidade de corrente capacitiva é proporcional à sua área, esta razão é inversamente proporcional ao raio do microeléctrodo, como se pode verificar pela seguinte expressão:

$$\frac{I_f}{I_c} \propto \frac{r_e}{r_e^2} = \frac{1}{r_e} \quad (1.6)$$

A expressão 1.6 mostra que a interferência da intensidade de corrente capacitiva é menos significativa em microeléctrodos de menores dimensões.

1.2. Técnicas electroquímicas

Nesta secção apresenta-se uma breve descrição das técnicas electroquímicas utilizadas, nomeadamente a voltametria simples de varrimento linear e a voltametria de onda quadrada. Na abordagem efectuada apresenta-se essencialmente as características das respostas obtidas em ambas as técnicas em que a intensidade de corrente é controlada por difusão.

1.2.1. Voltametria de varrimento linear em estado estacionário

A voltametria simples de varrimento linear é uma técnica simplificada da voltametria cíclica de varrimento linear. Nestas técnicas o potencial aplicado ao eléctrodo de trabalho é variado linearmente com o tempo. Na voltametria cíclica a variação de potencial é efectuada nos dois sentidos, enquanto que na voltametria simples unicamente se aplica um dos varrimentos.

Em regime estacionário as respostas voltamétricas são independentes do sentido do varrimento de potencial, pelo que normalmente é efectuada apenas um dos varrimentos.

Os parâmetros experimentais a ter em conta nesta técnica são o potencial inicial, E_i , o final, E_f , e a velocidade de varrimento. O potencial aplicado em cada instante é função da velocidade de varrimento, v , e do tempo, t , [9] como é apresentado na seguinte expressão:

$$E(t) = E_i - vt \quad (1.7)$$

A voltametria de estado estacionário é uma técnica electroquímica que apresenta, uma vantagem, que é a dependência linear com D , permitindo calcular rigorosamente os coeficientes de difusão.

Como resultado do potencial aplicado, à superfície do eléctrodo podem ocorrer processos de natureza variada, que contribuem para a intensidade de corrente medida, tais como a estruturação da dupla camada eléctrica, a adsorção específica e reacções de oxidação/redução. Por outro lado a intensidade de corrente faradaica depende das velocidades relativas dos diferentes processos associados à transferência electrónica, nomeadamente, a difusão das espécies electroactivas e a ocorrência de reacções químicas homogéneas. Na ausência destas, o processo global pode traduzir-se pela equação 1.8 e pelo esquema na figura 1.3.



O' e R' representam as concentrações de O e R no seio da solução, O^S e R^S representam as concentrações de O e R junto da superfície do eléctrodo, k_d e k_i são as constantes de velocidade heterogénea da reacção directa e inversa, D_O e D_R são os coeficientes de difusão das espécies O e R , que são respectivamente as espécies oxidadas e reduzidas.

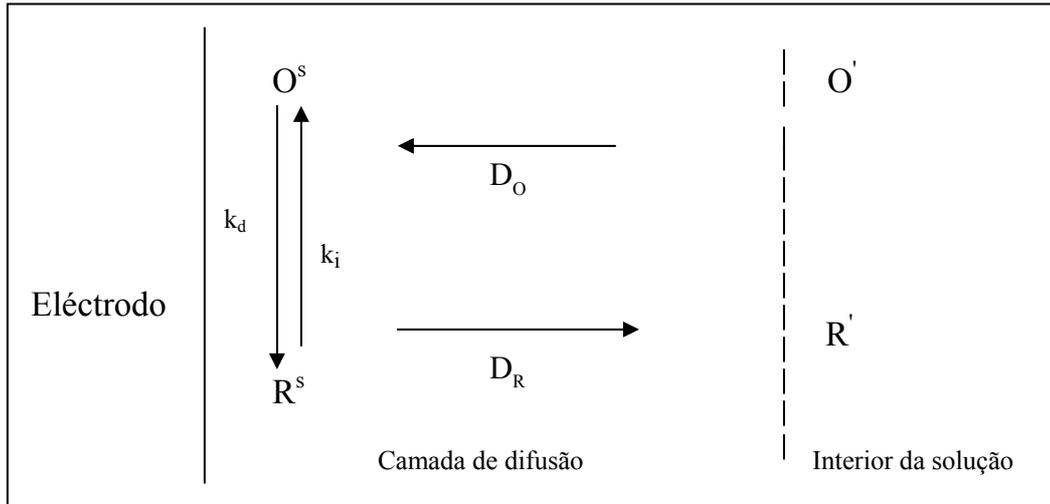


Figura 1.3 – Esquema simplificado de uma reacção de oxidação - redução na superfície de uma eléctrodo na ausência de reacções químicas acopladas

A resposta em corrente de um eléctrodo hemisférico sujeito a uma perturbação de potencial, suficientemente negativo para que a concentração de O seja nula, pode ser obtida a partir da resolução da 2ª lei de Fick em coordenadas esféricas:

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D_O \left[\frac{\partial^2 c}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c}{\partial r} \right] \quad (1.9)$$

onde D_O é o coeficiente de difusão da espécie electroactiva O, r é a distância ao centro da esfera, c é a concentração da espécie electroactiva O, que é uma função da distância ao eléctrodo e do tempo t .

Aplicando a transformada de Laplace à expressão 1.9 e considerando as condições iniciais e de fronteira:

$$t = 0, r = r_e, C_O = C'_O \quad (1.10)$$

$$t = t, r = r_e, C_O = 0 \quad (1.11)$$

em que r_e é o raio do microeléctrodo, C'_O é a concentração da espécie electroactiva no seio da solução, obtêm-se:

$$I = 4\pi r_e n F D_O c_O + \frac{4\pi r_e^2 n F D_O^{1/2} c_O}{(\pi t)^{1/2}} \quad (1.12)$$

onde F é a constante de Faraday.

Esta equação apresenta duas situações limites, dependendo da escala de tempo da experiência caracterizada pelo parâmetro adimensional ϕ ($\phi = D_O t / r_e^2$).

Para valores de ϕ pequenos a equação 1.12 simplifica-se devido à predominância do segundo termo, obtendo-se a equação de Cottrell. A outra situação limite corresponde a valores de ϕ elevados conduzindo à seguinte expressão:

$$I_d = 4n\pi F r_e D_O c_O' \quad (1.13)$$

onde I_d é a intensidade de corrente de difusão e r_e é o raio da hemisfera.

A expressão equivalente para microelctrodos de disco pode ser obtida através da resolução da segunda lei de Fick em coordenadas cilíndricas:

$$I_d = 4nFD_O c_O' r_d \quad (1.14)$$

onde r_d é o raio do microdisco.

A forma dos voltamogramas obtidos por voltametria simples de varrimento linear (LSV) depende da reversibilidade do processo do eléctrodo. Quando o processo é reversível o voltamograma traduz-se por:

$$I = \frac{I_d}{1 + (D_O/D_R) \exp\left[\frac{nF}{RT}(E - E^0)\right]} \quad (1.15)$$

onde E^0 corresponde ao potencial de redução padrão e I_d é a intensidade de corrente de difusão. O potencial de meia onda que corresponde ao valor de potencial medido para $I_d/2$ relaciona-se com o potencial de redução padrão:

$$E_{1/2} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{D_R}{D_O}\right) \quad (1.16)$$

A análise da reversibilidade pode ser efectuada a partir de uma curva I-E, representando um gráfico de E *versus* $\log [(I_d - I)/I]$. Para uma temperatura de 298 K o declive da recta deverá ser igual a $59/n$ mV.

A reversibilidade pode também ser diagnosticada recorrendo ao critério de Thomes, através dos valores de potencial medidos a 1/4 e a 3/4 de I_d . Para um processo reversível tem-se:

$$|E_{1/4} - E_{3/4}| = \frac{RT}{nF} \ln 9 \quad (1.17)$$

este valor é igual a $56,4/n$ mV, para uma temperatura de 298 K.

1.2.2. Voltametria de onda quadrada

Esta técnica caracteriza-se pela aplicação, ao eléctrodo de trabalho, de um perfil de potencial com impulsos. Em cada impulso o potencial varia instantaneamente de um potencial inicial (E_i) para um potencial final (E_f).

A voltametria de onda quadrada desenvolvida por Barker, em 1952, foi pouco usada devido a inúmeras dificuldades electrónicas que foram ultrapassadas graças aos progressos na instrumentação, sendo actualmente muito utilizada em Química Analítica.

É uma técnica de elevada rapidez de resposta que permite obter limites de detecção baixos devido à discriminação da corrente capacitiva. A resposta que se obtém é em forma de pico, facilitando a identificação de espécies electroactivas em solução. A possibilidade de separar as respostas relativas a processos que ocorram em potenciais próximos, faz com que a redução do oxigénio nas amostras não altere as respostas características das espécies analisadas. A sua versatilidade faz com que seja uma técnica muito utilizada quer em estudos analíticos quer em mecanísticos.

O perfil de potencial da voltametria de onda quadrada (SWV), consiste numa onda quadrada simétrica b), cuja meia amplitude de patamar a patamar é representada por E_{sw} , sobreposta a uma onda em escada a), originando o perfil c), como é representado na figura 1.4.

Nos instantes iniciais de cada impulso, a intensidade de corrente capacitiva apresenta um valor elevado, pois a carga da dupla camada é proporcional a $e^{-t/RC}$, em que t é o tempo após a aplicação da perturbação, C_d é a capacidade da dupla camada e R é a resistência da solução. Como a intensidade de corrente capacitiva decresce com o tempo mais rapidamente que a corrente faradaica (que é proporcional a $1/t^{1/2}$) deve-se escolher adequadamente o instante em que se efectua a medição (t_m) e geralmente tem um valor elevado (2-200 ms) de modo a minimizar o efeito da intensidade de corrente capacitiva.

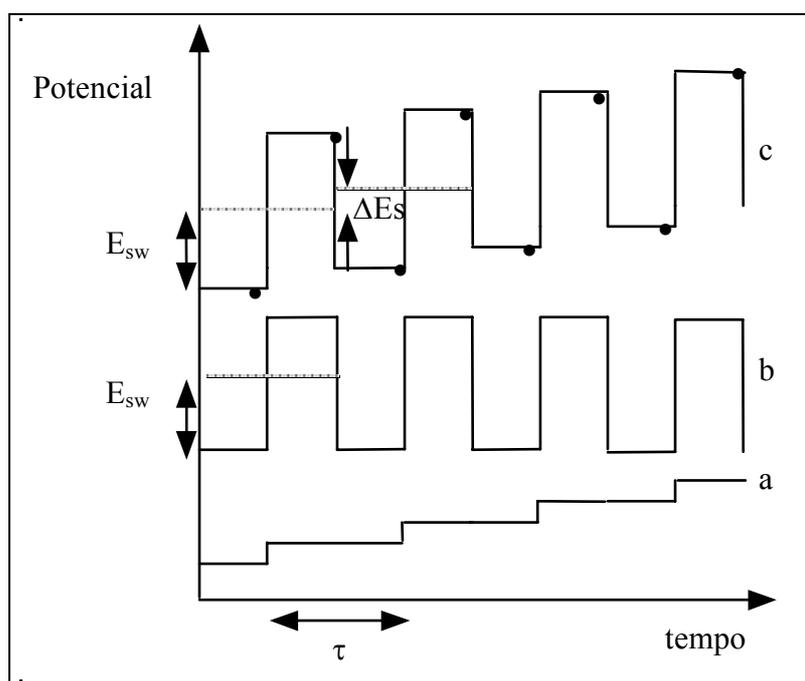


Figura 1.4 – Representação esquemática do perfil do potencial em forma de escada (a), de onda quadrada (b), resultante da soma do perfil de potencial em forma de escada e de uma onda quadrada (c). Os instantes em que se efectua as medições de intensidade de corrente estão assinalados por (•).

Os parâmetros característicos desta técnica são o potencial de meia amplitude de patamar em patamar da onda quadrada (E_{sw}), o período da onda em escada, que é idêntico ao da onda quadrada (τ), o incremento em potencial da onda quadrada ΔE_s , a largura de cada impulso (t_p) que é o tempo característico da cada experiência e a frequência (f).

A intensidade de corrente é medida na parte final de cada meio ciclo correspondente ao intervalo de tempo t_m , obtendo assim, a intensidade de corrente directa

(I_d) e a intensidade de corrente inversa (I_i). A diferença entre estas duas intensidades de corrente fornece o valor da intensidade de corrente diferencial (ΔI). A representação de ΔI em função do potencial de onda em escada origina um voltamograma em forma de pico, como se apresenta na figura 1.5.

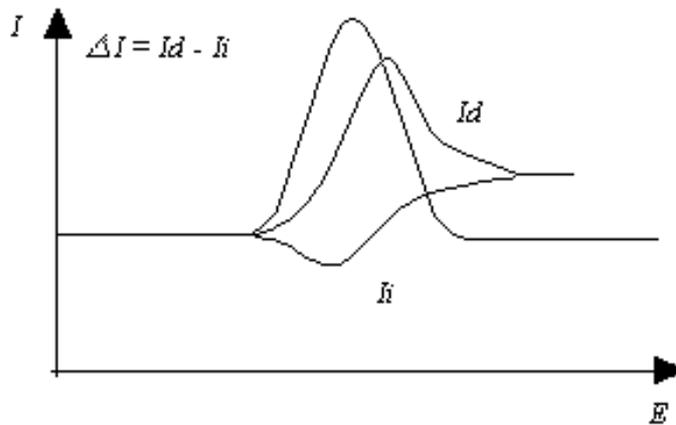


Figura 1.5 – Representação esquemática das intensidades de corrente directa (I_d) e inversa (I_i) e o diferencial resultante (ΔI).

Esta técnica de voltametria apresenta a vantagem da intensidade de corrente diferencial ser pouco afectada pela intensidade de corrente capacitiva.

Geralmente a intensidade de corrente diferencial é comparada teoricamente com uma intensidade de corrente adimensional (ψ).

As intensidades de corrente experimental (I) e adimensional (ψ) são relacionadas com o factor de Cottrell para o tempo característico (t_p) desta técnica:

$$I = \frac{nFAc'_O D_O^{1/2}}{(\pi t_p)^{1/2}} \psi \quad (1.18)$$

A intensidade de corrente adimensional de pico ($\Delta\psi$) para $nE_{SW} = 50$ mV e $n\Delta E_S = 10$ mV é dada pela seguinte expressão:

$$\Delta\psi_p = \frac{0,846}{\Lambda} + 0,750 + 0,177 \exp\left(\frac{-1,13}{\Lambda}\right) \quad (1.19)$$

$$\text{em que } \Lambda = \frac{r}{2Dt_p^{1/2}} \quad (1.20)$$

A intensidade de corrente de pico, ou seja, a corrente diferencial máxima, é traduzida na seguinte equação:

$$\Delta I_p = nFAc'_O \frac{D_O^{1/2}}{\pi t_p} \Delta\psi_p \quad (1.21)$$

Analisando a equação (1.21), observa-se que a intensidade de corrente varia linearmente com a concentração, permitindo que esta técnica seja aplicada para fins analíticos. Outras vantagens da SWV é a sua rapidez, obtendo-se para valores de ΔE_s entre 10 e 30 mV, velocidades de varrimento de (0,3 / n) a (60 / n) V s⁻¹. É de salientar que esta técnica apresenta uma elevada insensibilidade à presença de oxigénio, o que permite que muitas experiências não necessitem de desarejamento prévio, facto muito importante para a realização de estudos *in vivo*.

1.2.3. Aplicações das técnicas voltamétricas com microelétrodos

Na literatura são descritos inúmeras aplicações dos microelétrodos no domínio da Química Analítica, devido às suas características fundamentais.

Na realidade, o aparecimento e caracterização dos microelétrodos resultaram da necessidade de se realizarem estudos *in vivo*, onde era crucial a dimensão ser reduzida. Algumas das aplicações relevantes descritas na literatura, incluem a determinação de metais [10], de compostos biológicos [11-13], de neurotransmissores em fatias de cérebro [14]. As suas reduzidas dimensões permite posiciona-los em posições bem determinadas, pelo que foi possível determinar níquel numa única célula biológica [15], assim como analisar o citoplasma de uma única célula [16]. Foram efectuadas determinações de diversos compostos biológicos e neurotransmissores em cérebros de rato anestesiados, de chumbo em sangue [17], de ácido úrico em urina [18]. A determinação de amino-ácidos

em urina também tem sido realizada por técnicas voltamétricas com eléctrodos de cobre e ouro [19].

O estudo do comportamento de medicamentos anti – HIV foi também efectuado com microeléctrodos de platina [20]

Outros trabalhos referem o comportamento voltamétrico em suspensões de células vivas de *T. shanghaiensis* [21] assim como em suspensões de células vivas de *Saccharomyces cerevisiae* [22].

A insensibilidade dos microeléctrodos ao efeito da queda óhmica permite realizar estudos em que a concentração das espécies electroactivas é elevada [23]. Esta característica inerente aos microeléctrodos simplifica o processo de determinações analíticas, permitindo a realização de experiências sem adição de electrólito suporte que para além de ser uma fonte de impurezas pode reagir com as espécies em estudo [24, 25]. A determinação de metais na ausência de electrólito minimiza os erros associados à contaminação associada à alteração da forma em que as espécies se encontram em solução.

A voltametria de varrimento linear em estado estacionário foi utilizada em sistemas resistivos como por exemplo, a determinação de clorobenzeno em soluções de elevada concentração [26] e em estudos de compostos biológicos [27, 28]. Esta técnica foi também utilizada em amostras de produtos lácteos [29] e em óleos lubrificantes [30, 31]. A utilização de solventes de baixa constante dieléctrica é ainda pouco explorada, existindo no entanto estudos [32] que demonstram a possibilidade de determinar quantidades vestigiais de metais (chumbo, cádmio e zinco) em acetonitrilo, metanol e etilenoglicol. Por voltametria de varrimento linear foi possível quantificar o antraceno em clorobenzeno presente como impureza em fenantreno comercial [26].

O transporte de massa muito elevado e a obtenção de respostas de elevada qualidade em tempos muito reduzidos, são factores que possibilitam obtenção de dados cinéticos de processos muito rápidos [33, 34].

Alguns trabalhos realizados no domínio das aplicações alimentares compreendem a determinação de ácido ascórbico em alimentos tais como batatas, molhos e morangos, sem recorrer a tratamento prévio da amostra [35, 36]. Por voltametria de onda quadrada e com microeléctrodos cilíndricos foram determinadas algumas espécies electroactivas tais

como oxigénio, o ácido ascórbico [37] e alguns anti-oxidantes alimentares em flocos de puré de batata [38].

1.3. Redução electroquímica de ácidos fracos

Em regime estacionário, o transporte de massa verificado com a utilização de microeléctrodos permite a visualização de um sinal electroquímico em soluções de ácidos. A redução electroquímica destes ocorre com a formação de hidrogénio molecular. A sua difusão para o seio da solução impede a formação de bolhas de gás à superfície do eléctrodo, o que impossibilita a obtenção de um sinal electroquímico bem definido em soluções de ácidos fracos e fortes em estado não estacionário.

A reacção de evolução do hidrogénio envolvendo a descarga de iões hidrogénio a partir de soluções de ácidos fortes e fracos, nomeadamente, ácido acético, perclórico, nítrico, foi analisada por voltametria de varrimento linear com microeléctrodos de platina.

O mecanismo proposto na literatura [39] para a redução de ácidos fracos é apresentado em seguida:



Este processo caracteriza-se por uma reacção química em fase homogénea, seguida a reacção de transferência de carga, com o envolvimento de dois electrões. A intensidade de corrente limite depende dos coeficientes de difusão do ácido molecular (D_{HA}) e do ião hidrogénio (D_{H^+}), da concentração do ião hidrogénio em equilíbrio no seio da solução ($[\text{H}^+]^b$) e da concentração analítica do ácido fraco não dissociado (C_{HA}) [40]:

$$I_L = 4n\text{Fr}_d \left[(D_{\text{H}^+} - D_{\text{HA}}) [\text{H}^+]^b + D_{\text{HA}} C_{\text{HA}} \right] \quad (1.24)$$

Podem considerar-se duas situações limite. Quando a concentração de ácido é elevada, a sua ionização é pouco extensa, i.e., $C_{\text{HA}} \gg [\text{H}^+]^b$:

$$I_L = 4n\text{Fr}_d D_{\text{HA}} C_{\text{HA}} \quad (1.25)$$

A outra situação correspondente a soluções muito diluídas em que o ácido está praticamente todo ionizado, podendo considerar-se $[H^+]^b \gg C_{HA}$, assim:

$$I_L = 4nFr_d(D_{H^+} - D_{HA})[H^+]^b \quad (1.26)$$

Quando se considera um intervalo de concentrações de ácido mais ou menos extenso, deve-se considerar não só estas duas situações limite, como também a intermédia em que a intensidade de corrente é controlada por ambos os coeficientes de difusão D_{H^+} e D_{HA} (equação 1.24).

Foram efectuados estudos com microellectrodos em soluções tampão de ácidos mono e polipróticos por voltametria de varrimento linear [39] em que foi comparado o sinal electroquímico obtido numa solução de ácido fraco tamponizada com o obtido na mesma solução sem tampão. Foi verificado que a intensidade de corrente limite obtida é inferior na primeira, o que comprova o mecanismo acima proposto [40]. Neste trabalho foram ainda descritas as diferenças verificadas nos potenciais de meia onda, característicos das espécies electroactivas em análise, nas duas soluções de ácidos fracos.

2. Considerações gerais sobre microrganismos

A microbiologia estuda organismos cujas dimensões são demasiado reduzidas para serem percebidos à “vista desarmada” e que se denominam microrganismos.

A vida neste planeta começou à 4 mil milhões de anos com microrganismos e provavelmente estes serão os últimos sobreviventes. Estes são actualmente a maioria dos seres vivos e têm uma extensa distribuição taxonómica, incluindo alguns animais protozoários, muitas algas e fungos, bactérias e vírus [41].

Como já se referiu o objectivo deste trabalho é o desenvolvimento de um método electroquímico para a avaliação do crescimento microbiano com o intuito de ultrapassar algumas restrições apresentadas pelos métodos clássicos para este fim. Essas restrições manifestam-se principalmente na avaliação do crescimento de fungos filamentosos que, em meio líquido, não formam suspensões homogéneas e por isso o seu crescimento não pode ser avaliado por turbidimetria (método mais usual, descrito na secção 2.2). No entanto neste trabalho os microrganismos estudados foram leveduras, as quais se diferenciam dos fungos por se apresentarem, usual e predominantemente sob a forma unicelular e em meio líquido formarem suspensões homogéneas. As leveduras diferenciam-se das algas pois não efectuam a fotossíntese e dos protozoários porque possuem uma parede celular rígida. São também facilmente diferenciadas das bactérias devido a apresentarem dimensões maiores e propriedades morfológicas diferentes [42].

As leveduras são seres eucarióticos, unicelulares, não móveis, sem clorofila, quimiossintetizantes e capazes de se reproduzirem sexuada e assexuadamente, sendo a forma mais comum de divisão celular por gemulação ou fissão. Na fissão, a célula divide-se simetricamente dando origem a duas células semelhantes, pelo contrário a divisão por gemulação é visivelmente assimétrica. Neste último caso, a célula parental produz um broto que vai crescendo durante o ciclo celular até finalmente separar-se da célula

original. Na reprodução sexuada as leveduras reproduzem-se por esporos endógenos (ascósporos), contidos no interior da célula mãe.

As leveduras não constituem um grupo de microrganismos com significado taxonómico sendo diferenciadas de acordo com as suas características morfológicas e fisiológicas. A morfologia das leveduras é muito variável como se pode ver na figura 1.6.

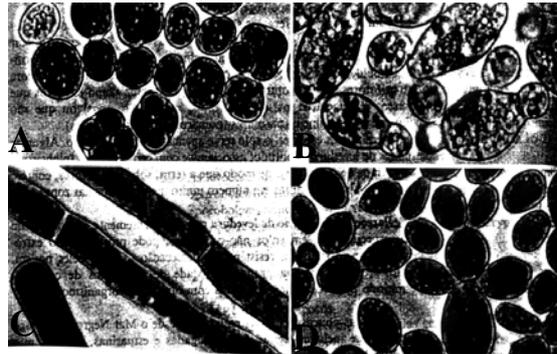


Figura 1.6 – Representação de diferentes morfologias de leveduras: **A** - *Saccharomyces cerevisiae*; **B** - *Saccharomyces ludwigii*, **C** - *Geotrichum candidum*; **D** - *Pichia membranaefaciens*

As leveduras são um grupo de microrganismos bem conhecido pelos seus contributos para a indústria alimentar. A produção de alimentos como o pão, bebidas alcoólicas (vinho, cerveja, champanhe, sidra, etc.) deve-se sem dúvida a algumas espécies de leveduras. No entanto, existem outras espécies de leveduras que podem deteriorar produtos que em escala industrial pode conduzir a grandes perdas económicas [43]. A deterioração de alimentos e bebidas conduzida por microrganismos é essencialmente um processo competitivo que decorre entre leveduras, bactérias e fungos filamentosos. Essa deterioração ocorre com frequência em locais domésticos como por exemplo garrafas de polpa de tomate, molhos, geleias e xaropes abertas e armazenadas há algum tempo podem fermentar ocasionalmente. Em fatias de “bacon”, sumos de fruta empacotados e abertos durante muito tempo desenvolvem-se populações significativas de leveduras à superfície.

No presente trabalho foram utilizadas duas espécies de leveduras a *Candida utilis* e a *Saccharomyces cerevisiae* (figura 1.7).

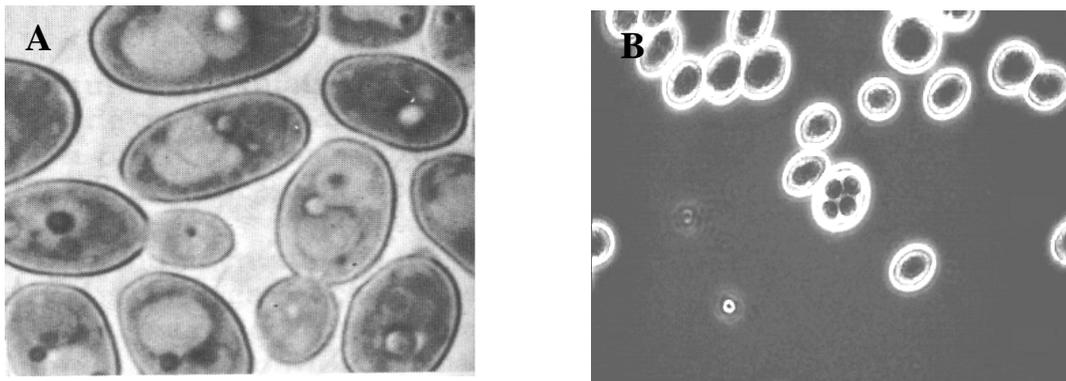


Figura 1.7 – Imagem da levedura *Candida utilis* (A) e *Saccharomyces cerevisiae* (B)

Estudos recentes mostram a importância de algumas espécies de leveduras no meio ambiente e na agricultura. Nomeadamente, Arnold e seus colaboradores investigaram a possibilidade de culturas de diferentes espécies de leveduras crescerem e serem utilizadas para o tratamento de efluentes poluídos por fertilizantes e verificou que a *Candida utilis* e *Galactomyces geotrichum* são eficazes na redução da poluição dos efluentes [44].

Diferentes estirpes da levedura *Candida utilis* são utilizadas para a produção de biomassa, de ácido acético e de acetato de etilo a partir do etanol. Existem alguns estudos que demonstram a maior capacidade de determinadas estirpes de *Candida utilis* na degradação do etanol e conversão em biomassa, ácido acético e acetato de etilo [45].

As indústrias alimentares são responsáveis por 45 % da poluição orgânica total. Um processo que inclui um reactor anaeróbio acidogénico e um reactor de leveduras em série é proposto para o tratamento de elevadas concentrações de efluentes da indústria alimentar. A *Candida utilis* é utilizada em reactores de banhos contínuos com ácido acético, ácido propiónico, ou ácido butírico ou uma mistura dos três com um pH de 3,5 para minimizar a contaminação bacteriológica [46].

Os resultados obtidos em estudos efectuados por Christen e colaboradores sobre a eliminação do etanol mostram a possibilidade deste composto volátil ser eliminado com biofiltração do bagaço inoculado com uma cultura pura de *Candida utilis* [47].

Num trabalho realizado por Olesen e Stahnke verificou-se a influência de culturas de leveduras e *Candida utilis* no aroma de carnes e salsichas. Foi demonstrado que a *Candida utilis* devido à sua actividade metabólica produz uma maior quantidade de

compostos voláteis do que a *Debaryomyces hansenii*, importantes para o aroma das carnes e salsichas [48].

Como se pode verificar a *Candida utilis* é uma levedura de grande interesse económico na indústria alimentar e agrícola, principalmente.

No que respeita à *Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura muito conhecida pelo seu papel na fermentação do pão e de algumas bebidas alcoólicas como a cerveja e os vinhos. Além disso algumas espécies de *Saccharomyces cerevisiae* podem aumentar a produção das enzimas digestivas e até mesmo diminuir efeitos colaterais gastro-intestinais de antibióticos. Pesquisas recentes comprovam um aumento da Imunoglobina A na mucosa intestinal com o uso do fármaco (Bonatropheen) que contém esta levedura. As vitaminas de sua fórmula melhoram notavelmente a aparência e a saúde da pele, cabelos e unhas [49].

Um modelo experimental de *Saccharomyces cerevisiae* foi desenvolvido para a análise molecular do processo de envelhecimento. A manipulação da ingestão nutricional destas leveduras pode aumentar o período de vida, fornecendo um modelo útil para a análise molecular da restrição calórica. Segundo Jazwinski a elucidação de tais mecanismos, permitiria desenvolver intervenções relativamente simples que aliviarão os danos do processo de envelhecimento, melhorando a qualidade de vida das pessoas mais idosas [50].

Foram realizadas algumas investigações dos efeitos da levedura *Saccharomyces cerevisiae* presente na dieta de vacas em lactação. Verificou-se que a inclusão desta levedura na dieta provocava um aumento quer na produção do leite quer de gordura e proteína [51].

Todos os organismos requerem uma fonte de energia e de carbono. Os microrganismos podem ser divididos em dois grandes grupos com base nas suas exigências nutritivas, os fototróficos e os quimiotróficos, os primeiros utilizam energia radiante e os últimos dependem de compostos químicos para a obtenção de energia. Estes dois grupos são subdivididos de acordo com a sua principal fonte de energia utilizada para o crescimento. As duas espécies de leveduras estudadas utilizam um composto orgânico como fonte de carbono para o seu crescimento e a energia é obtida pela oxidação desse composto.

Contudo, no processo respiratório, há diferenças quanto aos compostos que podem ser assimilados pelas diferentes espécies de leveduras. Algumas podem utilizar pentoses (D-xilose, D-ribose), polissacarídeos (amido), alcoóis (matinol, sorbitol, etanol), ácidos orgânicos (ácido láctico, acético, cítrico) e outros substratos orgânicos.

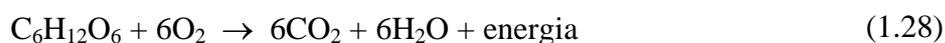
Em seguida descreve-se resumidamente o metabolismo para microrganismos que utilizam a glucose como fonte de carbono e obtêm a energia necessária para o seu crescimento a partir da oxidação deste composto orgânico.

O processo metabólico das leveduras varia para diferentes espécies podendo ocorrer por via aeróbia (respiração) ou anaeróbia (fermentação). O processo mais característico é a fermentação alcoólica que conduz à formação de etanol e presente nas bebidas alcoólicas utilizadas há milhões de anos e o dióxido de carbono responsável pelo aumento de volume da massa do pão.



A fermentação alcoólica é um processo puramente químico que pode ocorrer fora das células vivas e que envolve etapas químicas de degradação da glucose comuns a outros tipos de fermentação. Os produtos finais obtidos noutros tipos de fermentação são os que as diferenciam da fermentação alcoólica [52].

No metabolismo aeróbio, na respiração, a oxidação completa da glucose, pelo oxigénio do ar, fornece dióxido de carbono e água.



Em microrganismos, plantas e animais a via central do catabolismo da glucose é conhecida como via glicolítica (figura 1.8) em que se forma o piruvato. O metabolismo difere de um organismo para outro, dependendo da forma como velocidade daquele é regulada e do destino metabólico do piruvato formado. Nos organismos aeróbios o piruvato é oxidado, com a perda do seu grupo carboxilo na forma de CO_2 , formando o grupo acetilo da acetil coenzima A. Este grupo acetilo é, então, oxidado completamente na mitocôndria a CO_2 e H_2O pelo ciclo do ácido cítrico, com a participação de oxigénio

molecular. Em condições em que há falta de oxigénio o piruvato é convertido em lactato ou etanol, fermentação láctica e alcoólica respectivamente. Em termos energéticos, a via glicolítica fornece duas moléculas de ATP por molécula cada de glucose degradada.

O resultado da oxidação completa da glucose é a produção de 36 moles de ATP por cada mole de glucose.

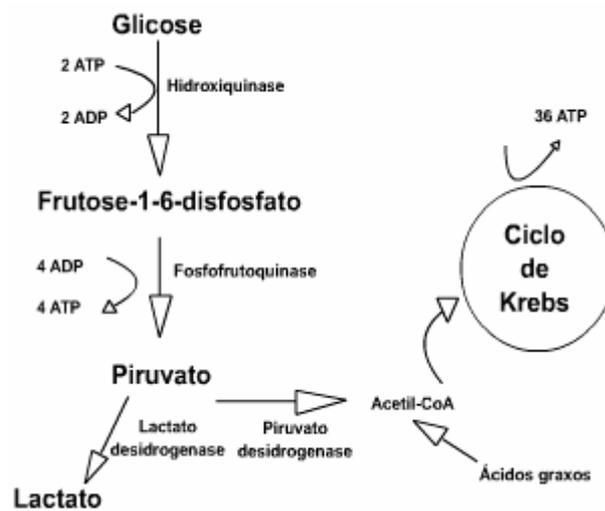


Figura 1.8 – Representação esquemática do catabolismo da glucose

2.1. Fundamentos do crescimento microbiano: cinética do crescimento em sistema fechado

Nos microrganismos, dadas as suas reduzidas dimensões, o crescimento é encarado a nível de populações, e não de indivíduos, como se verifica nos seres pluricelulares [53]. Uma população microbiana a crescer num meio de cultura, ao qual está perfeitamente adaptada, encontra-se no designado "estado de crescimento equilibrado", caracterizado pelo aumento ordenado de todos os seus componentes químicos. Assim, a duplicação da biomassa está associada à duplicação de todas as outras propriedades mensuráveis da população como, por exemplo, das proteínas, dos ácidos nucleicos, etc. Portanto, em condições de "crescimento equilibrado" o aumento da população (dX) num intervalo de tempo infinitamente pequeno (dt) é proporcional à biomassa presente nesse intervalo de tempo, ou seja:

$$\frac{dX}{dt} = k_c X \quad (1.29)$$

onde X representa a densidade populacional, dX/dt a taxa de crescimento da população em cada instante e k_c a taxa específica do crescimento, expressa em unidades do inverso do tempo (t^{-1}).

Integrando a equação 1.29, obtém-se:

$$X_t = X_0 e^{k_c t} \quad (1.30)$$

onde X_t e X_0 são as densidades populacionais, respectivamente, nos tempos t e zero.

Logaritmizando a equação anterior obtém-se a expressão linear:

$$\ln X_t - \ln X_0 = k_c t \quad (1.31)$$

Se se representar graficamente, em papel semilogarítmico, os valores da densidade populacional em função do tempo obtém-se uma relação linear cujo declive permite estimar a taxa específica do crescimento.

A velocidade do crescimento de leveduras depende de factores químicos e físico-químicos, tais como a concentração de nutrientes, a temperatura, o pH, etc. As leveduras crescem numa ampla gama de variação térmica, de 0 a 47° C, algumas não se desenvolvem acima de 15° C, enquanto que outras não se desenvolvem abaixo desta temperatura. A temperatura óptima para a maioria das leveduras é de 20 a 30° C.

Relativamente aos valores de pH, em geral, as leveduras crescem melhor em meios ácidos, entre 3,5 e 3,8, inibindo o desenvolvimento da maior parte das bactérias. No entanto, os limites de tolerância variam num intervalo de 2,2 a 8,0 de acordo com os vários tipos de espécies de leveduras [54].

Quando uma população de células microbianas é colocada em sistema fechado (sistema em que não há livre troca de nutrientes com o meio) num meio de cultura líquido, com composição química e condições físico-químicas favoráveis ao seu

crescimento, nomeadamente, de arejamento, temperatura e pH, o crescimento da população pode ser traduzido graficamente pela designada "curva de crescimento" (figura 1.9) que a seguir se descrever mais pormenorizadamente. Após um período de latência, de duração variável, em que as células se estão a adaptar ao meio, segue-se o início da multiplicação celular. A população entra na chamada fase de aceleração, onde k_C aumenta de zero até ao seu valor máximo ($k_{Cmáx}$), atingindo-se a fase exponencial do crescimento. A duração desta fase depende fundamentalmente da concentração inicial dos nutrientes limitantes para o crescimento. Quando um ou mais nutrientes se tornam limitantes e/ou ocorre a acumulação no meio de metabolitos inibidores do crescimento, segue-se a fase de desaceleração em que k_C diminui do seu valor máximo até zero. Atinge-se então a fase estacionária em que $k_C=0$, correspondente ao esgotamento de um ou mais nutrientes essenciais e, finalmente, a fase de declínio, devido à ocorrência de autólise celular.

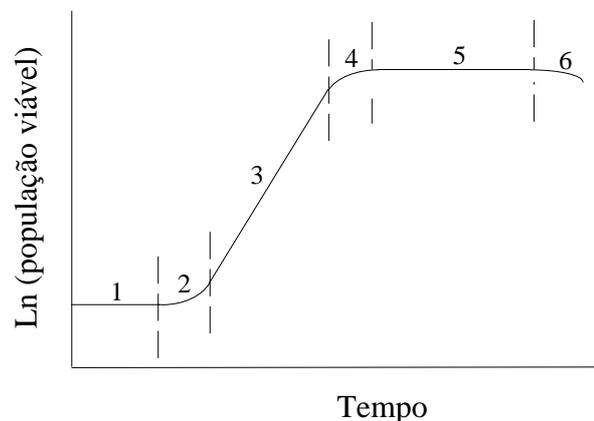


Figura 1.9 – Curva de crescimento microbiano em sistema fechado. 1) fase de latência; 2) fase de aceleração; 3) fase exponencial; 4) fase de desaceleração; 5) fase estacionária; 6) fase de declínio.

Por vezes é útil exprimir o crescimento exponencial pelo parâmetro "tempo de duplicação" (t_D). Este exprime, tal como o nome indica, o tempo necessário para que a população em crescimento duplique e é facilmente deduzido a partir da equação 1.31. Assim, se t_D é o tempo necessário para que a densidade populacional, X , seja igual a $2X_0$ tem-se:

$$\ln 2X_0 = \ln X_0 + k_c t_D \quad (1.32)$$

e,

$$t_D = \frac{\ln 2}{k_c} \quad (1.33)$$

O parâmetro t_D tem as dimensões de um tempo.

O "tempo de duplicação", tal como a taxa específica de crescimento, constituem parâmetros biológicos, cujos valores dependem da estirpe microbiana e são fortemente influenciados pelas condições físicas (pH, actividade da água, tensão de oxigénio, presença de inibidores), químicas (particularmente a natureza e concentração da fonte de carbono e energia) do meio e ainda pela temperatura.

2.2. Técnicas para a avaliação do crescimento microbiano

As diferentes metodologias descritas na literatura para a avaliação do crescimento microbiano [55] são facilmente aplicáveis a microrganismos unicelulares, que são capazes de formar suspensões homogéneas, como as leveduras. Alguns desses métodos são brevemente descritos em seguida:

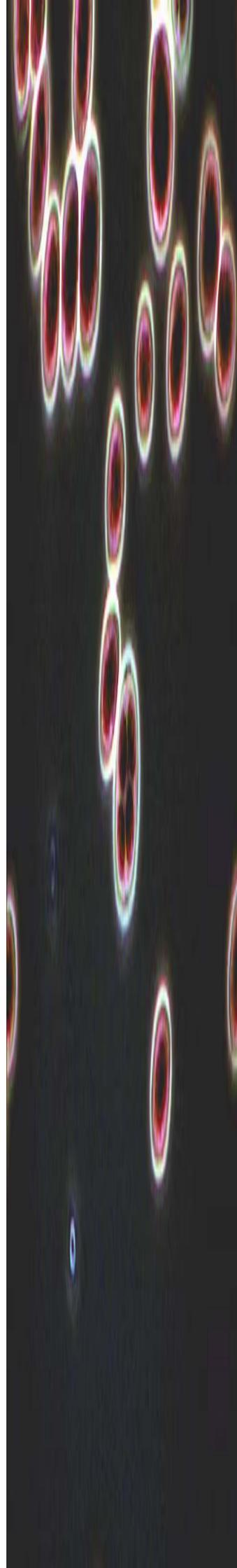
- a) Turbidimetria – permite medir o aumento da biomassa em função da luz dispersa por uma suspensão de células. O aumento de turvação verificado ao longo do crescimento pode ser determinado a partir de medições de densidades ópticas num espectrofotómetro de ultra – violeta /visível a um comprimento de onda que corresponde à absorção máxima.
- b) Contagem de colónias em placa – permite determinar o número de células viáveis após espalhamento de uma suspensão em meio de cultura sólido em placa de Petri.
- c) Contagem através do microscópio óptico do número de células totais – este método permite contar ao microscópio numa câmara de contagem (câmara de Neubauer) o número de células contidas num volume conhecido de suspensão de cultura, quando se coloca esta numa lâmina de vidro com um volume conhecido.

- d) Determinação de peso seco – é o único método que permite medir directamente a biomassa (massa celular) de uma cultura em suspensão. Para tal coloca-se um determinado volume de uma suspensão de células num filtro de papel previamente pesado e após a sua secagem procede-se novamente à pesagem. A diferença de massas obtida corresponde ao aumento da biomassa.
- e) Doseamento de um componente – este método permite avaliar o crescimento determinando a quantidade de um substrato consumido (glucose, proteínas) ou produto formado (DNA, ATP, etc.) ao longo do crescimento de uma cultura de células.

De todos os métodos atrás referidos, o turbidimétrico é o referido na literatura [54, 55] como o mais expedito para medir a massa celular dos microrganismos unicelulares. No entanto, a técnica turbidimétrica não é viável para avaliar o crescimento de espécies de microrganismos que formam agregados celulares ou filamentos como por exemplo, os fungos filamentosos. Como nas técnicas electroquímicas não é estritamente necessário que as soluções em análise sejam homogéneas, estas técnicas poderão ser implementadas para a avaliação do crescimento de microrganismos em meios líquidos independente do grau de homogeneidade das culturas. Neste trabalho iniciou-se por implementar e desenvolver o método electroquímico para a avaliação do crescimento de leveduras (*Candida utilis*, *Saccharomyces cerevisiae*). A turbidimetria foi o método utilizado como de referência e comparativo. As suspensões de células recolhidas ao longo do tempo foram sujeitas a análise voltamétricas e turbidimétricas.

Capítulo II

Parte experimental



1. Instrumentação

Nesta secção do capítulo II são descritos os equipamentos utilizados no decorrer deste trabalho experimental. Na tabela 2.1 apresenta-se de uma forma breve a instrumentação e o modelo de cada equipamento, assim como a precisão associada às leituras, no caso dos instrumentos de medida.

Tabela 2.1 – Descrição dos equipamentos, modelos e incerteza associada a cada medição.

Descrição	Instrumentação	Marca, Modelo	Incerteza
<i>Voltametria</i>	Potenciostato/Galvanostato Computador Impressora	Autolab, PGSTAT 30 Tsunami, Celeron – 333 MHz Hewlet Packard, Deskjet – 695	$\pm 0,001$ V; $\pm 0,001$ nA
<i>Potenciometria</i>	Medidor de pH	Hanna Instruments, 8417	$\pm 0,01$
<i>Pesagem</i>	Balança analítica	Precisa 40Sm-200A	$\pm 0,00001$ g
<i>Autoclavagem</i>	Autoclave	Uniclave, 88	
<i>Polimento</i>	Polideira	Buehler, Ecomet 3	
<i>Limpeza</i>	Banho de ultra-sons	Struers, Metason 60	
<i>Tratamento de água</i>	Purificador	Barnstead, E-Pure	
<i>Turbidimetria</i>	Espectrofotómetro	Bausch e Lomb Spectronic 21	T ($\pm 0,5\%$)
<i>Incubação</i>	Incubadora	Gallenkamp, orbital incubater	
<i>Centrifugação</i>	Centrifuga	Sigma 2K15	
<i>Cromatografia</i>	Cromatógrafo Bomba Detector de índice de refração Coluna 300 × 78 mm	Gilson, mod. 712 Gilson, mod. 307 Gilson, mod. 132 HyperezH ⁺ Carbohydrate.	

2. Estudos electroquímicos

Neste sub-capítulo são apresentados em primeiro lugar os materiais e os procedimentos experimentais relativos aos ensaios electroanalíticos. Posteriormente na parte 3 e 4 deste capítulo descrevem-se os procedimentos experimentais seguidos nos estudos microbiológicos e determinações cromatográficas, respectivamente.

2.1. Material de vidro: descrição e limpeza

2.1.1. Células

As células usadas apresentam uma forma de pêra e de parede simples, como se pode ver na figura 2.1. Esta célula apresenta três entradas: onde pode ser introduzida um fluxo de gás inerte (argon) para o desarejamento das soluções e as duas restantes para a introdução dos eléctrodos de trabalho e de referência/auxiliar.

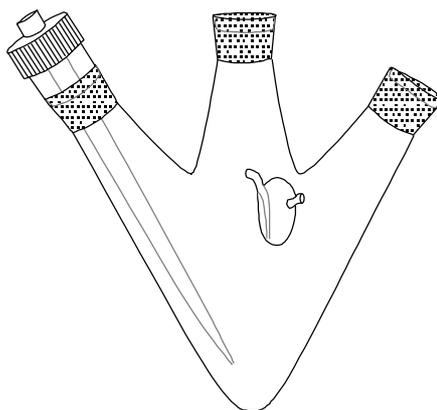


Figura 2.1 – Representação esquemática da célula de parede simples com três entradas para utilização com dois eléctrodos.

2.1.2. Limpeza do material de vidro

A limpeza do material de vidro foi efectuada antes de cada experiência, por imersão numa solução aquosa de detergente em banho de ultra-sons, durante aproximadamente cinco minutos. Seguidamente, o material foi enxaguado com água de abastecimento, enxaguado e imerso em água desionizada, sendo submetido novamente a um banho de ultra-sons. Finalmente, quando se retirou do ultra-sons enxaguou-se novamente com água desionizada e levou-se à estufa a 60° C.

2.2. Eléctrodos

Os eléctrodos utilizados nas técnicas voltamétricas foram eléctrodos de referência e microeléctrodos como eléctrodos de trabalho como se refere nos pontos 2.2.1 e 2.2.2. Nas medições de pH foi utilizado um eléctrodo de vidro combinado Hanna HI 1131.

2.2.1. Eléctrodos de referência

Tal como o próprio nome indica estes eléctrodos têm um valor de potencial bem estabelecido, sendo os valores de potencial de outros eléctrodos registados como uma diferença relativamente a esse valor de referência. Para que estes eléctrodos desempenhem a sua função ao longo do tempo num processo de análise o seu potencial deve-se manter constante ainda que seja sujeito a pequenas variações de temperatura ou devido à passagem de pequenas intensidades de corrente [56].

No decorrer do trabalho experimental foram utilizados dois tipos diferentes de eléctrodos de referência, o eléctrodo de calomelanos e o de prata/cloreto de prata. O primeiro foi utilizado em quase todo o procedimento experimental, tendo o último sido utilizado em apenas alguns ensaios.

a) Eléctrodo de calomelanos saturado

O eléctrodo de calomelanos pode ser representado da seguinte forma: $\text{Hg} | \text{Hg}_2\text{Cl}_2 (\text{s}), \text{KCl}(\text{xM}) ||$, em que x representa a concentração de KCl na solução. Estes eléctrodos encontram-se geralmente disponíveis comercialmente com concentrações de KCl de 0,1 M, 1 M e saturado (aproximadamente igual a 4,6 M). O eléctrodo mais utilizado é o saturado devido à facilidade de preparação e manutenção. O potencial do eléctrodo calomelanos saturado é de 0,248 V a 20° C. A reacção do eléctrodo calomelanos é traduzida pela seguinte equação química:



O eléctrodo de calomelanos saturado, apresentado na figura 2.2, é constituído por um tubo de vidro com comprimento entre 5 a 15 cm e o diâmetro pode variar entre 0,5 a 1,0 cm. No seu interior encontra-se um tubo mais fino que contém uma pasta de mercúrio/cloreto de mercúrio em cloreto de potássio saturado que está em contacto com a solução de cloreto de potássio do tubo externo através de uma pequena abertura. O contacto com a solução a analisar faz-se através de um disco poroso selado ao extremo que preenche o tubo externo. A principal desvantagem deste eléctrodo é a sua dependência com a temperatura devido à variação da solubilidade do KCl. Existem também problemas de toxicidade devido à utilização do mercúrio. Relativamente à primeira desvantagem apresentada, esta é problemática quando durante numa análise existem grandes variações da temperatura. Um dos cuidados que se deve ter com este eléctrodo é verificar se este está saturado com cloreto de potássio antes e durante a realização da experiência e durante toda a análise, para além de se verificar se a solução onde fica imerso, quando armazenado, está também saturada.

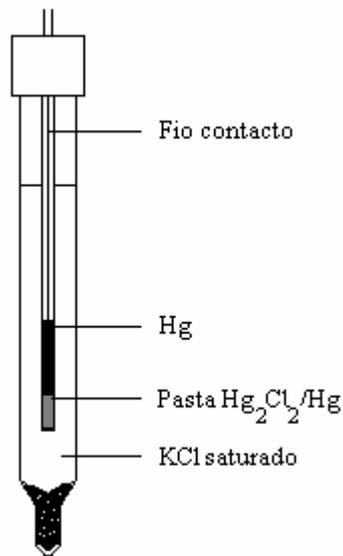
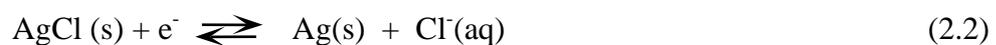


Figura 2.2 – Diagrama de um eléctrodo de calomelanos saturado, comercial.

b) Eléctrodo de prata-cloreto de prata

Contrariamente ao eléctrodo de calomelanos, o eléctrodo de prata-cloreto de prata apresenta uma grande estabilidade relativamente à temperatura que permite a sua utilização até 275 °C, representando-se esquematicamente por $\text{Ag} | \text{AgCl (s), KCl (xM)} ||$. O potencial deste eléctrodo é 0,208 V a 20 °C e a reacção de redução é:



A preparação deste eléctrodo faz-se a partir da deposição de uma camada de cloreto de prata num fio ou folha de prata e mergulhando numa solução saturada de cloreto de potássio e cloreto de prata.

2.2.2. Microeléctrodos

No decorrer deste trabalho foram utilizados microeléctrodos de disco de platina construídos no laboratório.

a) Construção

Os microeléctrodos utilizados foram preparados a partir da secção transversal de fios de platina com diâmetros apropriados. Inicialmente cortou-se um segmento de fio de platina de aproximadamente 3 cm. A microfibras foi colada a um fio condutor de níquel-crómio de maior espessura. A cola utilizada foi uma cola condutora de prata (élecolit 340) resistente a elevadas temperaturas. Em seguida, os fios colados foram colocados numa estufa a 60° C para efectuar a secagem da cola durante aproximadamente 12 horas.

Os fios, após prévio arrefecimento ao ar, foram introduzidos num suporte de vidro, semelhante a uma pipeta de Pasteur. Este tubo foi previamente submetido a uma limpeza e secagem recorrendo-se ao procedimento descrito em 2.1.2. A introdução fez-se através da abertura mais apertada do tubo de vidro para que a microfibras ficasse nesta extremidade e o ponto de colagem ficasse na parte em que o tubo começa a alargar (figura 2.3).

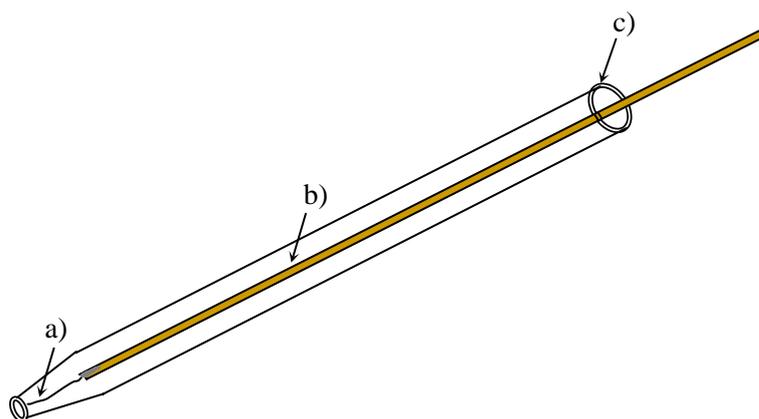


Figura 2.3 – Representação esquemática do conjunto a) de um microfio de platina, b) do fio condutor de níquel – crómio, c) inserido no tubo de vidro.

A selagem do microeléctrodo foi efectuada num forno constituído por um fio condutor em níquel – crómio em forma de hélice, ligado a um gerador de corrente. A extremidade do tubo em vidro que se pretende selar foi inserida cuidadosamente no interior da hélice. A temperatura do forno é controlada pela diferença de potencial aplicada entre as duas extremidades. Por efeito de Joule, a selagem da fibra na extremidade do tubo ocorre como consequência da dilatação do vidro. A posição do tubo foi ajustada continuamente de modo a selar este à microfibrilha num comprimento mais ou menos 1 mm. A intensidade de corrente foi diminuída lentamente até se desligar o gerador. Após arrefecimento do tubo de vidro, este foi retirado cuidadosamente da hélice. A extremidade superior do fio condutor de níquel – crómio foi fixada na abertura superior do tubo de vidro com silicone. Seguidamente, a extremidade selada do tubo é lixada numa lixa de água de modo a expor a extremidade da microfibrilha e se obter uma superfície plana transversal a esta. Por último efectuam-se sucessivos polimentos em camurças (Microcloth) e com alumina de polimento (Micropolish), com granulometria decrescente: 3,0, 0,3 e 0,05 μm .

Depois de polir devidamente o microeléctrodo, este foi submetido a uma análise cuidadosa utilizando-se uma lupa estereoscópica (Olimpus, VMZ 1 \times - 4 \times), tendo em atenção os seguintes parâmetros:

- ligação entre a microfibrilha e o fio de ligação; este contacto pode-se descolar quando se introduz o conjunto no suporte de vidro ou por acção do calor a que fica submetido na fase de selagem.
- bolhas de ar ao longo da microfibrilha; a existência de bolhas de ar na zona de selagem entre a microfibrilha e o vidro deve ser verificada já que a sua presença faz com que a área do microeléctrodo seja diferente da secção recta da microfibrilha e a superfície exposta não seja um disco, não sendo possível determinar este diâmetro.
- superfície do microeléctrodo; esta deve ser observada de modo a verificar a existência de bolhas de ar. Ainda que estas existam, pode-se recuperar o microeléctrodo, lixando a parte onde estas estão presentes.

b) Calibração

Durante o trabalho experimental foram utilizados dois microelctrodos de platina, de diâmetros diferentes. O diâmetro dos microelctrodos foi determinado a partir da intensidade de corrente de difusão dos voltamogramas de estado estacionário obtidos com uma solução padrão de hexacianoferrato de potássio ($4,02 \times 10^{-3}$ M) utilizando-se o cloreto de potássio como electrólito suporte (KCl, Merck, p.a., MM = 74,56 g/mol) de concentração 0,10 M. Os ensaios foram realizados à temperatura ambiente.

A equação química que traduz a reacção electroquímica é a seguinte:



Considerando o coeficiente de difusão do hexacianoferrato de potássio ($D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$ [57]), determinou-se o valor do raio dos elctrodos, pela expressão 1.14 da Introdução Teórica.

Tabela 2.2 – Valores dos raios e diâmetros dos microelctrodos e desvios associados.

Microelctrodo	Raio (μm)	ϕ (μm)
1	$12,2 \pm 0,7$	24 ± 1
2	$24,91 \pm 0,02$	$49,82 \pm 0,04$

c) Limpeza

Os microelctrodos foram polidos, antes de se efectuar cada um dos ensaios, numa polideira Buehler, utilizando uma camurça para polimento, Microcloth, e alumina (óxido de alumínio) para polimento, Micropolish, de 0,05 μm . Seguidamente foram lavados com água desionizada e secos com papel absorvente. Numa primeira etapa deste trabalho foram feitos alguns ensaios para se verificar a necessidade de efectuar este polimento

antes de se iniciar cada um dos ensaios. Como se verificou que a reprodutibilidade melhorava com este tratamento, este foi sempre efectuado.

2.3. Procedimento experimental

A célula electroquímica foi colocada numa caixa de Faraday. O eléctrodo de referência e o microeléctrodo previamente limpos (2.2.1 e 2.2.2) foram colocados na célula e ligados ao Potenciostato/Galvanostato, Autolab, e à terra. Os sinais electroquímicos foram adquiridos no computador através de software adequado (GPES 4.6), figura 2.4.



Figura 2.4 – Potenciostato/Galvanostato Autolab acoplado a um computador similar ao utilizado no decorrer do trabalho.

A voltametria de varrimento linear (LSV) e a voltametria de onda quadrada (SWV) foram as técnicas utilizadas na análise de culturas e suspensões de células das duas espécies de leveduras estudadas. A primeira técnica foi também utilizada na calibração dos microeléctrodos (2.2.2 b)).

2.3.1. Voltametria de varrimento linear em estado estacionário

O valor da velocidade de varrimento foi determinado através da realização de ensaios prévios nos quais se verificaram que o valor mais adequado para este parâmetro é de 50 mV/s para os microeléctrodos utilizados. Para velocidades de varrimento próximas

e inferiores a esta, a resposta voltamétrica parece ser independente da base de tempo da experiência, isto é, da velocidade de varrimento.

2.3.2. Voltametria de onda quadrada

A determinação dos parâmetros experimentais característicos desta técnica foi efectuada a partir de alguns ensaios preliminares nos quais se variou a frequência, o potencial de patamar a patamar e a amplitude, avaliando a reprodutibilidade e a forma das respostas obtidas. Os parâmetros escolhidos foram, para a frequência 8 Hz, um incremento de potencial 5 mV e amplitude de patamar a patamar de 25 mV.

2.4. Estimativa das incertezas experimentais

Na análise voltamétrica de suspensões de células e de culturas ao longo do tempo foram registados pelo menos 5 determinações em cada experiência. Nos ensaios cromatográficos apenas se realizaram duas réplicas.

Os resultados das determinações experimentais são apresentados com o erro associado, expresso em termos de desvio padrão.

A média aritmética, \bar{x} , é calculada pela seguinte forma:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (2.4)$$

onde x_i é o valor da réplica i e n é o número de réplicas.

A dispersão dos resultados é avaliada através do desvio padrão (s):

$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad (2.5)$$

Embora as técnicas utilizadas conduzissem a valores reprodutíveis, em alguns casos foi necessário desprezar algum resultado que não se apresentava concordância com os restantes.

A rejeição de valores foi baseada no teste Q , de acordo com a seguinte expressão:

$$Q = \left| \frac{\text{valor suspeito} - \text{valor mais próximo do suspeito}}{\text{valor maior} - \text{valor menor}} \right| \quad (2.6)$$

O valor suspeito era rejeitado nos casos em que o Q calculado pela expressão 2.6 era superior ao valor Q tabelado, para uma probabilidade de 90 %.

As incertezas associadas às concentrações e factores de diluição foram determinadas considerando a propagação das incertezas aleatórias:

$$\frac{\partial C}{C} = \sqrt{\left(\frac{\partial x_1}{x_1}\right)^2 + \left(\frac{\partial x_2}{x_2}\right)^2 + \dots + \left(\frac{\partial x_n}{x_n}\right)^2} \quad (2.7)$$

onde C é a concentração analítica ou outra variável que se relaciona com esta (tal como o factor de diluição) e x_1 , x_2 e x_n são variáveis experimentais utilizadas no cálculo de C que estão afectadas de incertezas aleatórias ∂x_1 , ∂x_2 e ∂x_n .

As equações das rectas apresentadas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados. Os desvios padrão da ordenada na origem e do declive foram determinados de modo a obter-se os intervalos de confiança destes parâmetros.

Os parâmetros de cada uma das rectas foram calculados pelas seguintes expressões:

$$b = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad (2.8)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (2.9)$$

onde b é o declive da recta e a a ordenada na origem, \bar{x} e \bar{y} são os valores médios de x e y, isto é, das grandezas representadas nas ordenadas e nas abcissas.

A qualidade do ajuste obtido é quantificada através do valor do coeficiente de correlação, r.

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\left[\sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[\sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}} \quad (2.10)$$

O desvio padrão da ordenada na origem, s_a , pode ser calculado pela seguinte expressão:

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.11)$$

onde $s_{y/x}$ é a estimativa do desvio padrão dos pontos experimentais y à recta de regressão, dado por:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (2.12)$$

onde \hat{y} é a estimativa de y , dada pela recta de regressão.

O desvio padrão do declive da recta, s_b é dado por:

$$s_b = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.13)$$

Os valores de s_a e de s_b podem ser utilizados para estimar os intervalos de confiança para o declive e a ordenada na origem:

$$b \pm t s_b \quad \text{e} \quad a \pm t s_a \quad (2.14)$$

onde o valor de t é o correspondente ao nível de confiança desejado para $n-2$ graus de liberdade.

- Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção, corresponde à quantidade mínima que é possível detectar pelo método, ou seja, a concentração para a qual o sinal obtido é significativamente diferente do branco, pode ser calculado para o método da curva de calibração pela seguinte expressão:

$$\text{l.d.d} = \frac{3s_a - a}{b} \quad (2.15)$$

O limite de quantificação corresponde à concentração mínima para a qual a medida tem significado quantitativo, e para o método da curva de calibração, é normalmente calculado pela seguinte expressão:

$$\text{l.d.q} = \frac{10s_a - a}{b} \quad (2.16)$$

Para determinação das concentrações das espécies detectadas nas amostras de sobrenadantes, por interpolação em rectas de calibração, a incerteza associada foi determinada através da seguinte expressão:

$$s_{x_0} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (2.17)$$

onde n o número de pontos experimentais utilizados na definição da recta de calibração e m é o número de réplicas do sinal medido, y_0 , na solução a analisar.

3. Estudos microbiológicos

3.1. Microrganismos

Nas experiências realizadas utilizou-se como material biológico as leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Pichia jadinii* sendo esta última mais conhecida por *Candida utilis*, no seu estado anamórfico.

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Meio de manutenção

As leveduras foram mantidas a 25° C em meio de cultura, cuja composição foi a seguinte: glucose 2% (p/v), peptona 1% (p/v), extracto de levedura 0,5% (p/v), agar 2% (p/v) e água desionizada q.b.. O meio foi liquefeito no microndas durante 5 minutos e depois distribuído em tubos de ensaio (\approx 5 mL/tubo). Seguidamente, procedeu-se à esterilização do meio em autoclave durante 20 minutos a 1 atm e foi deixado a solidificar, inclinando os tubos de ensaio cerca de 10°. A repicagem das leveduras foi feita com uma periodicidade de 48 horas com uma ansa esterilizada.

3.2.2. Meio de crescimento

As células de cada uma das leveduras, com um crescimento de 48 horas em meio de manutenção, foram inoculadas nos meios líquidos utilizados, meio K, meio contendo ácido láctico 0,5 % e meio contendo etanol 0,5%. Os três meios eram constituídos por um meio mineral, uma fonte de carbono e energia e suplementados com vitaminas e

oligoelementos. A constituição do meio mineral está indicada na tabela 2.3 e foi a mesma nos três meios variando apenas a fonte de energia e carbono.

Tabela 2.3 – Concentrações dos componentes do meio base e erros associados ($C \pm \delta$ (% p/v)).

Componentes	$C \pm \delta$ (% p/v)	MM g/mol	Marca
Sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$	$0,5000 \pm 0,0002$	132,06	
Dihidrogenofosfato de potássio KH_2PO_4	$0,5000 \pm 0,0002$	136,06	Merck
Sulfato de magnésio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$0,05000 \pm 0,00002$	246,48	
Cloreto de cálcio $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	$0,013240 \pm 0,000005$	147,02	

A glucose, o ácido láctico e o etanol foram as fontes de carbono e energia constituintes respectivamente do meio K, meio com ácido láctico e meio com etanol.

Para a preparação de um litro de meio K foram dissolvidos, em 700 mL de água desionizada, os reagentes correspondentes à preparação de um litro de meio mineral e nos restantes 300 mL de água dissolveu-se a quantidade de glucose necessária para obter a concentração final de $2,000 \pm 0,0008$ % (p/v). As soluções foram esterilizadas por calor húmido num autoclave durante 20 minutos a 1 atm e antes de serem utilizadas, foram misturadas, assepticamente.

Na preparação dos outros dois meios dissolveu-se com os reagentes constituintes do meio mineral a quantidade necessária de ácido láctico ou de etanol para se obter uma concentração final de $0,500 \pm 0,002$ % (v/v) em 1 L de solução. O meio contendo ácido láctico foi esterilizado após a adição do ácido láctico enquanto que no meio contendo etanol, este só foi adicionado assepticamente depois da esterilização do meio mineral.

Quando foi necessário acertar o pH do meio de cultura, procedeu-se ao ajuste do pH do meio mineral, com NaOH 10 M ou HCl 1 M. No caso do meio contendo ácido láctico, o pH da solução do mesmo era ajustado ao valor do pH de crescimento antes de proceder à esterilização do mesmo.

Nos três meios de cultura, por cada litro adicionou-se, também assepticamente, 0,5 mL das soluções de vitaminas e de oligoelementos A e B, previamente esterilizadas por filtração. A composição destas soluções está descrita na tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Concentração dos constituintes das soluções de vitaminas e oligoelementos utilizadas para suplementar os meios de cultura.

Soluções	Componentes	Concentração (% p/v)
Vitaminas	<i>Biotina</i>	0,001
	<i>Pantotenato de cálcio</i>	0,08
	<i>mio-inositol</i>	4
	<i>Niacina</i>	0,16
	<i>Hidroclorato de piridoxina</i>	0,16
	<i>Hidroclorato de tiamina</i>	0,16
Oligoelementos A	<i>H₃BO₃</i>	1
	<i>KI</i>	0,2
	<i>NaMoO₄.2H₂O</i>	0,4
Oligoelementos B	<i>CuSO₄.5H₂O</i>	0,08
	<i>FeCl₃.6H₂O</i>	0,4
	<i>MnSO₄.4H₂O</i>	0,4
	<i>ZnSO₄.7H₂O</i>	0,8
	<i>Solução de HCl 10⁻³</i>	0,8

3.3. Condições de crescimento

Células jovens das leveduras *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae*, com um crescimento de cerca de 48 h em meio de manutenção, a 25° C, foram inoculadas no meio de crescimento líquido cuja composição se apresenta em 3.2.2 deste capítulo. O crescimento da levedura foi efectuado em balões "erlenmeyer", num volume útil de cerca de metade do volume do mesmo. As culturas foram colocadas numa incubadora orbital Gallenkamp a 125 rotações por minuto e à temperatura de 26° C.

3.4. Avaliação do crescimento por turbidimetria

A avaliação do crescimento de culturas de células que formam suspensões homogêneas é normalmente efectuada pelo método turbidimétrico. A turbidimetria baseia-se na medida da quantidade de radiação dispersa por interacção com matéria suspensa em solução. A turbidância (S) varia directamente com a concentração de matéria suspensa, sendo a constante de proporcionalidade dada pelo produto do percurso óptico (l) e de uma constante k , conhecida como coeficiente turbidimétrico ($S = klc$). As determinações são efectuadas relativamente a um branco e utilizando com método quantitativo a curva de calibração. As leituras efectuadas foram de transmitância, a um comprimento de onda de 640 nm, num espectrofotómetro Spectronic 21 Bausch e Lomb ($T \pm 0,5\%$).

Para quantificar a biomassa (X) formada ao longo do tempo (t) por turbidimetria foram retiradas amostras das culturas, assepticamente, em intervalos de tempo apropriados. A taxa específica de crescimento (k_c) foi calculada a partir do declive da relação linear entre o logaritmo natural dos valores experimentais de absorvância obtidos e o tempo de cultura de acordo com a equação 1.31.

3.5. Análise electroquímica de culturas de células

A inoculação das células das leveduras foi efectuada de véspera, de acordo com o procedimento descrito anteriormente na secção 3.3. No dia seguinte eram retiradas amostras ao longo do tempo nas diferentes fases do crescimento para a análise electroquímica de acordo com o procedimento descrito em 2.5 deste capítulo.

3.6. Estudo de suspensões de células

Numa primeira fase deste trabalho foram analisadas por voltametria suspensões de células da levedura *Candida utilis* com diferente biomassa, estas foram preparadas a partir de culturas bastante crescidas ($1,20 < A < 4,20$) por sucessivas diluições com o meio de cultura. Este procedimento foi utilizado para o estudo voltamétrico de suspensões de células da levedura *Candida utilis* em meio K e meio base com 0,5 % de etanol, cujos

resultados estão apresentados na secção 1.2.1 e 1.2.2 do capítulo III. O factor de diluição é a razão entre o volume de cultura de células e o volume total de solução.

As determinações efectuadas nestas suspensões serviram para comparar os métodos electroquímicos e turbidimétrico assim como verificar a linearidade e limites de detecção e quantificação dos referidos métodos.

4. Estudos cromatográficos

Esta técnica permite efectuar separações, identificação e determinação de compostos químicos em misturas complexas. Entre outras, a necessidade de um pequeno volume de amostra, a grande sensibilidade na análise quantitativa de amostras de concentrações muito baixas, na ordem dos ppm, são vantagens que tornam esta técnica uma importante ferramenta no domínio da química analítica.

Neste trabalho foi necessário recorrer à cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para a identificação dos componentes, presentes nas culturas de células, responsáveis pelo sinal electroquímico.

4.1. Instrumentação

As análises por HPLC foram realizadas utilizando um sistema Gilson constituído por uma bomba mod. 307, um detector de índice de refacção (Refractive Index Detector Gilson mod. 132) e uma coluna HyperezH⁺Carbohydrate. Este cromatógrafo inclui um válvula de amostragem para garantir a reprodutibilidade dos volumes injectados.

4.2. Preparação da fase móvel

A fase móvel utilizada foi uma solução 0,0025 M de ácido sulfúrico preparada por diluição da solução de ácido sulfúrico concentrada (97%; d = 1,84) com água ultra – pura. Desgasificou-se esta solução num banho de ultra-sons durante uma hora seguida por filtração em vácuo.

4.3. Preparação das amostras

Antes de se proceder à injeção das amostras estas foram desproteinizadas. Para tal, as amostras foram incubadas durante 30 minutos em ácido perclórico de concentração final 2,00 % e centrifugadas durante 10 minutos a 12000 g. Em seguida as amostras foram diluídas para metade com uma solução padrão 1,00% de arabinose.

4.4. Condições experimentais

A coluna foi previamente equilibrada durante 30 minutos com a fase móvel ao caudal de 0,5 mL/min e à temperatura de 30° C. O volume de amostra injectado foi de 25,0 µL utilizando-se uma microseringa de $25,0 \pm 0,5$ µL. A pressão utilizada durante os ensaios foi entre 40 e 52 bar e a temperatura da coluna de 30° C. O caudal de trabalho da fase móvel foi de 0,5 mL/min. A microseringa foi lavada várias vezes com a amostra a analisar antes da injeção da amostra no cromatógrafo.

4.5. Método analítico

A partir dos cromatogramas, é possível obter o tempo de retenção (t_r (min)) e a área do pico relativo a cada componente (A). A análise qualitativa é feita com base nos tempos de retenção dos diferentes componentes da amostra, por comparação com os cromatogramas das soluções padrão, nas mesmas condições experimentais.

Em todas as análises foi utilizado como padrão interno a arabinose. A arabinose possui as características adequadas a um padrão interno, nomeadamente tem um tempo de retenção diferente de cada um dos componentes existentes na amostra, possui um elevado grau de pureza e é quimicamente inerte. A análise foi efectuada a partir da curva de calibração representando a razão entre a área do pico da espécie analisada nas soluções padrão e a área do pico do padrão interno, em função da concentração das soluções padrão.

A área relativa aos picos obtidos para as soluções padrão e a solução de padrão interno podem ser expressas da seguinte forma:

$$A_P = f_P \times C_P \times V_{inj} \quad (2.18)$$

$$A_{P_i} = f_{P_i} \times C_{P_i} \times V_{inj} \quad (2.19)$$

onde A_P – área do pico da solução padrão (glucose, ácido láctico, etanol, ácido acético e ácido málico); A_{P_i} – área do pico da solução padrão interno (arabinose); f_P – factor de resposta da solução padrão; V_{inj} – Volume de solução injectado; C_P – concentração da solução padrão; C_{P_i} – concentração da solução de padrão interno.

Deste modo, quando se aplica a razão entre as duas áreas verifica-se:

$$\frac{A_P}{A_{P_i}} = \frac{f_P \times C_P \times V_{inj}}{f_{P_i} \times C_{P_i} \times V_{inj}} = \frac{f_P \times C_P}{f_{P_i} \times C_{P_i}} \quad (2.20)$$

onde $\frac{f_P}{f_{P_i} \times C_{P_i}}$ representa o declive da recta da curva de calibração. Esta expressão mostra que a utilização do padrão interno elimina a variável volume de injeção.

Na tabela 2.5 apresenta-se a gama de concentração e especificações das espécies analisadas por HPLC.

Tabela 2.5 – Gama de concentração e especificações dos componentes das soluções padrão para HPLC.

Componente	Intervalo de concentração (%)	MM g/mol	Marca	Densidade g/ mL	Pureza %
Glucose $C_6H_{12}O_6$	[0,202; 2,016] p/v	181,17	Merck		99
Ácido láctico $C_3H_6O_3$	[0,0250 a 0,500] v/v	90,08	Merck	1,21	90
Ácido málico $C_4H_6O_5$	[0,0200 a 0,400] p/v	134,10	Sigma		100
Ácido acético $C_2H_4O_2$	[0,0200 a 0,400]v/v	60,05	Merck	1,05	99,8
Etanol C_2H_5OH	[0,0200 a 0,400] v/v	46,07	Merck	0,79	99

A D (-) arabinose ($C_5H_{10}O_5$, Sigma, MM = 150,1 g/mol, 99%) foi utilizada em soluções de concentração igual em todas as soluções padrão: 0,4999 % (p/v). Na análise das amostras foi preparada uma solução mãe de arabinose 1,002 % (p/v) diluída de 1:2 quando adicionada às amostras.

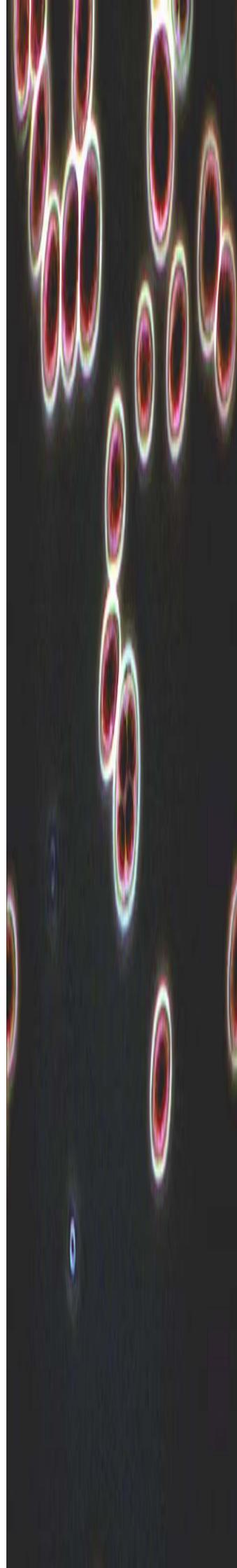
O meio mineral, constituinte dos três meios de cultura também foi analisado por cromatografia de HPLC. Para tal, prepararam-se soluções padrão dos constituintes do meio mineral. Na tabela 2.6 apresentam-se as concentrações de cada um dos componentes nas soluções analisadas.

Tabela 2.6 – Concentrações dos componentes do meio base e erros associados ($C \pm \delta$ (% p/v))

Componentes	$C \pm \delta$ (% p/v)	MM g/mol	Marca
<i>Sulfato de amônio $(NH_4)_2SO_4$</i>	$0,2704 \pm 0,0007$	132,06	
<i>Dihidrogenofosfato de potássio KH_2PO_4</i>	$0,2706 \pm 0,0007$	136,06	Merck
<i>Sulfato de magnésio $MgSO_4 \cdot 7H_2O$</i>	$0,0271 \pm 0,0001$	246,48	
<i>Cloreto de cálcio $CaCl_2 \cdot 2H_2O$</i>	$0,0061 \pm 0,0001$	147,02	

Capítulo III

Apresentação e discussão dos resultados



1. Respostas voltamétricas em diferentes meios de cultura e em suspensões de células

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos através de métodos electroquímicos nos diferentes meios de cultura e em suspensões de células da levedura *Candida utilis* cultivadas nos meios de cultura estudados. Utilizaram-se duas técnicas voltamétricas, a voltametria de varrimento linear em estado estacionário (LSV) e a voltametria de onda quadrada (SWV). Como eléctrodos foram utilizados de trabalho microeléctrodos de platina com diâmetros de 25 e 50 μm .

1.1. Caracterização dos meios de cultura

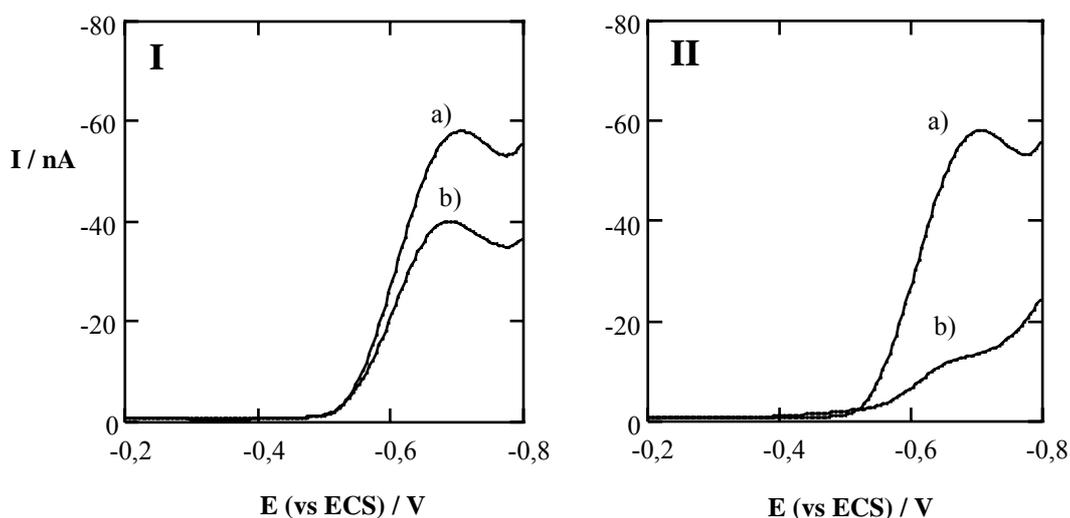


Figura 3.1 – Voltamogramas de SWV obtidos com o microeléctrodo de platina de diâmetro de 25 μm : I – a) no meio mineral e b) no meio K; II – a) meio mineral e b) no meio com 0,5 % de etanol.

Na figura 3.1 estão apresentados voltamogramas obtidos em meio mineral, meio K e meio com 0,5 % de etanol. O sinal voltamétrico que se observa por volta de -700 mV, nos dois meios de cultura com as fontes de carbono e energia é também visível no meio mineral. O pico observado é devido à redução de componentes presentes no meio mineral. Para determinar a origem deste sinal foram analisadas soluções de KH_2PO_4 às quais se adicionaram sucessivamente $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em quantidades adequadas para se reproduzir as concentrações utilizadas no meio mineral. Como se pode verificar nos voltamogramas apresentados na figura 3.2, um sinal com potencial de pico a aproximadamente -700 mV aparece na solução contendo apenas KH_2PO_4 . Com a adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ observa-se um aumento da intensidade de pico, mas o sinal não se encontra tão bem resolvido.

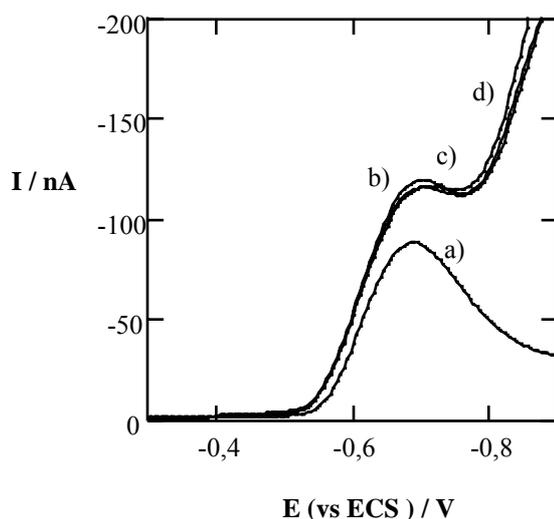


Figura 3.2 – Voltamogramas obtidos com o microeléctrodo de platina de 25 μm no estudo do meio mineral: a) KH_2PO_4 ; b) KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; c) KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; d) KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

A adição de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ não provoca qualquer alteração do voltamograma obtido na solução contendo KH_2PO_4 e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Assim, os sinais voltamétricos que ocorrem nos meios de cultura (meio K e meio com etanol) poderão dever-se à redução electroquímica das espécies: H_2PO_4^- e NH_4^+ . Para potenciais superiores a -0,55 V não se verificam quaisquer outros sinais voltamétricos nas condições experimentais testadas.

A análise voltamétrica de suspensões de células de *Candida utilis* em ambos os meios de cultura foi também efectuada por voltametria de varrimento linear em estado estacionário. Como se pode verificar na figura 3.3 obtêm-se respostas bem definidas quer por LSV quer por SWV, em suspensões de *Candida utilis* em meio K.

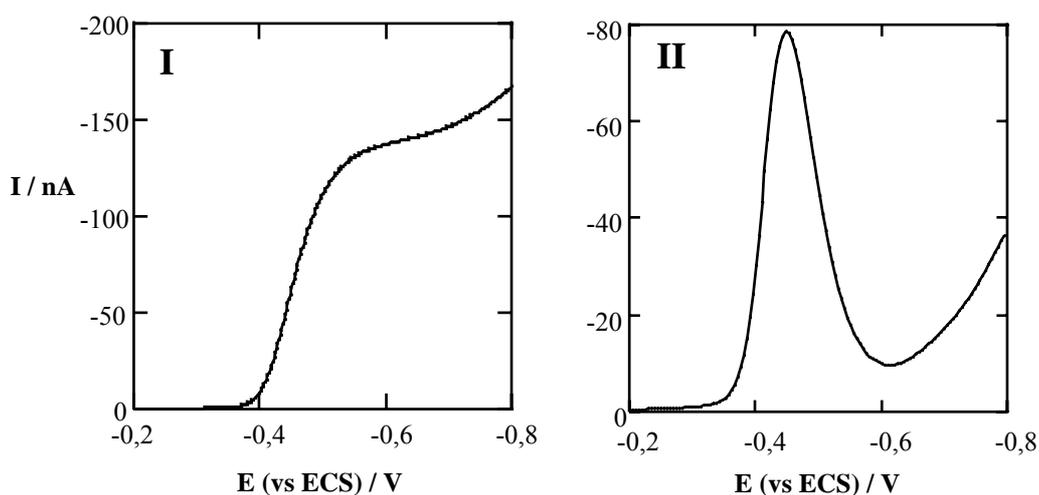


Figura 3.3 – Voltamogramas obtidos em suspensões de células de *Candida utilis* em meio K ($A = 1,338$) com o microeléctrodo de 25 μm de diâmetro por LSV (I) e por SWV (II).

As suspensões de células da levedura *Candida utilis* em meio com 0,5% de etanol foram também analisadas por LSV e SWV e as respostas foram idênticas às obtidas em meio K (figura 3.3).

Os voltamogramas apresentados na figura 3.4, são correspondentes a culturas de células de *Candida utilis* em meio K e em meio com etanol a 0,5 %. O sinal voltamétrico que ocorre a aproximadamente -470 mV aparece associado à presença das células em ambos os meios de cultura. Na análise de uma cultura sem células (sobrenadante) observou-se um pico voltamétrico ao mesmo potencial que aparece nas suspensões de células. Deste modo, comprovou-se que o sinal electroquímico corresponde à redução de espécies presentes na solução do sobrenadante excretadas pelas células, não dependendo da sua presença física.

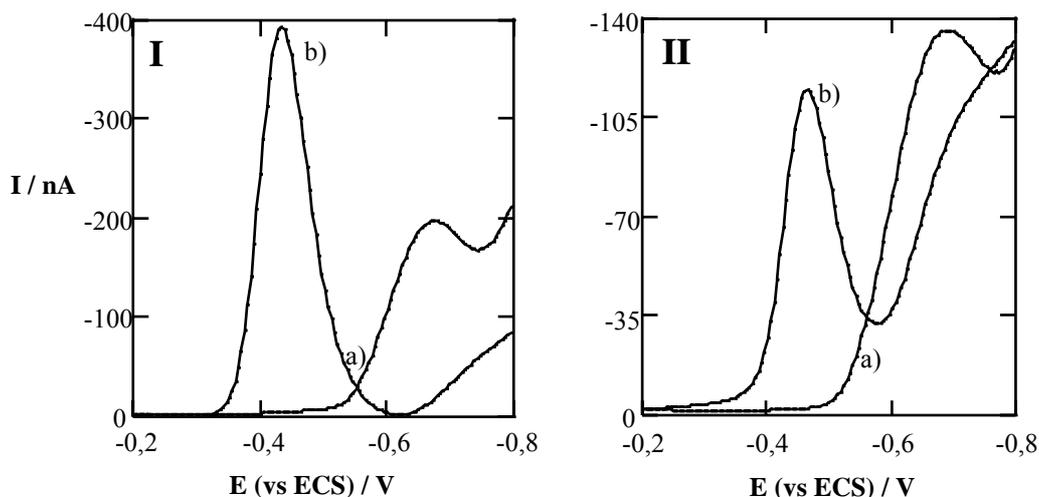


Figura 3.4 – Voltamogramas obtidos com o microelectrodo de platina de 50 μm de diâmetro: I – a) no meio K e b) suspensão de células de *Candida utilis* em meio K ($A = 4,012$); II – a) no meio com 0,5 % de etanol e b) suspensão de células de *Candida utilis* em meio com 0,5 % de etanol ($A = 1,308$).

A resposta voltamétrica do meio contendo ácido láctico apresenta um pico a um potencial de aproximadamente -500 mV. O processo electroquímico associado é a redução do ácido láctico [58] sendo que esta resposta não se verifica no meio mineral antes da adição do referido ácido, conforme se ilustra na figura 3.5. Nesta figura é ainda apresentada a resposta voltamétrica obtida numa cultura de células em meio com ácido láctico, verificando-se que o pico característico do meio ainda se encontra presente mas com uma intensidade de corrente menor. O crescimento das células neste meio ocorre com a diminuição da intensidade do pico associado ao ácido láctico. Esta observação está de acordo com o previsto, já que o ácido láctico é a fonte de energia que as células utilizam nos processos de reprodução e manutenção [59].

Assim, em meio com ácido láctico o crescimento das células será traduzido pela diminuição do sinal voltamétrico associado ao nutriente utilizado pelas células em oposição ao verificado no meio K e meio com etanol, em que a resposta voltamétrica na presença de células apresenta um pico característico, inexistente no meio de cultura, que se relaciona com espécies excretadas pelas células.

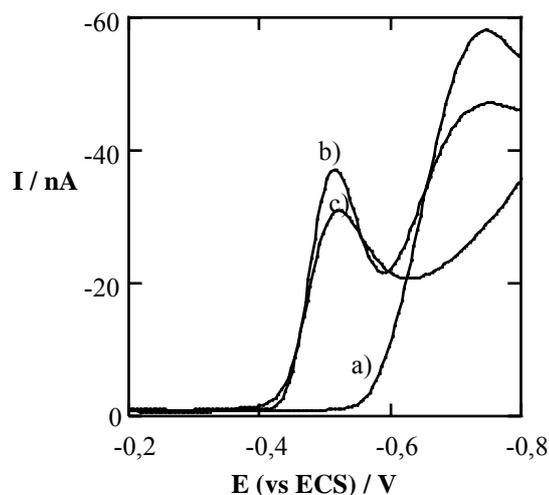


Figura 3.5 – Voltamogramas obtidos com o microelétrodo de platina de 25 μm de diâmetro: a) meio mineral, b) meio com 0,5 % de ácido láctico pH = 4,13 e c) cultura de células da levedura *Candida utilis* em meio com ácido láctico com $A = 0,167$.

As suspensões de células em meio contendo ácido láctico foram também analisadas por LSV e SWV obtendo-se os voltamogramas apresentados na figura 3.6. Contrariamente ao verificado para suspensões de células em meio K, em meio com ácido láctico as curvas obtidas por LSV nas suspensões de células não são bem definidas uma vez que o sinal devido à redução deste ácido aparece sobreposto ao sinal relativos aos restantes componentes do meio.

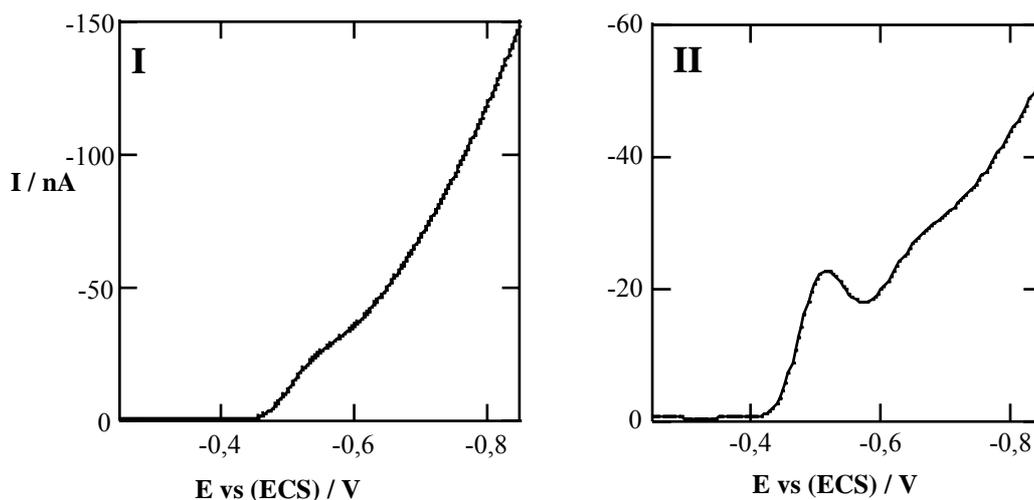


Figura 3.6 – Voltamogramas obtidos com o microelétrodo de platina de 25 μm de diâmetro numa cultura de células de *Candida utilis* em meio contendo ácido láctico com $A = 0,301$ por LSV (I) e por SWV (II).

1.2. Linearidade e limite de quantificação dos métodos

1.2.1. Meio K

Foi analisada uma cultura de células de *Candida utilis* com uma absorvância de 4,012, em meio K. A partir desta prepararam-se suspensões por diluição com meio K. Estas apresentavam valores de absorvância compreendidos entre 0,194 e 4,012. As curvas I-E obtidas por voltametria de varrimento linear e de onda quadrada encontram-se apresentadas na figura 3.7. Os valores de pH medidos no meio K e na suspensão de células mãe foram 4,06 e 2,09, respectivamente. Os factores de diluição traduzem as diluições efectuadas à cultura denominada por cultura de células mãe.

Os valores dos parâmetros característicos dos voltamogramas obtidos com os microelctrodos de 25 e 50 μm , por voltametria de onda quadrada, em suspensões de células da levedura *Candida utilis* em meio K estão apresentados na tabela 3.1.

Verifica-se que a diluição da cultura mãe leva a uma diminuição gradual das intensidades de corrente, obtidas por SWV, acompanhada por um deslocamento em potencial para valores mais negativos. O abaixamento na intensidade de corrente é também observado nos voltamogramas obtidos por LSV. Os parâmetros $E_{1/2}$ e $|E_{3/4}-E_{1/4}|$ (tabela 3.2) característicos dos voltamogramas de LSV em estado estacionário variam não só com a concentração da espécie electroactiva como também com a dimensão do microelctrodo. Os voltamogramas obtidos com o microelctrodo de 50 μm apresentam o mesmo deslocamento em potencial para valores mais negativos, tal como foi verificado em SWV. No entanto com o microelctrodo de 25 μm , esta variação não é monótona, demonstrando que o processo de redução apresenta um mecanismo complexo.

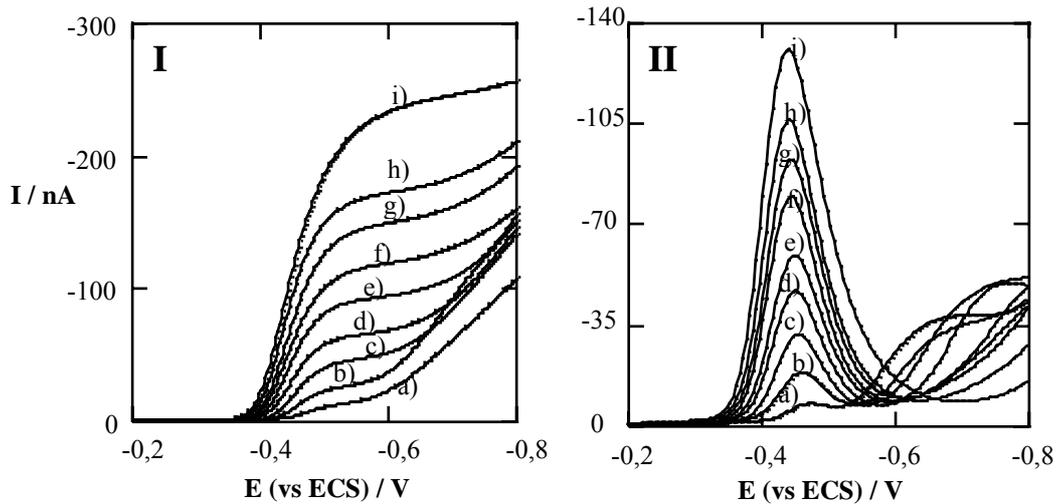


Figura 3.7 – Voltamogramas obtidos com o microelectrodo de platina de 25 μm de diâmetro, em suspensões de células de *Candida utilis* em meio K, com diferentes valores de absorvância: a) 0,194; b) 0,376; c) 0,660; d) 1,205; e) 1,554; f) 1,863; g) 2,529; h) 2,843; i) 4,012 por LSV (I) e por SWV (II).

Tabela 3.1 – Absorvância (A), factor de diluição (f_d), intensidade de corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p), relativos aos voltamogramas obtidos por SWV com microelectrodos de 25 e 50 μm de diâmetro, nas diferentes suspensões de células de *Candida utilis*, preparadas a partir de uma cultura mãe de células crescidas em meio K, com uma absorvância 4,012.

A	f_d	25 μm			50 μm		
		$-I_p$ (nA)	$-E_p$ (mV)	n	$-I_p$ (nA)	$-E_p$ (mV)	n
0,194	$0,0500 \pm 0,0004$	$3,1 \pm 0,3$	470 ± 2	5	n.d	n.d	-
0,376	$0,1000 \pm 0,0007$	$14,1 \pm 0,4$	459 ± 0	5	35 ± 1	458 ± 2	5
0,660	$0,200 \pm 0,001$	$27,9 \pm 0,5$	454 ± 0	5	$76,3 \pm 0,7$	449 ± 0	5
1,205	$0,300 \pm 0,001$	43 ± 1	449 ± 0	5	120 ± 3	444 ± 0	5
1,554	$0,400 \pm 0,002$	56 ± 1	447 ± 3	5	160 ± 3	443 ± 2	5
1,863	$0,500 \pm 0,002$	74 ± 3	443 ± 2	6	220 ± 1	439 ± 0	5
2,529	$0,600 \pm 0,002$	86 ± 2	442 ± 3	4	251 ± 2	437 ± 2	5
2,843	$0,700 \pm 0,003$	101 ± 1	439 ± 0	4	297 ± 3	434 ± 0	5
3,468	$0,800 \pm 0,003$	107 ± 5	440 ± 2	5	332 ± 5	434 ± 0	4
3,990	$0,900 \pm 0,004$	116 ± 4	441 ± 3	3	387 ± 3	435 ± 3	5
4,012	$1,000 \pm 0,004$	124 ± 4	442 ± 3	3	387 ± 9	434 ± 0	3

n.d – não detectado.

Tabela 3.2 – Factor de diluição (f_d), intensidade de corrente de limite (I_L), potencial de meia onda ($E_{1/2}$), critério de Thomes $|E_{3/4}-E_{1/4}|$ relativos aos voltamogramas de LSV em estado estacionário, obtidos com microelectrodos de 25 μm e 50 μm de diâmetro, nas diferentes suspensões de células de *Candida utilis*, preparadas a partir de uma cultura mãe de células crescidas em meio K, com uma absorvância de 4,012. Os valores médios referem-se a três réplicas.

f_d	25 μm			50 μm		
	$-I_L$ (nA)	$-E_{1/2}$ (mV)	$ E_{3/4}-E_{1/4} $ (mV)	$-I_L$ (nA)	$-E_{1/2}$ (mV)	$ E_{3/4}-E_{1/4} $ (mV)
0,0500 \pm 0,0004	14,2 \pm 0,5	472 \pm 4	44 \pm 3	n.d	n.d	n.d
0,1000 \pm 0,0007	25,9 \pm 0,5	460 \pm 1	42 \pm 4	49,6 \pm 0,3	454 \pm 3	38 \pm 4
0,200 \pm 0,001	46,8 \pm 0,3	449 \pm 0	44 \pm 2	98,6 \pm 0,9	446 \pm 1	42 \pm 2
0,300 \pm 0,001	66 \pm 2	449 \pm 0	45 \pm 2	141 \pm 1	441 \pm 1	41 \pm 2
0,400 \pm 0,002	94 \pm 1	447 \pm 0	49 \pm 0	192 \pm 4	437 \pm 0	40 \pm 1
0,500 \pm 0,002	119 \pm 3	445 \pm 1	53 \pm 2	253 \pm 4	437 \pm 0	43 \pm 2
0,600 \pm 0,002	149 \pm 1	447 \pm 4	55 \pm 7	314,2 \pm 0,2	437 \pm 0	45 \pm 1
0,700 \pm 0,003	173 \pm 2	446 \pm 4	57 \pm 8	361 \pm 3	435 \pm 0	46 \pm 2
0,800 \pm 0,003	205 \pm 3	448 \pm 1	64 \pm 4	430 \pm 5	436 \pm 1	48 \pm 3
0,900 \pm 0,004	237 \pm 2	451 \pm 3	67 \pm 4	491 \pm 2	435 \pm 0	47 \pm 1
1,000 \pm 0,004	242 \pm 1	455 \pm 2	74 \pm 3	511 \pm 6	434 \pm 2	42 \pm 2

n.d – não detectado

A representação dos sinais ópticos e electroquímicos medidos em função do factor de diluição permite estudar a linearidade dos sinais, assim como os limites de detecção e de quantificação. Estes parâmetros, normalmente definidos em termos da concentração da espécie a analisar, estão apresentados em termos de absorvância correspondente. A absorvância sendo uma medida da concentração de células dispersas em solução, relaciona-se com o estado de desenvolvimento da cultura.

Enquanto que as medidas electroquímicas foram efectuadas directamente nas suspensões preparadas, a leitura de absorvância só foi efectuada após diluições adicionais (com água) até que o valor medido estivesse entre (0,1 e 0,8). Assim os valores de absorvância indicados são calculados a partir dos medidos, atendendo a estas diluições efectuadas.

Nas figuras 3.8 e 3.9 I e II encontram-se representados os valores de absorvância, intensidade de corrente limite (obtido por LSV) e intensidade de corrente de pico (obtido por SWV) respectivamente em função do factor de diluição. Os pontos assinalados não entraram nos cálculos de regressão para definir a recta mais provável.

Enquanto que a absorvância representada foi calculada a partir de valores medidos sempre na região de linearidade desta técnica e por isso segue sempre uma relação linear com o factor de diluição, as medidas electroquímicas apresentam desvios à linearidade que dependem não só da técnica utilizada como também da dimensão do microeléctrodo.

Na tabela 3.3 estão apresentados os parâmetros estatísticos das rectas representadas na figura 3.9.

Todos os gráficos apresentam zonas de linearidade bem definidas, com uma ordenada na origem que incorpora o zero, demonstrando existir uma proporcionalidade directa entre as medidas electroquímicas efectuadas e a concentração das espécies activas e, entre a absorvância e a concentração de células dispersas.

A incerteza relativa associada aos declives de todas as correlações é da mesma ordem de grandeza, variando entre 3,4 a 5,6 %, o que demonstra juntamente com os coeficientes de correlação entre 0,998 e 0,999, que tanto a definição da rectas de regressão como a sensibilidade dos métodos são bastante elevadas.

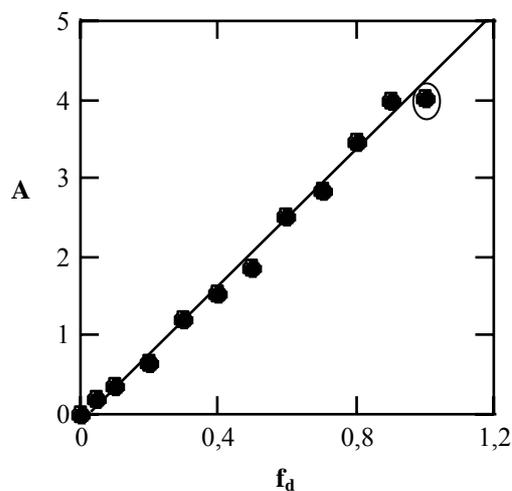


Figura 3.8 – Representação gráfica da variação da absorvância em função do factor de diluição nas suspensões de células da levedura *Candida utilis* em meio K. A recta representada é traduzida pela equação $A = (-0,1 \pm 0,1) + (4,4 \pm 0,3) f_d$.

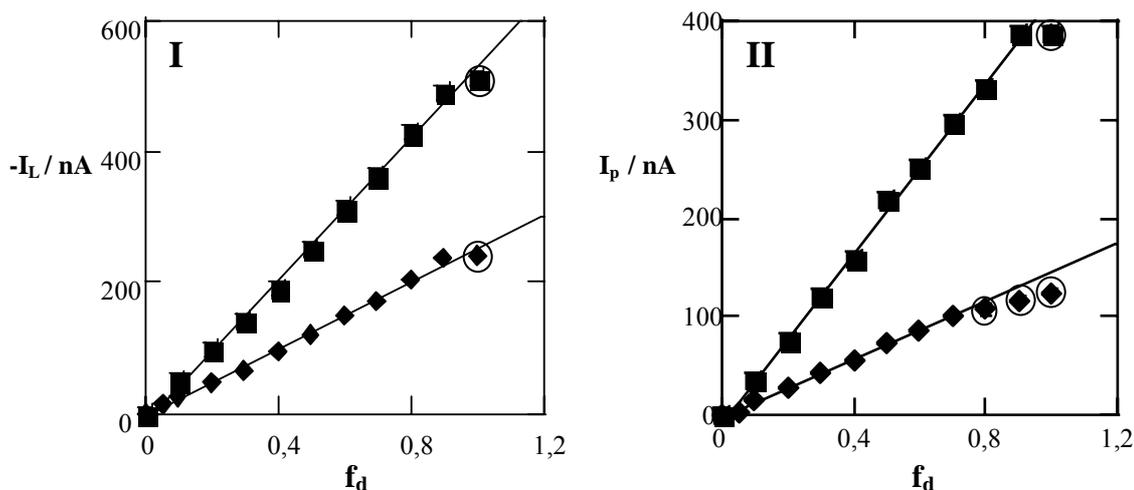


Figura 3.9 – Representação gráfica da variação da intensidade de corrente obtida por LSV (I) e SWV (II) em função do factor de diluição das suspensões de células da levedura *Candida utilis* em meio K com o microeléctrodo de 25 (♦) e 50 μm de diâmetro.

Tabela 3.3 – Ordenada na origem (a), declive (b), coeficiente de correlação (r), número de pontos experimentais (n) e limites de detecção, quantificação e linearidade (l.d.d, l.d.q e l.d.l) expressos em unidades de absorvância obtidos na análise de suspensões de células de *Candida utilis* em meio K.

Técnica	ϕ (μm)	$a \pm ts_a$ (nA)	$b \pm ts_b$ (10^2 nA)	r	n	l.d.d	l.d.q	l.d.l
LSV	25	-4 ± 6	$2,6 \pm 0,1$	0,998	11	0,11	0,44	4,0
	50	-12 ± 14	$5,4 \pm 0,3$	0,998	10	0,34	0,47	4,0
SWV	25	-2 ± 2	$1,47 \pm 0,05$	0,999	9	0,02	0,20	3,7
	50	-6 ± 8	$4,3 \pm 0,2$	0,999	10	0,07	0,33	4,0

Como se pode verificar pela análise da tabela 3.3 a voltametria de onda quadrada é a técnica que apresenta limites de detecção e quantificação mais baixos relativamente aos obtidos por voltametria de varrimento linear. A melhor relação entre o sinal medido e a concentração de espécie é verificada em voltametria de onda quadrada como se pode ver pelos valores dos coeficientes de correlação determinados e apresentados na tabela 3.3.

As técnicas voltamétricas apresentam um grande intervalo de aplicabilidade compreendido entre os limites de quantificação e os de linearidade.

Além da suspensão de células da levedura *Candida utilis* foram também analisadas suspensões de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* neste meio de cultura. Com este estudo pretende-se alargar a aplicabilidade do método voltamétrico a outros microrganismos.

As suspensões preparadas por diluição da cultura com absorvância de 1,083 foram analisadas por voltametria de onda quadrada com o microeléctrodo de 25 μm . Os parâmetros característicos dos voltamogramas obtidos apresentam-se na tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Factor de diluição (f_d), intensidade de corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p), relativos aos voltamogramas obtidos por SWV com o microeléctrodo de 25 μm de diâmetro, nas diferentes suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae*, preparadas a partir de uma cultura mãe de células crescidas em meio K, com uma absorvância 1,083.

f_d	$-I_p$ (nA)	$-E_p$ (mV)	n
0,0500 \pm 0,0004	n.d	n.d	–
0,1000 \pm 0,0007	3,2 \pm 0,2	471 \pm 2	6
0,200 \pm 0,001	17,8 \pm 0,7	454 \pm 0	6
0,300 \pm 0,001	27,4 \pm 0,6	454 \pm 0	6
0,400 \pm 0,002	40 \pm 2	449 \pm 0	6
0,500 \pm 0,002	51 \pm 3	448 \pm 4	6
0,600 \pm 0,002	59 \pm 1	447 \pm 3	6
0,700 \pm 0,003	73 \pm 2	444 \pm 0	6
0,800 \pm 0,003	77 \pm 3	444 \pm 0	5
0,900 \pm 0,004	90 \pm 1	442 \pm 3	6
1,000 \pm 0,004	101 \pm 2	440 \pm 2	4

n.d – não detectado

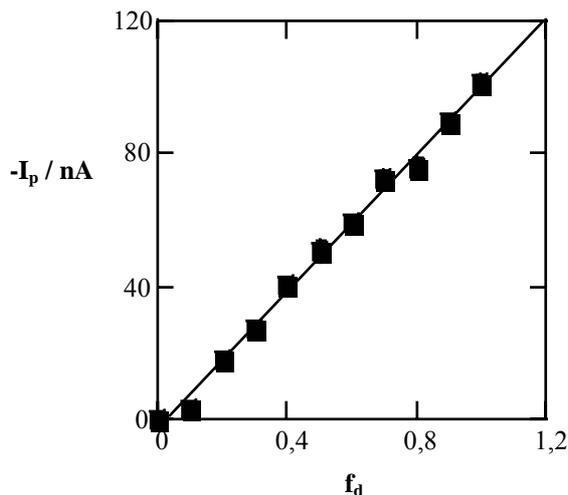


Figura 3.10 – Representação gráfica da variação da intensidade de corrente obtida por SWV em função do factor de diluição nas suspensões de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio K com o microelectrodo de 25 μm de diâmetro.

Na figura 3.10, a qual está representada a intensidade de corrente de pico em função do factor de diluição, verifica-se uma relação linear entre as duas variáveis em toda a gama estudada. Esta linearidade é traduzida pelo coeficiente de correlação obtido, apresentado na tabela 3.5. Nesta tabela estão também apresentados os valores obtidos para a ordenada na origem, declive e limites de detecção e de quantificação. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados da forma descrita anteriormente no estudo de suspensões das células de *Candida utilis* em meio K, estando expressos em unidades de absorvância.

Tabela 3.5 – Ordenada na origem (a), declive (b), coeficiente de correlação (r), número de pontos experimentais (n) e limites de detecção e de quantificação (l.d.d e l.d.q) obtidos na análise de suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio K e determinados a partir da representação na figura 3.10.

$a \pm ts_a$ (nA)	$b \pm ts_b$ (10^2 nA)	r	n	l.d.d	l.d.q
-3 ± 3	$1,03 \pm 0,06$	0,997	11	0,06	0,19

1.2.2. Meio contendo 0,5 % de etanol

Tal como se verificou em meio K, em meio com 0,5 % de etanol o crescimento da cultura de células conduz à produção de espécies em solução que são electroquimicamente activas. A diluição da cultura de células conduz à diminuição do sinal electroquímico associado às espécies excretadas. Na figura 3.11-I encontram-se apresentados voltamogramas de onda quadrada obtidos nas suspensões preparadas a partir de uma cultura de células de *Candida utilis* com 1,308 de absorvância. Os valores de pH para o meio com etanol e para a suspensão de células mãe foram 4,00 e 2,71, respectivamente.

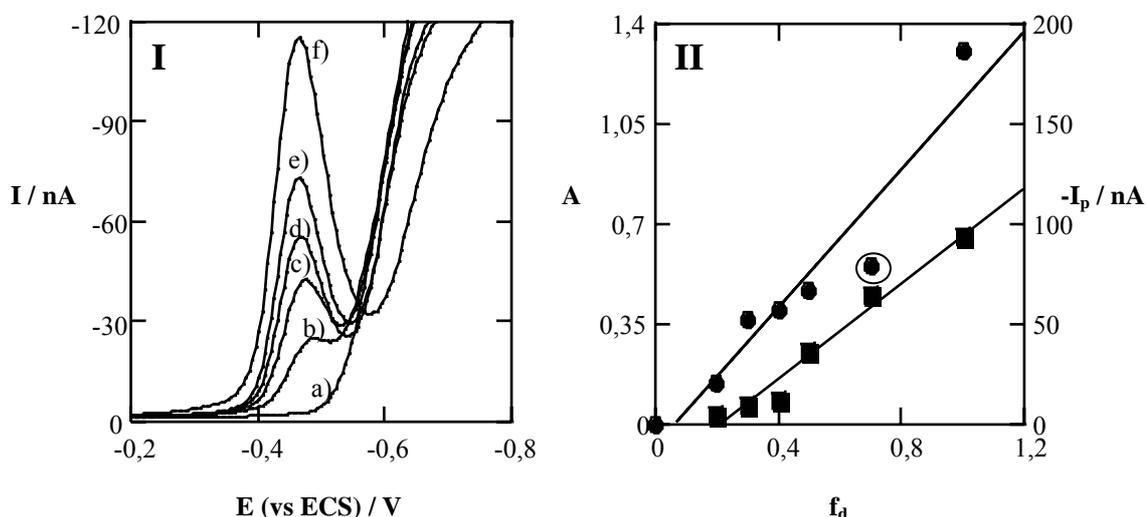


Figura 3.11 – I – Voltamogramas obtidos com o microeléctrodo de platina de 50 μm de diâmetro em suspensões de células de *Candida utilis* crescidas em meio contendo 0,5% de etanol, com diferentes valores de absorvância: a) 0,00; b) 0,367; c) 0,398; d) 0,469; e) 0,553; f) 1,308.

II – Variação da intensidade de corrente de pico (■) e absorvância (●) em função do factor de diluição (f_d) nas suspensões de células da levedura *Candida utilis* em meio contendo 0,5 % de etanol.

Os valores obtidos de intensidade de corrente e de potencial de pico correspondentes aos voltamogramas registados por SWV com dois microeléctrodos de diferentes dimensões apresentam-se na tabela 3.6, onde também se encontram os valores de absorvância correspondentes.

Tabela 3.6 – Absorvância (A), factor de diluição (f_d), intensidade de corrente diferencial (I_p) e potencial de pico (E_p) medidas nas diferentes culturas de células preparadas a partir de uma cultura mãe de *Candida utilis* ($A = 1,308$) em meio contendo 0,5% etanol.

A	f_d	25 μm			50 μm		
		$-I_p$ (nA)	$-E_p$ (mV)	n	$-I_p$ (nA)	$-E_p$ (mV)	n
0,119	$0,1000 \pm 0,0007$	n.d	n.d	–	n.d	n.d	–
0,143	$0,200 \pm 0,001$	$1,8 \pm 0,3$	487 ± 3	4	$4,4 \pm 0,6$	479 ± 0	3
0,367	$0,300 \pm 0,001$	$2,3 \pm 0,7$	482 ± 3	3	10 ± 3	475 ± 0	3
0,398	$0,400 \pm 0,002$	6 ± 2	481 ± 3	3	13 ± 3	473 ± 3	3
0,468	$0,500 \pm 0,002$	11 ± 2	475 ± 0	4	36 ± 4	465 ± 0	3
0,553	$0,700 \pm 0,003$	14 ± 2	476 ± 2	3	64 ± 6	465 ± 4	4
1,308	$1,000 \pm 0,004$	27 ± 2	469 ± 4	5	94 ± 6	467 ± 5	4

n.d – não detectado

Relativamente aos potenciais de pico, verifica-se que estes se descolam para valores mais negativos à medida que a diluição aumenta.

Na figura 3.11-II apresentam-se os valores da intensidade de corrente de pico e da absorvância em função do factor de diluição. A partir da variação dos valores medidos de absorvância e intensidade de corrente de pico em função do factor de diluição determinou-se a recta mais provável, excluindo o ponto 0,0 na regressão linear I_p versus f_d . Os parâmetros estatísticos característicos das rectas de regressão apresentadas na figura 3.11-II apresentam-se na tabela 3.7. Como se pode verificar tanto pelas representações gráficas como pelos valores apresentados na tabela 3.7 as correlações obtidas são piores que as correspondentes em meio K. É de salientar que os dados apresentados se reportam a uma única experiência o que dificulta a interpretação da dispersão observada. Os valores dos limites de detecção e de quantificação expressos em unidades de absorvância, encontram-se apresentados na tabela 3.7.

Tabela 3.7 – Ordenada na origem (a), declive (b), coeficiente de correlação (r), número de pontos experimentais (n) e limites de detecção e quantificação (l.d.d e l.d.q) obtidos no estudo de suspensões de células *Candida utilis* em meio contendo 0,5 % de etanol e determinados a partir das representações na figura 3.11-II.

Técnica	ϕ (μm)	$a \pm ts_a$ (nA)	$b \pm ts_b$ (10^1 nA)	r	n	l.d.d	l.d.q
SWV	25	-6 ± 2	$3,2 \pm 0,5$	0,98	6	0,25	0,44
	50	-25 ± 7	12 ± 2	0,99	6	0,26	0,44
A		$-0,07 \pm 0,10$	$0,12 \pm 0,01$	0,95	7	0,15	0,49

1.2.3. Meio contendo 0,5 % de ácido láctico

Na secção 1.1 deste capítulo demonstrou-se que a resposta voltamétrica dos microelctrodos de platina no meio com 0,5 % de ácido láctico era diferente da obtida nos outros dois meios de cultura. Verificou-se ainda que a intensidade de corrente limite (LSV) e de pico (SWV) características da redução do ácido láctico diminui gradualmente com o crescimento das células de *Candida utilis*.

A estimativa dos limites de detecção, quantificação e linearidade foi efectuada recorrendo a uma curva de calibração construída com base em soluções de ácido láctico em meio mineral.

A solução mais concentrada é idêntica à utilizada na preparação das culturas, sendo nestas circunstâncias medidas as intensidades de corrente mais elevadas. As soluções mais diluídas pretendem simular as culturas de células, onde a concentração de ácido láctico é menor do que a do meio, como consequência da actividade celular.

Os voltamogramas de LSV e de SWV obtidos com microelctrodos de platina estão apresentados na figura 3.12.

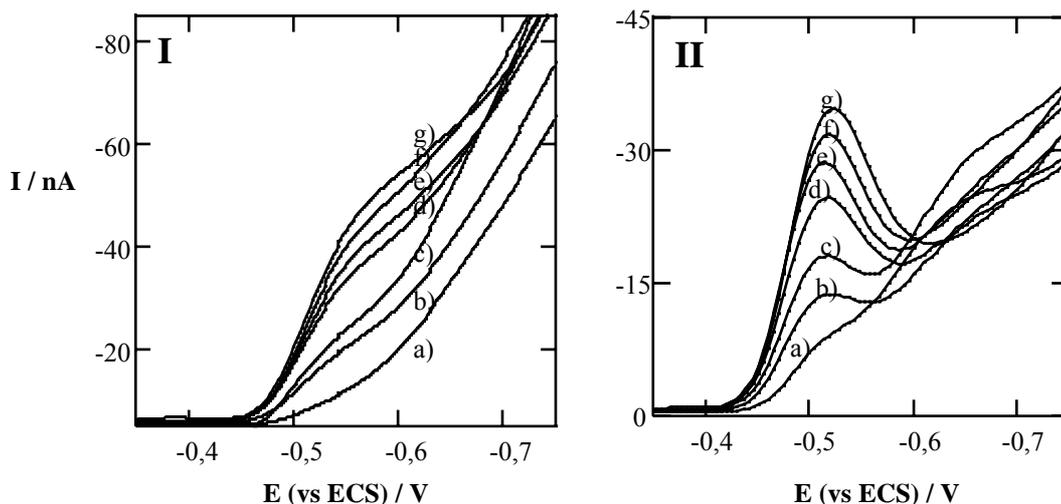


Figura 3.12 – Voltamogramas obtidos por LSV (I) e por SWV (II) com o microelectrodo de platina de 25 μm de diâmetro, em meio mineral com diferentes concentrações de ácido láctico: a) 0,0121; b) 0,0182; c) 0,0242; d) 0,0363; e) 0,0424; f) 0,0484; g) 0,0605 M.

Na tabela 3.8 apresentam-se os valores de intensidade de corrente de limite, potencial de meia onda e diferença $|E_{3/4}-E_{1/4}|$ obtidos na análise dos voltamogramas de LSV com os microelectrodos de 25 e 50 μm de diâmetro.

Tabela 3.8 – Valores de intensidade de corrente limite (I_L), potencial de meia onda ($E_{1/2}$) e $|E_{3/4}-E_{1/4}|$ relativos aos voltamogramas de LSV em estado estacionário obtidos com microelectrodos de 25 μm e 50 μm de diâmetro, em soluções de ácido láctico em meio mineral.

C (M)	25 μm				50 μm			
	$-I_L$ (nA)	$-E_{1/2}$ (mV)	$ E_{3/4}-E_{1/4} $ (mV)	n	$-I_L$ (nA)	$-E_{1/2}$ (mV)	$ E_{3/4}-E_{1/4} $ (mV)	n
0,0182 \pm 0,0001	n. d	n. d	n. d	–	n. d	n. d	n. d	–
0,0242 \pm 0,0002	21 \pm 1	512 \pm 5	44 \pm 9	5	49 \pm 1	508 \pm 2	40 \pm 2	5
0,0303 \pm 0,0002	30 \pm 1	512 \pm 2	46 \pm 3	6	59 \pm 3	507 \pm 1	39 \pm 3	6
0,0363 \pm 0,0002	33 \pm 1	514 \pm 4	48 \pm 6	6	72 \pm 2	506 \pm 1	40 \pm 3	6
0,0424 \pm 0,0003	39 \pm 2	518 \pm 2	52 \pm 2	6	84 \pm 2	509 \pm 1	42 \pm 3	6
0,0484 \pm 0,0003	43 \pm 2	520 \pm 3	52 \pm 6	6	90 \pm 5	511 \pm 2	43 \pm 3	6
0,0544 \pm 0,0003	49 \pm 2	523 \pm 4	54 \pm 6	6	103 \pm 5	517 \pm 4	47 \pm 6	5
0,0605 \pm 0,0003	51 \pm 3	527 \pm 5	61 \pm 8	6	118 \pm 3	519 \pm 3	50 \pm 5	4

n.d – não detectado

Tabela 3.9 – Intensidade de corrente de pico (I_p) e potencial de pico (E_p), relativos aos voltamogramas obtidos por SWV com microelctrodos de 25 μm e 50 μm de diâmetro em soluções de ácido láctico preparadas em meio mineral.

C (M)	pH	25 μm			50 μm		
		- I_p (nA)	- E_p (mV)	n	- I_p (nA)	- E_p (mV)	n
0,00605 \pm 0,00005	3,90	n. d	n.d	–	n. d	n.d	–
0,0121 \pm 0,0001	3,91	2,0 \pm 0,2	502 \pm 5	4	5 \pm 1	501 \pm 3	3
0,0182 \pm 0,0001	3,92	4,2 \pm 0,6	505 \pm 2	5	9 \pm 1	503 \pm 3	4
0,0242 \pm 0,0002	3,92	7,2 \pm 0,7	505 \pm 2	6	19 \pm 2	503 \pm 2	5
0,0303 \pm 0,0002	3,92	12,2 \pm 0,4	507 \pm 3	6	31 \pm 2	504 \pm 0	6
0,0363 \pm 0,0002	3,92	15,4 \pm 0,4	510 \pm 2	6	40 \pm 1	509 \pm 0	6
0,0424 \pm 0,0003	3,92	18 \pm 1	512 \pm 2	6	46 \pm 2	510 \pm 2	6
0,0484 \pm 0,0003	3,92	21,4 \pm 0,9	514 \pm 2	6	55 \pm 3	512 \pm 2	6
0,0544 \pm 0,0003	3,92	25 \pm 1	514 \pm 3	6	63 \pm 3	513 \pm 4	5
0,0605 \pm 0,0003	4,13	25 \pm 1	514 \pm 5	7	69 \pm 3	516 \pm 3	7

n.d – não detectado

O potencial em que ocorre o processo de redução é dependente da concentração, verificando-se um deslocamento dos sinais voltamétricos para valores mais negativos com o aumento da concentração. Por outro lado, a forma e a posição dos voltamogramas obtidos por LSV sofrem variações mais acentuadas quando se utiliza o microelctrodo mais pequeno. Estas observações estão de acordo com o comportamento previsto para a redução electroquímica de ácidos fracos. Este processo envolve uma reacção homogénea acoplada correspondente à ionização do ácido [39, 40 e 58].

A representação gráfica da intensidade de corrente limite, I_L , e da intensidade de corrente de pico, I_p , em função de concentração do ácido encontram-se na figura 3.13.

A definição dos patamares de intensidades de corrente das ondas voltamétricas obtidas por LSV não é muito boa, só sendo possível determinar valores de intensidade de corrente limite para concentrações superiores a 0,0242 M, enquanto que a visualização do pico correspondente em SWV se verifica a concentrações inferiores, 0,012 M. No entanto, através da análise dos gráficos na figura 3.13-II verifica-se que os valores de I_p medidos nas três soluções de menor concentração apresentam um desvio significativo à recta definida a partir dos restantes valores experimentais. A dificuldade em definir as

linhas de base nos voltamogramas de SWV quando a concentração de ácido fraco é baixa está decerto na origem do desvio referido.

A definição dos limites de detecção e de quantificação através da análise estatística das rectas apresentadas na figura 3.13 tem uma validade limitada pois é obtida por extrapolação de resultados obtidos em condições em que a interferência da resposta electroquímica do processo subsequente é menos significativa. Nas condições experimentais testadas e atendendo à figura 3.13 será mais significativo considerar como limite de quantificação uma concentração de aproximadamente 0,027 M.

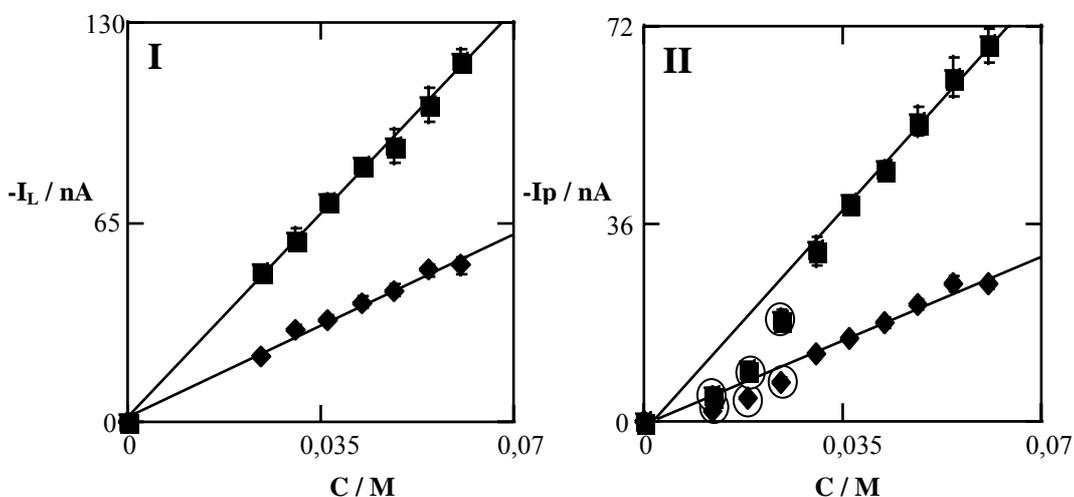


Figura 3.13 – Representação da intensidade de corrente de limite (I) e da intensidade de corrente de pico (II) em função da concentração de ácido láctico obtidas com o microeléctrodo de 25 μm (◆) e de 50 μm (■) de diâmetro.

Tabela 3.10 – Ordenada na origem (a), declive (b), coeficiente de correlação (r), número de pontos experimentais e limites de detecção e de quantificação (l.d.d e l.d.q) obtidos no estudo do meio contendo 0,5 % de ácido láctico e determinados a partir das representações na figura 3.13.

Técnica	ϕ (μm)	$a \pm t s_a$ (nA)	$b \pm t s_b$ (10^1nA/M)	r	n	l.d.d (M)	l.d.q (M)
LSV	25	1 ± 3	87 ± 8	0,996	8	0,003	0,015
	50	2 ± 4	190 ± 10	0,998	8	0,002	0,009
SWV	25	0 ± 2	44 ± 5	0,995	7	0,007	0,020
	50	-8 ± 6	$115,0 \pm 0,8$	0,998	7	0,005	0,013

Como conclusão pode afirmar-se que a voltametria de varrimento linear é a técnica que apresenta limites de detecção e de quantificação mais baixos neste meio. Estes valores, são sempre mais baixos para o microeléctrodo de maior dimensão.

No que respeita à linearidade, verifica-se que tanto no microeléctrodo de maior, como no de menor diâmetro, a linearidade é observada em toda a gama de concentração estudada nas duas técnicas voltamétricas.

1.3. Análise comparativa dos resultados

1.3.1. Efeito da dimensão do microeléctrodo

A comparação entre os resultados obtidos com os dois microeléctrodos pode ser feita a partir dos gráficos de intensidades de corrente normalizada correspondente a um microeléctrodo em função da mesma variável relativa ao outro microeléctrodo.

A intensidade de corrente limite obtida por voltametria de varrimento linear em estado estacionário foi normalizada pelo diâmetro dos microeléctrodos, uma vez que é directamente proporcional a esta grandeza. Na tabela 3.11 estão apresentadas as intensidades de corrente limite normalizadas, calculadas a partir dos resultados na tabela 3.2.

A comparação das respostas voltamétricas dos dois microeléctrodos foi também efectuada a partir dos voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada. Neste caso, a normalização das intensidades de corrente foi efectuada relativamente a um dos pares ordenados representados (43,06 nA, 119,8 nA). Os valores das intensidades de corrente pico normalizadas encontram-se apresentados na tabela 3.11 e foram calculados a partir dos resultados experimentais apresentados na tabela 3.1 obtidos com suspensões de células crescidas em meio K.

Tabela 3.11 – Intensidades de corrente limite normalizadas (I_{LN}) e intensidades de corrente de pico normalizadas (I_{pN}) obtidas em suspensões de células de *Candida utilis* crescidas em meio K, relativas aos microelctrodos de 25 e 50 μm de diâmetro. Os valores experimentais usados encontram-se nas tabelas 3.1 e 3.2.

$-I_{LN25}$ (mA m^{-1})	$-I_{LN25}$ (mA m^{-1})	I_{pN25}	I_{pN50}
$0,57 \pm 0,02$	n.d	$0,071 \pm 0,008$	n.d
$1,04 \pm 0,02$	$0,992 \pm 0,005$	$0,33 \pm 0,01$	$0,290 \pm 0,009$
$1,87 \pm 0,01$	$1,97 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,01$	$0,637 \pm 0,005$
$2,63 \pm 0,07$	$2,83 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,03$ ($-I_p = 43,06 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,02$ ($-I_p = 119,8 \text{ nA}$)
$3,77 \pm 0,05$	$3,83 \pm 0,08$	$1,29 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,02$
$4,8 \pm 0,1$	$5,07 \pm 0,07$	$1,71 \pm 0,07$	$1,83 \pm 0,01$
$5,97 \pm 0,05$	$6,283 \pm 0,005$	$2,01 \pm 0,04$	$2,10 \pm 0,02$
$6,9 \pm 0,1$	$7,22 \pm 0,07$	$2,35 \pm 0,03$	$2,48 \pm 0,03$
$8,2 \pm 0,1$	$8,6 \pm 0,1$	$2,5 \pm 0,1$	$2,77 \pm 0,04$
$9,5 \pm 0,1$	$9,82 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,1$	$3,23 \pm 0,03$
$9,69 \pm 0,05$	$10,2 \pm 0,1$	$2,87 \pm 0,08$	$3,22 \pm 0,08$

n.d – não detectado

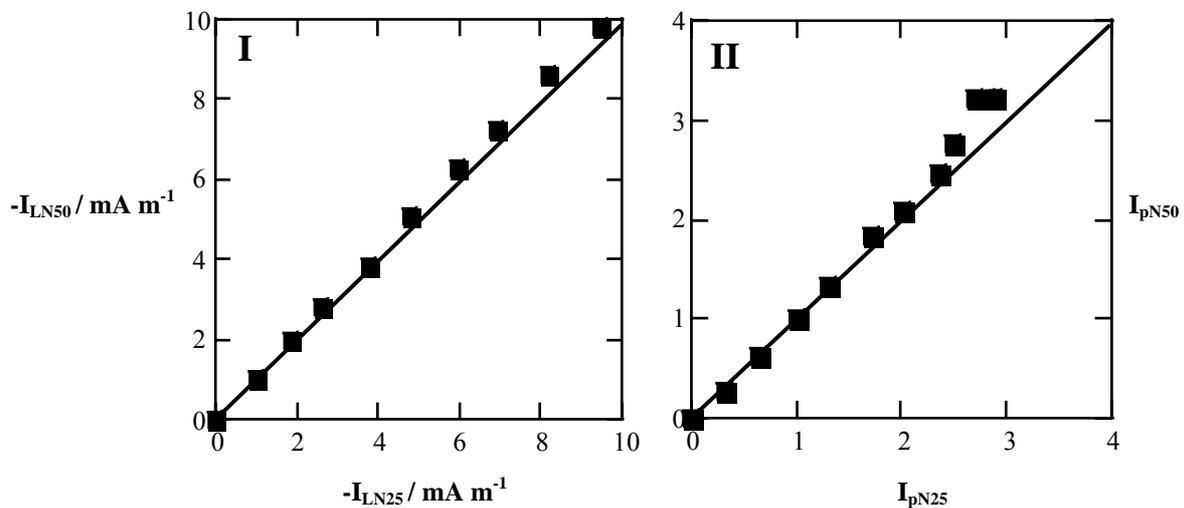


Figura 3.14 – Representação gráfica da intensidade de corrente limite normalizada para o diâmetro do microelctrodo (I) e da intensidade de corrente de pico normalizada para um par ordenado, relativo ao microelctrodo de 50 μm (II), em função da correspondente grandeza relativa ao microelctrodo de 25 μm . As rectas traçadas correspondem a $x = y$. Os valores da intensidade de corrente limite e de pico foram obtidos no estudo das suspensões de células de *Candida utilis* em meio K (tabelas 3.1 e 3.2).

Na figura 3.14 encontram-se os gráficos correspondentes à análise da equivalência dos microelétrodos utilizados.

Em ambas as técnicas consideradas verifica-se um pequeno desvio dos pontos à recta traçada correspondente a $x = y$, que marca a equivalência dos resultados. Este desvio é mais significativo nos resultados obtidos por voltametria de onda quadrada, para os três últimos pontos representados, que correspondem a intensidades de corrente de pico superiores 101,19 nA e 297,10 nA obtidas nos microelétrodos de 25 e 50 μm , respectivamente. Este desvio apesar de menos significativo é também observado nos resultados de voltametria de varrimento linear. Em ambos casos se verifica que os valores de intensidades de corrente obtidos com o microeléctrodo de 25 μm são inferiores aos relativos ao microeléctrodo de 50 μm . Este facto deverá relacionar-se com o mecanismo do processo de redução dos ácidos fracos. O ácido fraco molecular difunde-se até ao eléctrodo onde se ioniza. Quanto mais elevada for a velocidade de transporte de massa para o eléctrodo, relativamente à velocidade da reacção de ionização acoplada menor será a concentração de H^+ à superfície do microeléctrodo e consequentemente menor a respectiva intensidades de corrente. A velocidade de transporte de massa para os microeléctrodos é inversamente proporcional ao seu raio [60], o que justifica a menor intensidade de corrente normalizada obtida nestes eléctrodos.

Os resultados obtidos em meio com etanol correspondem a um único ensaio e apresentam uma dispersão bastante elevada, como se pode verificar na figura 3.11-II, assim, não foram usados em análises posteriores.

Na figura 3.15 encontram-se representadas as intensidades de corrente de pico e limite, normalizadas, obtidas em suspensões de células de *Candida utilis* em meio contendo ácido láctico. Os resultados representados foram calculados a partir dos apresentados nas tabelas 3.8 e 3.9. As rectas traçadas correspondem à situação de equivalência dos resultados, i.e., à recta $x = y$.

Em ambas as técnicas voltamétricas verifica-se a concordância entre todos os pontos experimentais, com excepção do relativo à concentração mais elevada de ácido láctico 0,0605 M. Efectivamente, na representação das intensidades de corrente (I_p e I_L) em função de concentração de ácido láctico (figura 3.13) é possível verificar que o aumento do sinal electroquímico, registado nos microeléctrodos de 25 μm , não acompanha a variação da concentração entre 0,0544 e 0,0605 M. Ainda que estes pontos

experimentais não apresentem um desvio significativo nos traçados dos gráficos da figura 3.13, na figura 3.15 o afastamento à recta que traduz a equivalência dos métodos é bem visível. Este afastamento surge devido à intensidade de corrente medida no microeléctrodo de 25 μm não acompanhar a intensidade de corrente correspondente ao microeléctrodo de 50 μm .

Tabela 3.12 – Intensidade de corrente de limite normalizada obtida por LSV e intensidade de corrente de pico normalizada obtida por SWV em soluções de ácido láctico, relativas aos microeléctrodos de 25 e 50 μm . Os valores experimentais usados encontram-se nas tabelas 3.8 e 3.9.

$-I_{LN25}$ (mA m^{-1})	$-I_{LN50}$ (mA m^{-1})	I_{pN25}	I_{pN50}
$0,85 \pm 0,04$	$0,98 \pm 0,03$	$0,15 \pm 0,04$	$0,16 \pm 0,02$
$1,19 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,07$	$0,30 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,05$
$1,33 \pm 0,05$	$1,44 \pm 0,04$	$0,60 \pm 0,05$	$0,59 \pm 0,06$
$1,56 \pm 0,07$	$1,67 \pm 0,03$	$1,00 \pm 0,08$ ($-I_p = 12,2 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,03$ ($-I_p = 31,08 \text{ nA}$)
$1,71 \pm 0,08$	$1,79 \pm 0,1$	$1,29 \pm 0,03$	$1,26 \pm 0,03$
$1,97 \pm 0,08$	$2,1 \pm 0,1$	$1,48 \pm 0,05$	$1,47 \pm 0,07$
$2,04 \pm 0,08$	$2,35 \pm 0,07$	$1,76 \pm 0,09$	$1,75 \pm 0,07$
		$2,01 \pm 0,1$	$2,07 \pm 0,1$
		$2,20 \pm 0,1$	$2,06 \pm 0,08$

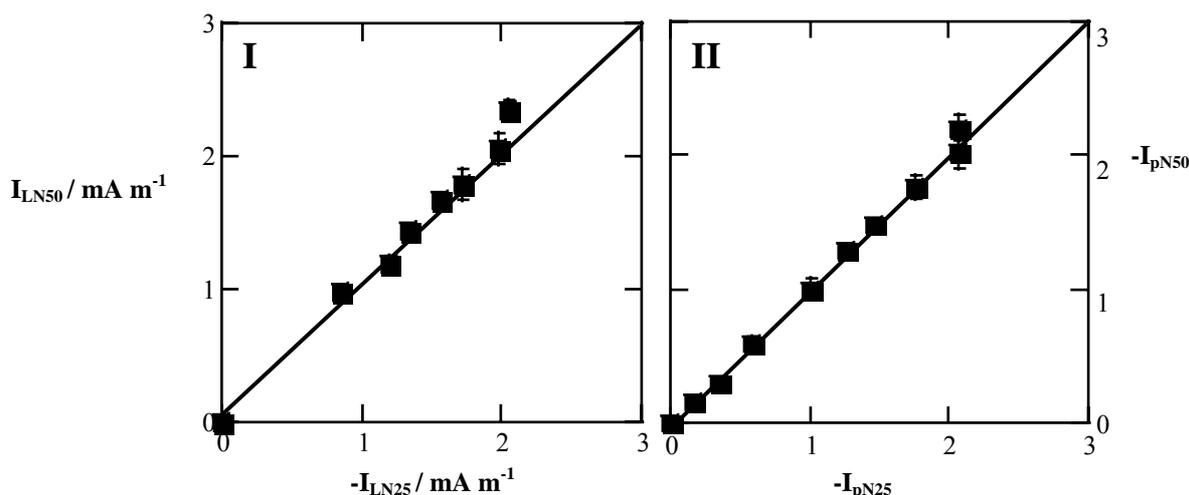


Figura 3.15 – Comparação dos resultados obtidos em soluções de ácido láctico, com os microeléctrodos de 25 e 50 μm de diâmetro, por LSV (I) e por SWV (II).

1.3.2. Voltametria de varrimento linear *versus* voltametria de onda quadrada

Para verificar a equivalência entre as duas técnicas voltamétricas foram efectuadas representações da intensidade de corrente de pico normalizada em função da intensidade de corrente limite normalizada.

As intensidades de corrente foram normalizadas por um dos pontos experimentais. Para o microeléctrodo de 25 μm utilizou-se o par (65,87 nA; 43,06 nA) e para o de 50 μm (141,13 nA; 120,0 nA). Os resultados utilizados neste estudo foram obtidos na experiência em que uma suspensão de células de *Candida utilis* crescidas em meio K foi diluída com meio K e foram apresentados nas tabelas 3.1 e 3.2.

Tabela 3.13 – Intensidade de corrente limite e intensidade de corrente de pico normalizadas, obtidas com os microeléctrodos de 25 e 50 μm de diâmetro, em suspensões de células de *Candida utilis* em meio K.

I_{LN25}	I_{LN50}	I_{pN25}	I_{pN50}
0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
$0,215 \pm 0,008$	n.d	$0,071 \pm 0,007$	n.d
$0,393 \pm 0,008$	$0,351 \pm 0,001$	$0,328 \pm 0,008$	$0,290 \pm 0,009$
$0,710 \pm 0,004$	$0,699 \pm 0,007$	$0,647 \pm 0,01$	$0,637 \pm 0,006$
$1,000 \pm 0,03$ ($-I_L = 65,87 \text{ nA}$)	$1,000 \pm 0,006$ ($I_L = 143,13 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,03$ ($-I_p = 43,06 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,02$ ($-I_p = 120,0 \text{ nA}$)
$1,43 \pm 0,02$	$1,36 \pm 0,03$	$1,30 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,02$
$1,81 \pm 0,04$	$1,80 \pm 0,03$	$1,71 \pm 0,07$	$1,84 \pm 0,01$
$2,27 \pm 0,02$	$2,226 \pm 0,001$	$2,01 \pm 0,04$	$2,10 \pm 0,02$
$2,63 \pm 0,04$	$2,56 \pm 0,02$	$2,35 \pm 0,03$	$2,48 \pm 0,03$
$3,11 \pm 0,05$	$3,04 \pm 0,03$	$2,5 \pm 0,1$	$2,77 \pm 0,04$
$3,60 \pm 0,03$	$3,48 \pm 0,01$	$2,7 \pm 0,1$	$3,23 \pm 0,03$
$3,68 \pm 0,02$	$3,62 \pm 0,04$	$2,87 \pm 0,08$	$3,23 \pm 0,08$

n.d – não detectado

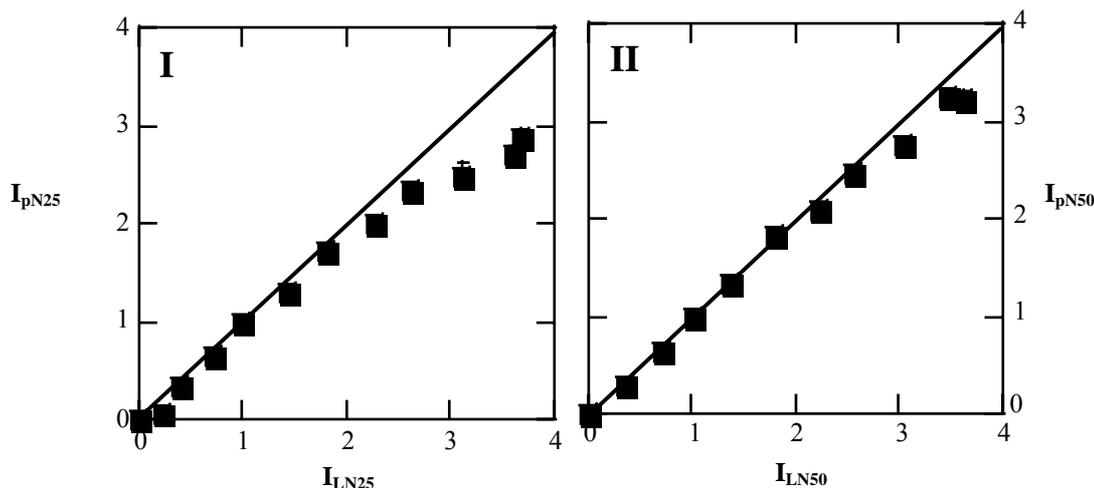


Figura 3.16 – Representação gráfica da intensidade de corrente de pico normalizada obtida por SWV em função da intensidade de corrente limite normalizada obtida por LSV com o microeléctrodo de 25 μm (I) e 50 μm (II) de diâmetro em suspensões de células de *Candida utilis* em meio k

Os valores representados encontram-se na tabela 3.13 e foram obtidos em suspensões de *Candida utilis* em meio K. Em ambos os gráficos (figura 3.16) correspondentes à análise da equivalência entre as técnicas voltamétricas verifica-se que as intensidades de corrente obtidas por SWV são inferiores ao obtido por LSV, sensivelmente para I_{LN25} superiores a duas unidades. No entanto, no caso do microeléctrodo de 50 μm os desvios dos pontos experimentais à recta que representa a equivalência entre as técnicas, são inferiores aos verificados com o microeléctrodo de 25 μm .

Nos resultados obtidos em soluções de ácido láctico os pontos utilizados para a normalização foram (29,83 nA; 12,20 nA) e (59,45 nA; 31,08 nA) para os microeléctrodos de 25 e 50 μm , respectivamente. Os valores obtidos da normalização e representados na figura 3.17 apresentam-se na tabela 3.14.

Na figura 3.17, verifica-se que a intensidade de corrente obtida por SWV é superior à obtida por LSV, com excepção do primeiro ponto, independentemente do tamanho do eléctrodo. Este comportamento é oposto ao verificado nos estudos efectuados em suspensões da *Candida utilis* em meio k.

A diferença entre os resultados, comparados na figura 3.17, obtidos pelas duas técnicas voltamétricas, prende-se com o mecanismo da redução dos ácidos fracos (mecanismo CE). O facto das técnicas voltamétricas terem sido usadas em bases de tempo diferentes implica diferentes intensidades de corrente relativas a cada técnica.

Esta situação é diferente da apresentada na figura 3.16, em que os estudos foram realizados em suspensões de células. As leveduras ao metabolizarem a glucose (meio k) podem excretar para o meio, ácidos de natureza diferente, apresentado valores de potencial diferente. No caso de LSV, como os sinais voltamétricos apresentam uma forma de uma onda sigmoideal, a presença dos ácidos contribui de uma forma aditiva para a intensidade de corrente limite. Em oposição no caso de SWV, em que a resposta apresenta a forma de um pico, o valor de intensidade de corrente de pico é afectado de forma diferente de acordo com a proximidade dos potenciais de redução das espécies diferentes. A adição algébrica dos valores das intensidades (I_p) só ocorre quando os seus potenciais (E_p) são coincidentes.

Tabela 3.14 – Intensidade de corrente limite e intensidade de corrente de pico normalizadas obtidas com os microelétrodos de 25 e 50 μm em soluções de ácido láctico. Os valores experimentais encontram-se na tabela 3.8 e 3.9.

I_{LN25}	I_{LN50}	I_{pN25}	I_{pN50}
0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
n.d	n.d	$0,16 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,04$
n.d	n.d	$0,34 \pm 0,05$	$0,30 \pm 0,03$
$0,71 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,02$	$0,59 \pm 0,06$	$0,60 \pm 0,05$
$1,00 \pm 0,05$ ($-I_L = 29,83 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,06$ ($-I_L = 59,45 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,03$ ($-I_p = 12,20 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,08$ ($-I_p = 31,08 \text{ nA}$)
$1,12 \pm 0,05$	$1,21 \pm 0,04$	$1,26 \pm 0,03$	$1,29 \pm 0,03$
$1,31 \pm 0,06$	$1,41 \pm 0,03$	$1,47 \pm 0,07$	$1,48 \pm 0,05$
$1,44 \pm 0,07$	$1,51 \pm 0,09$	$1,75 \pm 0,07$	$1,76 \pm 0,09$
$1,65 \pm 0,07$	$1,73 \pm 0,09$	$2,1 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,1$
$1,71 \pm 0,09$	$1,98 \pm 0,06$	$2,06 \pm 0,09$	$2,21 \pm 0,09$

n.d – não detectado

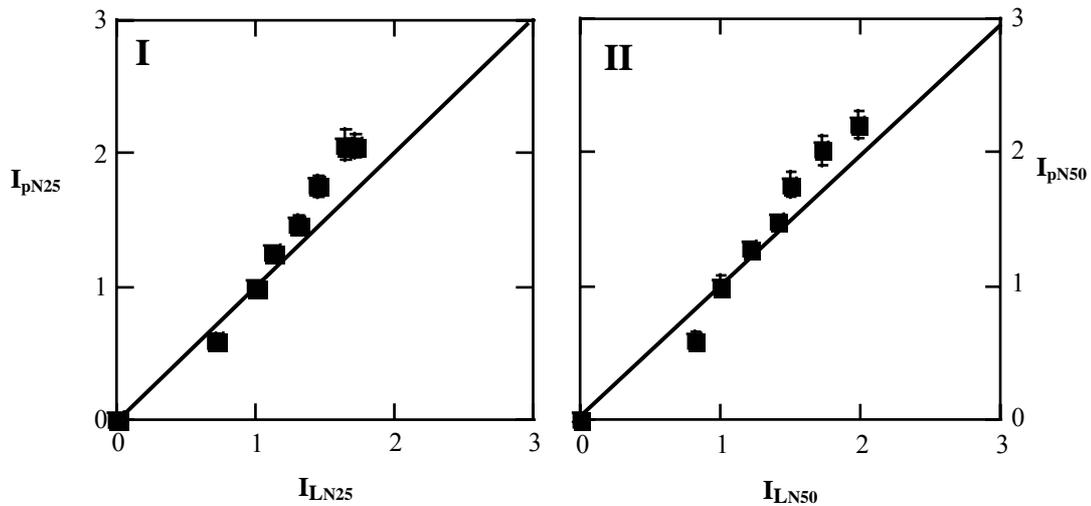


Figura 3.17 – Representação gráfica da intensidade de corrente de pico normalizada obtida por SWV em função da intensidade de corrente limite normalizada obtida por LSV com o microeléctrodo de 25 μm (I) e 50 μm (II) de diâmetro em soluções de ácido láctico.

1.3.3. Métodos voltamétricos *versus* método turbidimétrico

A equivalência dos métodos pode ser averiguada no estudo dos meios de cultura através da análise dos sinais obtidos nas mesmas suspensões. Os valores medidos com as diferentes técnicas foram normalizados para um dos valores obtidos experimentalmente. A sua representação recíproca distribuir-se-á ao longo da recta $y = x$ quando os métodos apresentarem distribuição idêntica. Na figura 3.18 representam-se os valores de intensidade de corrente de pico normalizada em função da absorvância normalizada e a recta de equivalência $y = x$. Os valores representados encontram-se na tabela 3.15. Com base na representação gráfica pode-se concluir que a diluição provoca uma atenuação nos valores de absorvância idêntica à seguida pelos valores de intensidade de corrente em toda a gama de resultados experimentais quando se utiliza o eléctrodo de maiores dimensões ($\phi = 50 \mu\text{m}$). Os resultados obtidos com o microeléctrodo de 25 μm começam a apresentar desvios à recta $y = x$ para valores de absorvância normalizada na ordem de 2,8, o que corresponde a uma absorvância próxima de 2,4.

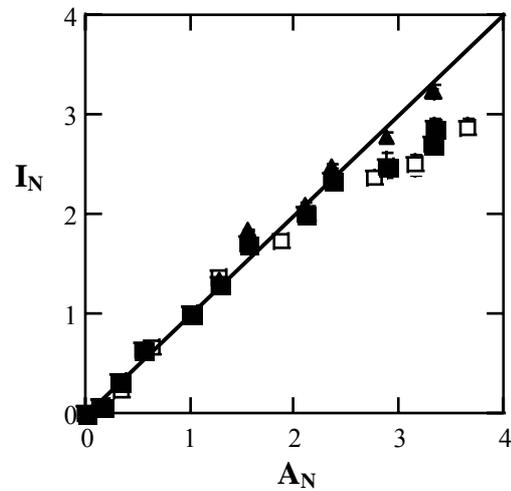


Figura 3.18 – Variação da intensidade de corrente de pico normalizada em função da absorvância normalizada: Resultados obtidos em duas experiências; II – com microeléctrodo de 25 μm (■) (A_{ref} ; I_{pref}) = (1,205; 43,06 nA) e de 50 μm (▲) (A_{ref} ; I_{pref}) = (1,205; 119,80 nA) e II – com o microeléctrodo de 25 μm (□) (A_{ref} ; I_{pref}) = (0,877; 39,18 nA) em meio K.

Tabela 3.15 – Absorvância normalizada (A_N), intensidade de corrente de pico normalizada (I_{pN}), para os microeléctrodos de 25 e 50 μm de diâmetro obtidas em suspensões de células de *Candida utilis*, em meio K.

Experiência I			Experiência II	
A_N	$I_{\text{pN}25}$	$I_{\text{pN}50}$	A_N	$I_{\text{pN}25}$
0,0	0 ± 0	0 ± 0	0,0	0 ± 0
0,161	$0,072 \pm 0,008$	n.d	0,145	$0,059 \pm 0,003$
0,312	$0,328 \pm 0,008$	$0,290 \pm 0,009$	0,333	$0,231 \pm 0,01$
0,547	$0,65 \pm 0,01$	$0,637 \pm 0,006$	0,641	$0,66 \pm 0,01$
1,000 ($A = 1,205$)	$1,00 \pm 0,03$ ($-I_{\text{p}} = 43,06 \text{ nA}$)	$1,00 \pm 0,02$ ($-I_{\text{p}} = 119,8 \text{ nA}$)	1,000 ($A = 0,877$)	$1,00 \pm 0,03$ ($-I_{\text{p}} = 39,18 \text{ nA}$)
1,289	$1,30 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,02$	1,282	$1,37 \pm 0,03$
1,546	$1,71 \pm 0,07$	$1,84 \pm 0,01$	1,869	$1,72 \pm 0,06$
2,098	$2,01 \pm 0,04$	$2,10 \pm 0,01$	2,119	$2,00 \pm 0,08$
2,359	$2,35 \pm 0,03$	$2,48 \pm 0,03$	2,767	$2,35 \pm 0,07$
2,877	$2,5 \pm 0,1$	$2,78 \pm 0,04$	3,162	$2,5 \pm 0,1$
3,310	$2,7 \pm 0,1$	$3,23 \pm 0,03$	3,658	$2,87 \pm 0,07$
3,328	$2,87 \pm 0,08$	$3,23 \pm 0,08$	4,536	$3,17 \pm 0,06$

n.d – não detectado

A equivalência entre os métodos óptico e voltamétrico em suspensões de células de *Candida utilis* em meio contendo ácido láctico foi também estudada. A experiência efectuada para este estudo consistiu na adição de diferentes volumes da solução do meio a um volume fixo de suspensão de células.

Quando se representa a intensidade de corrente de pico obtida com um microeléctrodo de 25 μm em função da absorvância obtida nas suspensões de células verifica-se que a intensidade de corrente diminui à medida que aumenta a absorvância (figura 3.19).

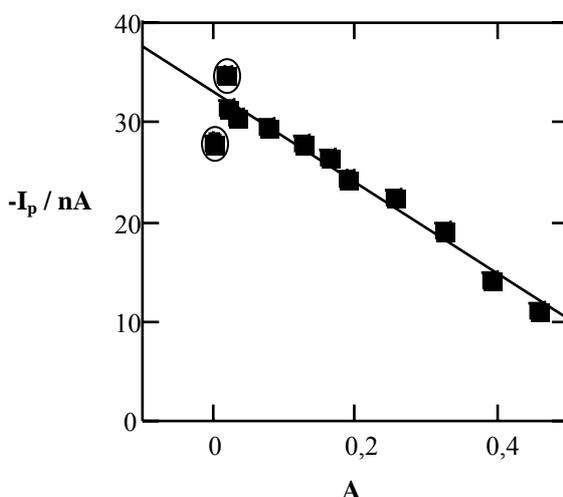


Figura 3.19 – Variação da intensidade de corrente de pico em função da absorvância obtidas em suspensões de células de *Candida utilis* em meio contendo ácido láctico com o microeléctrodo de 25 μm de diâmetro.

A comparação entre as variações dos sinais óptico e electroquímico através de uma representação idêntica à apresentada na figura 3.18 requer um tratamento prévio dos resultados devido a não existir uma proporcionalidade directa entre as medidas de absorvância e de intensidade de corrente. Aos valores experimentais de intensidade de corrente de pico foi subtraído o valor da intensidade de corrente de pico (I_{p0}) determinado por extrapolação na representação da figura 3.19. Os valores da intensidade de corrente de pico corrigidos, $I_p - I_{p0}$ denominado por ΔI e de absorvância foram normalizados por um dos pares ordenados (A , ΔI) e estão apresentados na tabela 3.16.

Na figura 3.20 apresenta-se a correlação existente entre os valores de ΔI e de absorvância normalizados, assim como a recta $x = y$. Observa-se uma boa correlação entre os resultados, com excepção dos resultados obtidos no meio de cultura e a

correspondente à suspensão de células mais diluída ($A = 0,016$). Nestas soluções a concentração de ácido láctico é muito elevada e as intensidades de corrente são muito próximas do limite de linearidade observado através da curva de calibração do ácido fraco para o microeléctrodo de $25 \mu\text{m}$, na figura 3.13.

Tabela 3.16 – Absorvância (A), intensidade de corrente de pico (I_p), intensidade de corrente de pico corrigida (ΔI), absorvância normalizada (A_N) e intensidade de corrente de pico corrigida normalizada (ΔI_N) obtidos em suspensões de células de *Candida utilis* em meio contendo ácido láctico.

A	$-I_p$ (nA)	ΔI (nA)	A_N	ΔI_N
0,458	$11,1 \pm 0,4$	$21,9 \pm 0,6$	2,411	$2,55 \pm 0,07$
0,392	$14,2 \pm 0,6$	$18,8 \pm 0,8$	2,063	$2,18 \pm 0,09$
0,326	$19,1 \pm 0,3$	$13,9 \pm 0,6$	1,716	$1,62 \pm 0,07$
0,254	$22,6 \pm 0,4$	$10,4 \pm 0,6$	1,337	$1,21 \pm 0,07$
0,190	$24,4 \pm 0,8$	$8,6 \pm 0,9$	1,000	$1,0 \pm 0,1$
0,163	$26,5 \pm 0,4$	$6,5 \pm 0,6$	0,858	$0,76 \pm 0,07$
0,124	$28,0 \pm 0,3$	$5,0 \pm 0,6$	0,652	$0,58 \pm 0,07$
0,077	$29,5 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,7$	0,405	$0,41 \pm 0,08$
0,034	$30,5 \pm 0,4$	$2,5 \pm 0,6$	0,179	$0,29 \pm 0,07$
0,021	$31,4 \pm 0,4$	$1,6 \pm 0,6$	0,110	$0,19 \pm 0,07$
0,016	$34,8 \pm 0,7$	$-1,8 \pm 0,9$	0,084	$-0,2 \pm 0,1$
0,000	$27,9 \pm 0,9$	-5 ± 1	0,000	$-0,6 \pm 0,1$

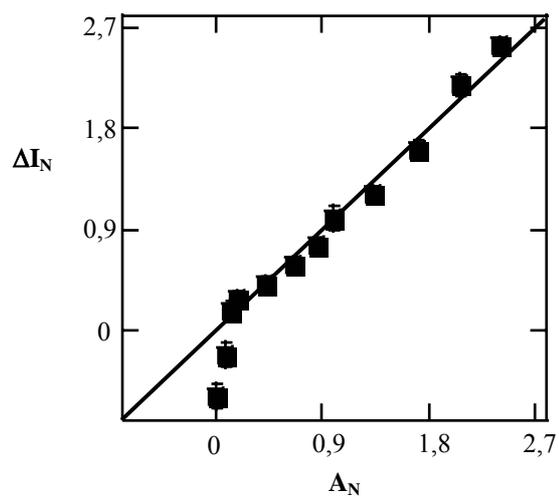


Figura 3.20 – Variação da intensidade de corrente de pico corrigida normalizada obtida com microeléctrodo de 25 μm de diâmetro em função da absorvância normalizada.

2. Análise voltamétrica de culturas de células ao longo do tempo

Na secção anterior foram apresentados os resultados da análise voltamétrica de suspensões de células da levedura *Candida utilis* em diferentes meios de cultura. Os estudos efectuados com os microelctrodos de diâmetros diferentes, demonstraram que os resultados são equivalentes no intervalo de linearidade das suas respostas. Os resultados obtidos através das duas técnicas voltamétricas também demonstraram ser equivalentes.

Nesta secção apresentam-se os estudos voltamétricos em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* nos meios anteriormente caracterizados. As condições experimentais, quando se fazem medições em culturas de células ao longo do tempo, são diferentes das condições utilizadas nos estudos nos meios e nas suspensões de células. O crescimento das culturas das duas leveduras foi seguido pelas duas técnicas (LSV e SWV) e com os dois microelctrodos, de forma a verificar se os resultados são equivalentes nestas condições experimentais.

2.1. Meio K

Os voltamogramas apresentados na figura 3.21 foram obtidos em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* ao longo do tempo. O tempo zero corresponde ao tempo em que é efectuada a primeira medida na cultura, meia hora após se ter ajustado a cultura às condições iniciais pretendidas. Em ambas as culturas é possível observar-se o aparecimento de um sinal a um potencial de meia onda de ≈ -460 mV (*versus* ECS) que aumentou com o tempo de cultivo das células.

As medidas de absorvância efectuadas nas mesmas amostras apresentaram um aumento gradual, conforme se observa na tabela 3.17, que é característico do aumento do número de células dispersas no meio. No intervalo de tempo considerado neste estudo é

possível verificar que a variação dos valores obtidos não é constante, o que é típico do crescimento microbiano. Os valores de absorvância, relativos a uma cultura de *Candida utilis* apresentados na tabela 3.17 aumentam gradualmente até um tempo de 11,25 horas, variando apenas uma décima em absorvância no tempo seguinte. Um comportamento semelhante observado na cultura de *Saccharomyces cerevisiae*, estabilizando a absorvância para um tempo de 12,67 horas, no tempo seguinte o valor de absorvância é igual ao valor correspondente a um tempo de 11,58 horas.

Os valores de pH da cultura de *Candida utilis* diminuem ao longo do tempo de crescimento enquanto que os valores de absorvância aumentam, estabilizando simultaneamente à absorvância. Os valores de pH obtidos na cultura de *Saccharomyces cerevisiae* também apresentaram uma diminuição ao longo do tempo, tendendo a estabilizar para um tempo de cerca de nove horas.

A intensidade de corrente só foi mensurável para tempos superiores a duas horas ($A = 0,194$) na cultura de *Candida utilis*. Um limite de detecção comparável foi verificado na cultura de *Saccharomyces cerevisiae* a um tempo de 1,92 horas ($A = 0,149$).

Em ambas as culturas se observou um aumento da intensidade de corrente, verificando-se um aumento menos acentuado nos dois últimos tempos medidos nas culturas de *Candida utilis* e para tempos superiores a 10 horas em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*. Nesta cultura verificou-se uma ligeira diminuição da intensidade de corrente limite para tempo igual a 9,33 horas.

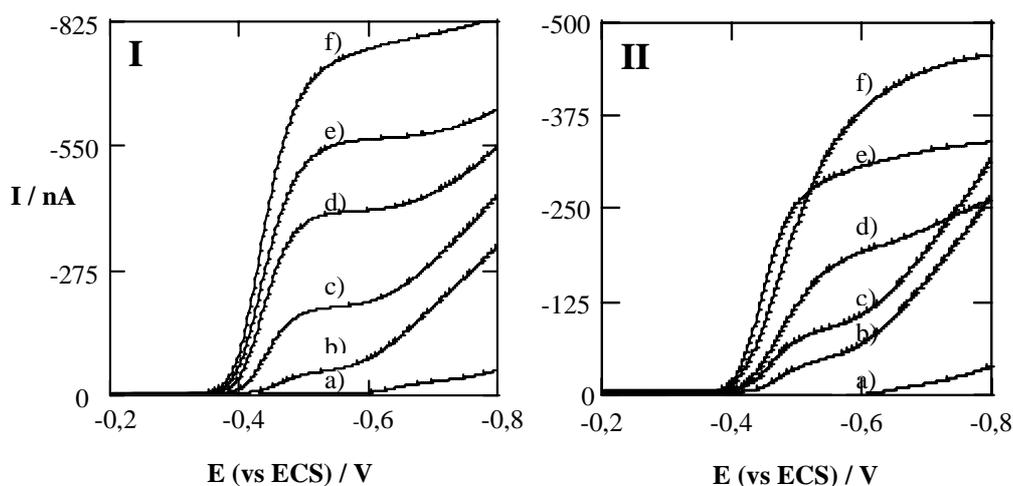


Figura 3.21 – Voltamogramas obtidos por LSV com o microeléctrodo de 50 μm de diâmetro no crescimento em meio K de *Candida utilis* (I) em diferentes tempos de crescimento: a) 0,00; b) 1,17; c) 5,50; d) 7,77; e) 8,83 e f) 12,50 horas e de *Saccharomyces cerevisiae* (II): a) 0,00; b) 1,92; c) 4,00; d) 6,08; e) 7,25 e f) 9,33 horas.

Tabela 3.17 – Tempo de crescimento (t), absorvância (A), intensidade de corrente limite (I_L), pH obtidos em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K. Os valores médios referem-se a seis réplicas efectuadas por voltametria de varrimento linear com o microeléctrodo de 50 μm de diâmetro.

<i>Candida utilis</i>				<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>			
t (h)	A	$-I_L$ (nA)	pH	t (h)	A	$-I_L$ (nA)	pH
0,00	0,092	n.d	3,85	0,00	0,065	n.d	3,76
1,17	0,137	n.d	3,70	0,92	0,092	n.d	3,61
2,25	0,194	43 \pm 5	3,40	1,92	0,149	38 \pm 4	3,32
3,50	0,347	86 \pm 2	3,13	2,92	0,222	60 \pm 1	3,13
4,50	0,523	122 \pm 3	2,93	4,00	0,328	77 \pm 5	2,93
5,50	0,678	191 \pm 2	2,73	5,00	0,469	138 \pm 4	2,73
6,58	1,221	289 \pm 4	2,55	6,08	0,638	191 \pm 11	2,53
7,67	1,884	405 \pm 2	2,37	7,25	1,183	326 \pm 8	2,40
8,83	2,474	570 \pm 4	2,21	8,33	1,686	405 \pm 11	2,33
10,08	3,468	687 \pm 6	2,12	9,33	1,936	373 \pm 17	2,30
11,25	3,665	739 \pm 4	2,10	10,41	2,045	436 \pm 10	2,30
12,50	3,768	777 \pm 8	2,08	11,58	2,219	431 \pm 13	2,29
				12,67	2,159	450 \pm 25	2,30
				13,67	2,219	480 \pm 21	2,29

n.d – não detectado

As curvas de crescimento definidas a partir dos resultados voltamétricos, por LSV, são muito semelhantes às correspondentes à representação da absorvância em função do tempo nas duas espécies de leveduras estudadas. As curvas de crescimento apresentadas na figura 3.22, são relativas às medidas de turbidimetria, para cada uma das leveduras *Candida utilis* (figura 3.22-I) e *Saccharomyces cerevisiae* (figura 3.22-II). Para identificar a fase exponencial efectuou-se a representação semi-logarítmica da absorvância em função do tempo de crescimento. A região na qual existe uma dependência linear corresponde à fase exponencial, apresentada a sombreado na figura 3.22.

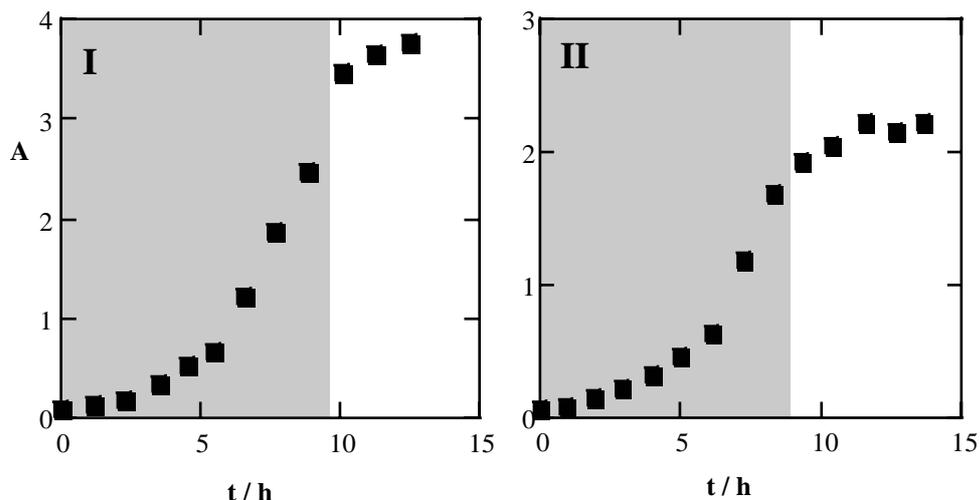


Figura 3.22 – Curvas de crescimento das culturas de leveduras de *Candida utilis* (I) e *Saccharomyces cerevisiae* (II) em meio K obtidas por turbidimetria. O intervalo a sombreado corresponde à região de crescimento exponencial.

As curvas de crescimento, definidas através de medidas voltamétricas, são obtidas por representação gráfica da intensidade de corrente limite ou de pico em função do tempo de crescimento e apresentam uma forma sigmoideal semelhante às obtidas por turbidimetria.

Os pontos experimentais apresentados na zona sombreada da figura 3.23 correspondem ao intervalo de tempo de crescimento exponencial, identificado através da relação linear entre o logaritmo da intensidade de corrente em função do tempo de crescimento.

A fase de crescimento exponencial, para as duas leveduras, definida por ambos os métodos é coincidente, verificando-se apenas que os primeiros valores de intensidade de corrente detectados não são mensuráveis.

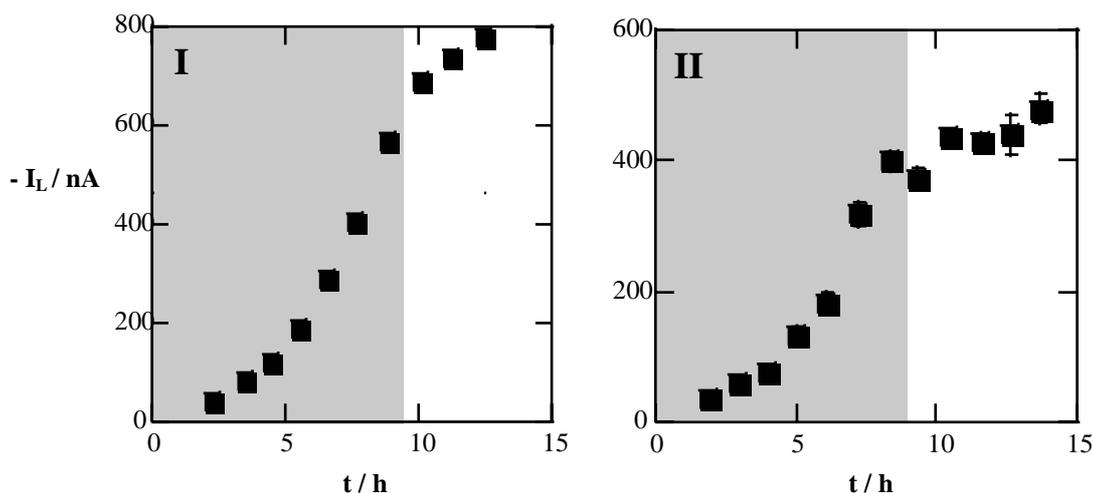


Figura 3.23 – Curvas de crescimento de culturas de leveduras de *Candida utilis* (I) e *Saccharomyces cerevisiae* (II) em meio K obtidas por voltametria de varrimento linear com um microelétrodo de 50 μm . O intervalo a sombreado corresponde à região de crescimento exponencial.

Os resultados obtidos por voltametria de varrimento linear em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K são semelhantes aos obtidos por turbidimetria na avaliação do crescimento microbiano.

A equivalência das técnicas na avaliação do crescimento microbiano pode ser analisada através da comparação dos sinais obtidos nas culturas de células ao longo do tempo. Os valores obtidos pelas duas técnicas foram normalizados para um dos pontos experimentais, a sua representação recíproca encontra-se representada na figura 3.24. Os valores da intensidade de corrente limite em função da absorvância normalizada distribuem-se ao longo da recta $y = x$, traduzindo a equivalência dos valores obtidos pelos dois métodos. Os valores representados encontram-se na tabela 3.18.

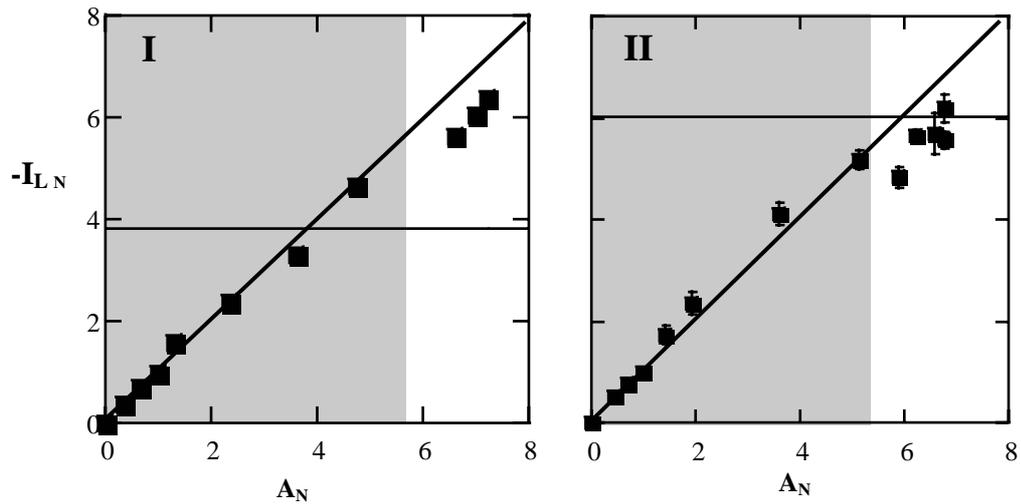


Figura 3.24 – Intensidade de corrente limite normalizada em função da absorvância normalizada. Os resultados foram obtidos com o microeléctrodo de 50 μm de diâmetro em culturas de leveduras de *Candida utilis* (I) e *Saccharomyces cerevisiae* (II) em meio K (Os valores estão apresentados na tabela 3.18). Na região a sombreado estão representados os valores obtidos na zona de crescimento exponencial da cultura. A recta traçada, $y = x$, traduz a equivalência das grandezas representadas.

Os valores medidos desde o início das experiências demonstram ser analiticamente equivalentes, observando-se desvios à recta $y = x$ para valores de absorvância normalizada superiores a 4,732 (figura 3.24-I), o que corresponde a uma absorvância de 2,475 em culturas de células da levedura *Candida utilis* em meio K. Na fase exponencial do crescimento desta levedura verifica-se que todos os pontos apresentam um bom ajuste à recta. O traço horizontal ($y = \text{constante}$) apresentado na figura 3.24-I, representa o limite de linearidade determinado para a técnica de LSV, em experiências de diluição, na secção 1.2.1 deste capítulo. Na figura 3.24-I quatro pontos foram medidos acima do limite de linearidade estimado.

Na figura 3.24-II observa-se que os desvios à recta $y = x$ são verificados para valores de absorvância normalizada na ordem de 5,1, correspondente a uma absorvância de 1,7 em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*. Os pontos representados, relativamente a culturas de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio K encontram-se todos, com excepção do último, abaixo do limite de linearidade. O valor considerado de limite de linearidade foi o obtido em suspensões de células de *Candida utilis* em meio K, uma vez que na gama de absorvância estudada em suspensões de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio K não foi possível determinar este valor.

Tabela 3.18 – Absorvância normalizada (A_N), intensidade de corrente limite normalizada (I_{LN}) obtida com o microelctrodo de 50 μm de diâmetro em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K. Os valores experimentais encontram-se na tabela 3.17. Os valores a sombreado foram os utilizados na normalização.

<i>Candida utilis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
A_N	I_{LN}	A_N	I_{LN}
0,000	0 ± 0	0,000	0 ± 0
0,175	n.d	0,198	n.d
0,261	n.d	0,279	n.d
0,371	$0,35 \pm 0,04$	0,454	$0,50 \pm 0,05$
0,663	$0,70 \pm 0,01$	0,677	$0,77 \pm 0,02$
1,000 ($A = 0,523$)	$1,00 \pm 0,02$ ($-I_L = 122,18 \text{ nA}$)	1,000 ($A = 0,328$)	$1,00 \pm 0,06$ ($-I_L = 77,37 \text{ nA}$)
1,296	$1,56 \pm 0,02$	1,430	$1,7 \pm 0,2$
2,334	$2,37 \pm 0,04$	1,947	$2,4 \pm 0,2$
3,603	$3,32 \pm 0,02$	3,607	$4,1 \pm 0,2$
4,732	$4,66 \pm 0,03$	5,142	$5,2 \pm 0,2$
6,632	$5,63 \pm 0,05$	5,905	$4,8 \pm 0,2$
7,010	$6,05 \pm 0,03$	6,236	$5,6 \pm 0,1$
7,205	$6,36 \pm 0,07$	6,766	$5,6 \pm 0,2$
		6,584	$5,7 \pm 0,4$
		6,766	$6,2 \pm 0,3$

n.d – não detectado

A relação entre o sinal voltamétrico e a concentração do ião hidrogénio foi analisada a partir do gráfico em que se representa a intensidade de corrente limite normalizada em função da concentração do ião hidrogénio normalizada (figura 3.25). Os resultados experimentais foram obtidos em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K com o microelctrodo de 50 μm e estão apresentados na tabela 3.17. Na tabela 3.20 estão apresentados os pontos representados na figura 3.25.

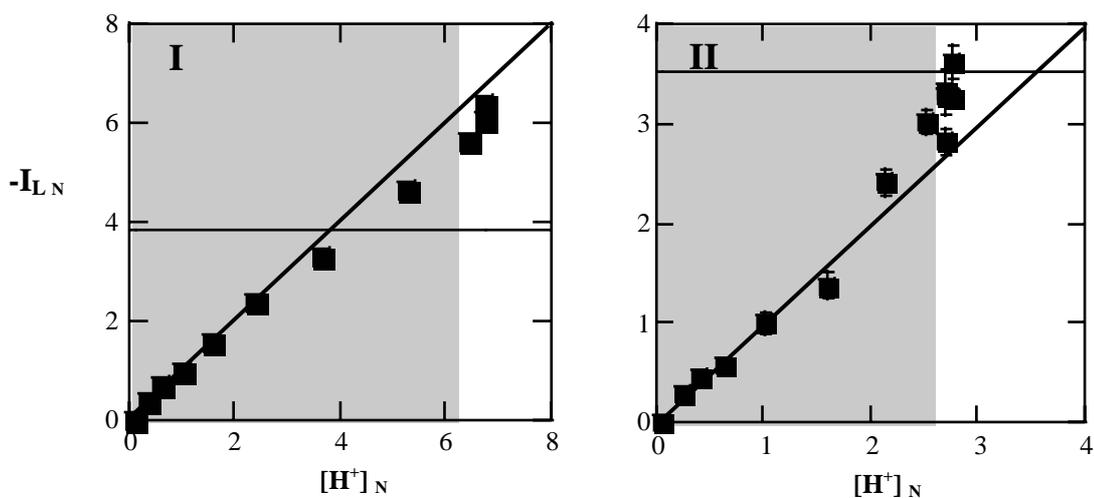


Figura 3.25 – Intensidade de corrente limite normalizada em função da concentração de H^+ normalizada. Os resultados foram obtidos com o microeléctrodo de $50 \mu\text{m}$ de diâmetro em culturas de: I – *Candida utilis* e II – *Saccharomyces cerevisiae* em meio K (os valores estão apresentados na tabela 3.17). Na região a sombreado estão representados os valores obtidos na zona de crescimento exponencial da cultura. A recta traçada, $y = x$, traduz a equivalência das grandezas representadas

Na figura 3.25-I, relativa a uma cultura de *Candida utilis*, observa um bom ajuste entre as grandezas representadas para valores de intensidade de corrente limite normalizados abaixo do limite de linearidade. Acima deste valor observa-se um desvio à recta representada. No caso da cultura de *Saccharomyces cerevisiae* apenas um ponto se encontra acima do limite linearidade. No entanto verifica-se um afastamento à recta que é traduzido por um aumento mais rápido da intensidade de corrente, relativamente à medida potenciométrica.

Tabela 3.19 – Concentração de H^+ normalizada e intensidade de corrente limite normalizada. Os pontos experimentais foram obtidos em culturas de células da levedura *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K (apresentados na tabela 3.17).

<i>Candida utilis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
$[H^+]_N$	$I_{L,N}$	$[H^+]_N$	$I_{L,N}$
0,079	0 ± 0	0,050	0 ± 0
0,120	n.d	0,093	n.d
0,170	n.d	0,132	n.d
0,339	$0,35 \pm 0,04$	0,257	$0,29 \pm 0,03$
0,631	$0,70 \pm 0,01$	0,399	$0,451 \pm 0,009$
1,000	$1,00 \pm 0,02$	0,632	$0,58 \pm 0,04$
$[H^+] = 0,0012$	$-I_L = 122,18 \text{ nA}$	1,000	$1,0 \pm 0,1$
1,585	$1,56 \pm 0,02$	$[H^+] = 0,0019$	$-I_L = 132,57 \text{ nA}$
2,399	$2,37 \pm 0,04$	1,587	$1,4 \pm 0,1$
3,631	$3,32 \pm 0,02$	2,140	$2,4 \pm 0,1$
5,248	$4,66 \pm 0,03$	2,515	$3,0 \pm 0,1$
6,457	$5,63 \pm 0,05$	2,695	$2,8 \pm 0,1$
6,761	$6,05 \pm 0,03$	2,695	$3,29 \pm 0,08$
6,761	$6,36 \pm 0,07$	2,757	$3,3 \pm 0,1$
		2,695	$3,3 \pm 0,2$
		2,7573	$3,6 \pm 0,2$

n.d - não detectado

Para se relacionar a concentração do ião hidrogénio e a medida de absorvância nas culturas de células foram efectuados gráficos nos quais se representaram as duas medidas normalizadas. Os valores de concentração do ião hidrogénio e de absorvância obtidos nas culturas de ambas as leveduras em meio K foram normalizados para um dos pontos experimentais. Na figura 3.26 representa-se a concentração de H^+ normalizada em função da absorvância normalizada, os valores utilizados para esta representação encontram-se na tabela 3.20.

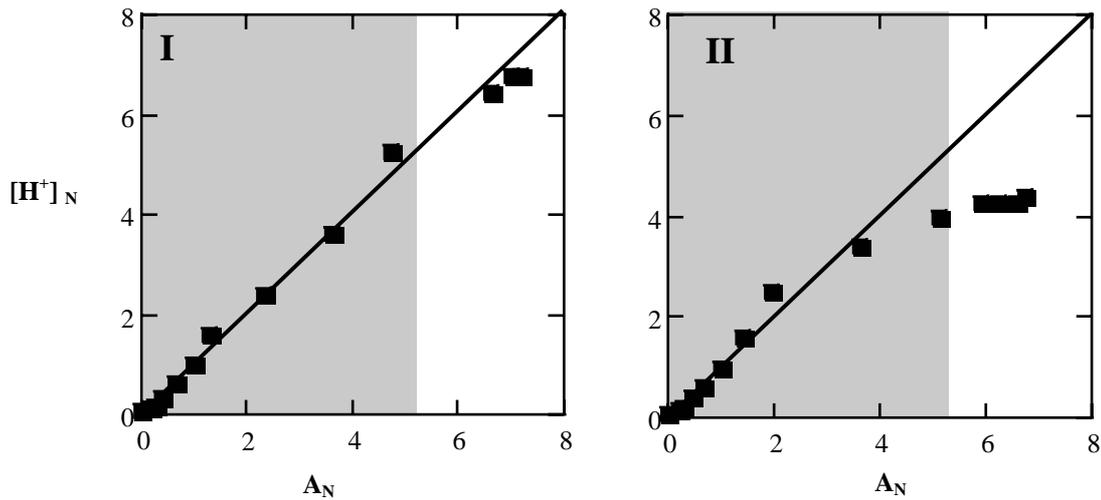


Figura 3.26 – Concentração de H^+ normalizada em função da absorvância normalizada. Os resultados foram obtidos em culturas de leveduras de: I – *Candida utilis* e II – *Saccharomyces cerevisiae* em meio K (os valores estão apresentados na tabela 3.19). Na região a sombreado estão representados os valores obtidos na zona de crescimento exponencial da cultura. A recta traçada, $y = x$, traduz a equivalência das grandezas representadas.

Na figura 3.26-I verifica-se uns pequenos desvios à recta $y = x$ a partir de valores de absorvância normalizada 4,732, o que corresponde a um valor de absorvância 2,475 obtido em culturas de *Candida utilis* em meio K.

Em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* (figura 3.26-II) os desvios à recta são verificados para valores de absorvância normalizada superiores a 3,607 ($A = 1,183$).

Nesta representação, os desvios à recta são verificados para valores mais baixos do que na representação da intensidade de corrente limite normalizada em função da absorvância normalizada para culturas de *Candida utilis*. Este desvio significativo, sugere que o crescimento desta espécie, acompanhado por acidificação do meio, não pode ser avaliado por potenciometria, para valores de absorvância normalizada superior a quatro valores.

Na figura 3.26 pode-se ainda observar uma equivalência mais evidente entre a concentração do ião hidrogénio e a absorvância na avaliação do crescimento de *Candida utilis* em meio K (figura 3.26-I) do que em culturas de *Saccharomyces cerevisiae* neste meio de cultura.

Tabela 3.20 – Concentração de H^+ normalizada e absorvância normalizada. Os pontos experimentais foram obtidos em culturas de células da levedura *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K (valores apresentados na tabela 3.17).

<i>Candida utilis</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
$[H^+]_N$	A_N	$[H^+]_N$	A_N
0,079	0,000	0,080	0,000
0,120	0,175	0,149	0,198
0,170	0,261	0,210	0,279
0,339	0,371	0,409	0,454
0,631	0,663	0,634	0,677
1,000 ($[H^+] = 0,0012\text{ M}$)	1,000 ($A = 0,523$)	1,000 ($[H^+] = 0,0012\text{ M}$)	1,000 ($A = 0,328$)
1,585	1,296	1,592	1,430
2,399	2,334	2,522	1,947
3,631	3,603	3,403	3,607
5,248	4,732	3,998	5,142
6,457	6,632	4,284	5,905
6,761	7,010	4,284	6,236
6,761	7,205	4,383	6,766
		4,284	6,584
		4,383	6,766

Como se pode observar anteriormente as curvas de crescimento obtidas, por voltametria, das duas leveduras neste meio são semelhantes às obtidas por turbidimetria, observando-se apenas um pequeno desvio nas últimas horas de crescimento na espécie *Saccharomyces cerevisiae*. A determinação da taxa específica de crescimento pode ser feita a partir do declive da recta que relaciona a logaritmo da absorvância, em função do tempo na fase exponencial de crescimento. Uma representação análoga utilizando as intensidades de corrente de pico/limite obtidas através dos métodos voltamétricos deverá conduzir a resultados semelhantes. Estes valores foram determinados utilizando os resultados obtidos com os microelctrodos de diâmetros diferentes, através duas técnicas voltamétricas, para além dos relativos à turbidimetria.

A representação semi-logarítmica da absorvância em função do tempo para a *Candida utilis* está apresentada na figura 3.27-I, assim como a variação semi-logarítmica da intensidade de corrente obtida por SWV em função do tempo de crescimento. Os valores estão apresentados na tabela 3.21.

Tabela 3.21 – Valores do logaritmo da absorvância ($\ln A$) e da intensidade de corrente de pico ($\ln (-I_p)$) e tempo de crescimento (t) em culturas de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K.

<i>Candida utilis</i>			<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
t (h)	$\ln A$	$\ln (-I_p / nA)$	t (h)	$\ln A$	$\ln (-I_p / nA)$
0,00	-2,514	n.d	0,00	-2,733	n.d
1,00	-2,176	n.d	0,92	-2,391	1,58 ± 0,01*
1,58	-1,947	n.d	1,92	-1,906	2,0 ± 0,1*
2,33	-1,787	n.d	2,92	-1,506	2,3 ± 0,2
3,08	-1,473	1,9 ± 0,2*	4,00	-1,115	2,8 ± 0,1
3,92	-1,143	1,9 ± 0,3*	5,00	-0,758	3,0 ± 0,1
4,58	-0,894	2,9 ± 0,2	6,08	-0,449	3,8 ± 0,1
5,25	-0,648	3,22 ± 0,08	7,25	-0,168	4,00 ± 0,08
5,83	-0,478	3,3 ± 0,1	8,33	-0,522	4,27 ± 0,09
6,33	-0,358	3,6 ± 0,2	9,33	-0,661	4,37 ± 0,07
6,83	0,037	3,7 ± 0,1	10,41	0,715	4,04 ± 0,09
7,42	0,291	4,06 ± 0,03	11,58	0,780	4,02 ± 0,03
8,08	0,522	4,2 ± 0,1	12,67	0,780	4,04 ± 0,08
8,67	0,661	4,37 ± 0,08	13,67	0,780	4,04 ± 0,09
9,50	0,879	4,58 ± 0,08			
10,50	1,102	4,6 ± 0,1			
11,33	1,251	4,74 ± 0,06			
12,33	1,416	4,8 ± 0,1			
13,17	1,437	4,60 ± 0,08			
13,83	1,436	4,84 ± 0,07			

n.d – não detectado

* – inferior ao l.d.q

A zona sombreada na tabela 3.21 representa a fase exponencial do crescimento de cada uma das leveduras obtidas por turbidimetria e voltametria de onda quadrada. Para cada levedura verifica-se que a fase exponencial é coincidente, em ambas as técnicas, para os pontos correspondentes a valores de intensidade de corrente superiores ao limite de quantificação e inferiores ao limite de linearidade.

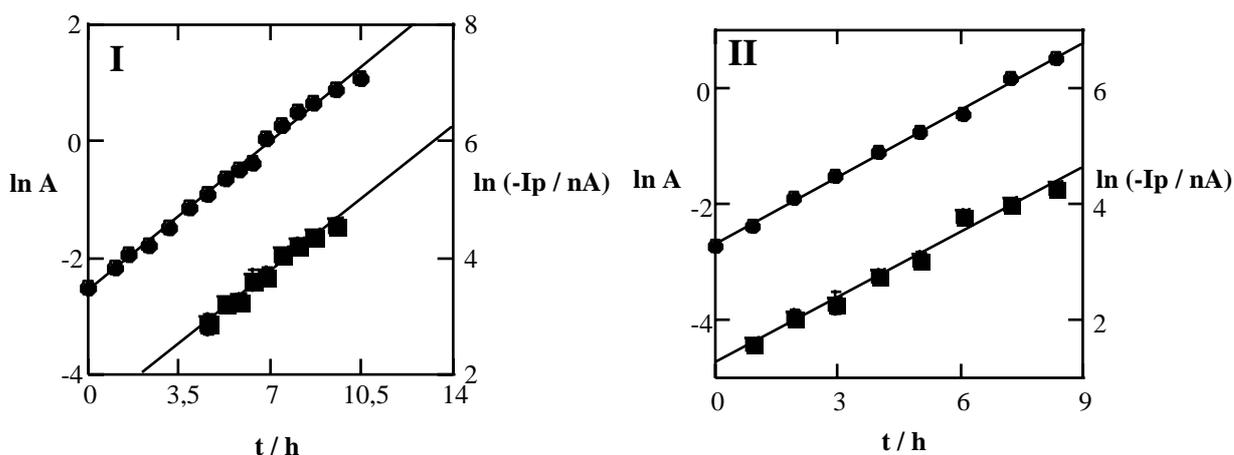


Figura 3.27 – Representação semi-logarítmica dos valores de absorvância (●) e de intensidade de corrente de pico (■) obtida com o microeléctrodo de 25 μm em função do tempo de crescimento, relativos a culturas de: I – *Candida utilis* e II – *Saccharomyces cerevisiae* em meio K.

Os valores utilizados para a representação gráfica da figura 3.27 apresentam-se na tabela 3.21. Na figura 3.27-I, verifica-se que a relação entre o $\ln A$ e o tempo é uma dependência linear em todo o intervalo de tempo considerado, isto é, na fase exponencial do crescimento da *Candida utilis*. Na representação de $\ln(-I_p)$ versus tempo, observa-se também um bom ajuste dos pontos experimentais às rectas de regressão. A equação de cada recta está apresentada na tabela 3.22, assim como os respectivos coeficientes de correlação.

O crescimento da *Candida utilis* em meio K avaliado com os microeléctrodos de 25 50 μm permitiu estimar as taxas de crescimento da levedura. A partir da tabela 3.22, pode-se atestar que o valor da taxa específica de crescimento da *Candida utilis*, determinado por SWV é independente do tamanho do eléctrodo utilizado e semelhante ao obtido por turbidimetria.

Tabela 3.22 – Valores da ordenada na origem (a), do declive (b) e coeficiente de correlação da representação semi-logarítmica das intensidades de corrente de pico (SWV) e limite (LSV) e da absorvância em função do tempo em culturas da levedura *Candida utilis* em meio K determinados a partir das representações apresentadas na figura 3.27-I.

		Técnica	$a \pm ts_a$	$b \pm ts_b$ (h^{-1})	r	n
Exp. 1	SWV	($\phi = 25 \mu m$)	$1,3 \pm 0,3$	$0,36 \pm 0,04$	0,99	9
		($\phi = 50 \mu m$)	$2,2 \pm 0,4$	$0,37 \pm 0,05$	0,98	9
	A	$-2,55 \pm 0,09$	$0,36 \pm 0,02$	0,997	16	
Exp. 2	LSV	($\phi = 25 \mu m$)	$2,4 \pm 0,2$	$0,37 \pm 0,03$	0,998	7
		($\phi = 50 \mu m$)	$3,0 \pm 0,3$	$0,39 \pm 0,05$	0,995	7
	A	$-2,4 \pm 0,1$	$0,39 \pm 0,02$	0,998	9	

Pode-se assim concluir que a taxa específica de crescimento desta levedura em meio K, pode ser determinada por ambas as técnicas voltamétricas sendo os valores obtidos independentes do tamanho de eléctrodo e comparáveis às obtidas por turbidimetria tanto em valor numérico como em precisão.

Na figura 3.27-II encontram-se os valores da absorvância e intensidade de corrente de pico em função do tempo, numa representação semi-logarítmica na fase exponencial da *Saccharomyces cerevisiae* em meio K. Os valores experimentais estão apresentados na tabela 3.21. Verifica-se que os pontos experimentais relativos a $\ln(-I_p)$ e a $\ln A$, se distribuem linearmente em função do tempo. O declive das rectas representadas é uma medida da taxa de crescimento. Representações idênticas são obtidas com os valores de intensidade de corrente limite obtidos com os dois microeléctrodos em LSV.

Tabela 3.23 – Valores da ordenada na origem (a), do declive (b) e coeficiente de correlação da representação semi-logarítmica das intensidades de corrente de pico (SWV) e limite (LSV) e da absorvância em função do tempo em culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio K determinados a partir das representações apresentados na figura 3.27-II.

		Técnica	$a \pm ts_a$	$b \pm ts_b$ (h^{-1})	r	n
SWV	($\phi = 25 \mu m$)		$1,3 \pm 0,2$	$0,38 \pm 0,04$	0,993	8
	($\phi = 50 \mu m$)		$1,9 \pm 0,4$	$0,44 \pm 0,06$	0,99	8
LSV	($\phi = 25 \mu m$)		$2,3 \pm 0,2$	$0,37 \pm 0,04$	0,996	7
	($\phi = 50 \mu m$)		$3,0 \pm 0,2$	$0,38 \pm 0,04$	0,996	7
A			$-2,70 \pm 0,09$	$0,39 \pm 0,02$	0,999	9

As taxas de crescimento estimadas através das duas técnicas voltamétricas, com os dois microelctrodos são semelhantes à obtida por turbidimetria conforme se pode verificar pelos valores na tabela 3.23.

É de referir que os resultados obtidos por LSV apresentam uma melhor correlação do que os relativos à voltametria de onda quadrada.

2.2. Meio contendo etanol 0,5%

Os voltamogramas apresentados na figura 3.28 foram obtidos por voltametria de onda quadrada em culturas de células da levedura *Candida utilis*, em meio contendo etanol, ao longo do tempo. Nestas culturas foi possível observar-se o aparecimento de um sinal a um potencial de pico aproximadamente igual a -470 mV (*versus* ECS) que aumentou com o tempo. Nas mesmas amostras foram efectuadas medidas de absorvância, que apresentam uma variação semelhante ao longo do tempo, como se pode verificar pelos valores apresentados na tabela 3.24. A intensidade de corrente foi apenas mensurável para valores de absorvância igual ou superiores a 0,119. O pH da cultura sofreu um decréscimo ao longo do tempo de crescimento da levedura *Candida utilis* em meio contendo etanol.

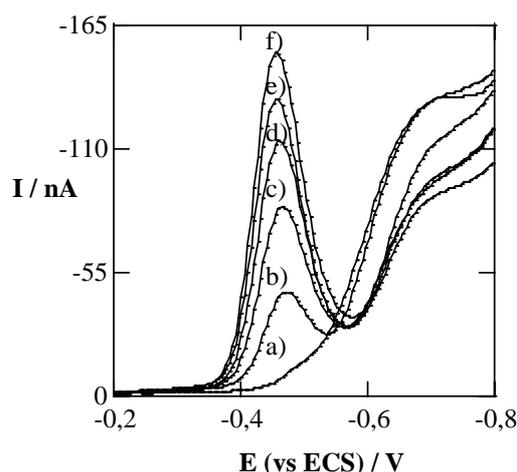


Figura 3.28 – Voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada com o microelctrodo de 50 μm de diâmetro no crescimento de *Candida utilis* em meio etanol 0,5% a diferentes tempos: a) 0,00; b) 5,08; c) 9,08; d) 10,08; e) 11,08 e f) 13,00 horas.

Tabela 3.24 –Tempo de crescimento (t), absorvância (A), pH e intensidade de corrente de pico média (I_p) obtida com o microeléctrodo de 50 μm relativa a um número de réplicas (n) em culturas de células de *Candida utilis* em meio contendo etanol 0,5%.

t (h)	A	pH	-I_p (nA)	n
0,00	0,076	3,86	n.d	
1,17	0,119	3,74	$2,9 \pm 0,4$	3
2,17	0,143	3,62	$3,3 \pm 0,7$	5
3,00	0,194	3,50	6 ± 1	5
4,08	0,284	3,34	17 ± 2	3
5,08	0,367	3,25	31 ± 4	4
6,08	0,420	3,17	31 ± 2	4
7,08	0,523	3,09	48 ± 4	6
8,08	0,620	3,02	60 ± 4	6
9,08	0,806	2,96	64 ± 5	5
10,08	1,003	2,89	93 ± 4	4
11,08	1,146	2,83	107 ± 9	4
12,00	1,338	2,78	118 ± 8	5
13,00	1,505	2,71	137 ± 9	6

n.d – não detectado

Na curva de crescimento obtida pela representação gráfica da absorvância em função do tempo (figura 3.29-I) pode-se definir a fase exponencial, a sombreado, à qual correspondem os pontos experimentais obtidos no intervalo de tempo de 1,16 a 10,08 horas.

A curva de crescimento obtida por voltametria de onda quadrada com o microeléctrodo de 50 μm apresenta uma forma muito semelhante à definida a partir das medidas de absorvância (figura 3.29-II). A fase exponencial é verificada um pouco mais tarde que na curva de crescimento através de turbidimetria, estando definida no intervalo de tempo de crescimento de 4,08 a 11,08 horas.

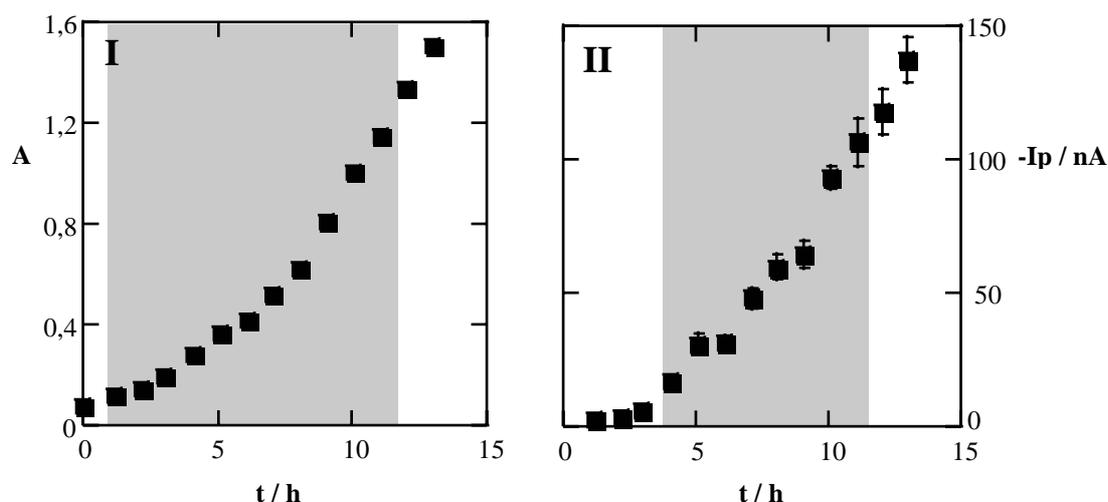


Figura 3.29 – Curvas de crescimento da levedura *Candida utilis*, em meio contendo etanol, obtidas por turbidimetria (I) e voltametria de onda quadrada SWV com o microeléctrodo de 50 μm (II) de diâmetro. O intervalo a sombreado corresponde à região de crescimento exponencial.

Este estudo da levedura *Candida utilis*, em meio contendo etanol mostrou que as técnicas voltamétricas podem ser aplicadas na avaliação do crescimento microbiano no meio de cultura com etanol.

O estudo da equivalência dos resultados obtidos pelas técnicas voltamétrica e turbidimétrica foi efectuado com base na representação gráfica da intensidade de corrente de pico, obtida por SWV, normalizada em função da absorvância normalizada. Os valores de intensidade de corrente e de absorvância obtidos ao longo do tempo de crescimento foram normalizados para um dos pontos experimentais. Estes valores distribuem-se ao longo da recta $y = x$, como se pode observar na figura 3.30-I. Na tabela 3.25 estão apresentados os valores utilizados para a representação gráfica da figura 3.30-I.

Com o mesmo tipo de representação também se estudou a equivalência entre as medidas por turbidimetria e a concentração de H^+ nas culturas de células. Na figura 3.30-II apresenta-se a absorvância normalizada em função da concentração do ião hidrogénio normalizada. Os valores de absorvância e concentração do ião hidrogénio foram normalizados para um dos pontos experimentais, os valores representados encontram-se na tabela 3.25.

Tabela 3.25 – Absorvância normalizada (A_N), intensidade de corrente pico normalizada (I_{pN}) obtida com o microeléctrodo de 50 μm , concentração do ião hidrogénio normalizada ($[\text{H}^+]_N$) em culturas de células de *Candida utilis* em meio contendo etanol. Os valores experimentais encontram-se tabela 3.24.

A_N	I_{pN}	A_N	$[\text{H}^+]_N$
0,000	0 ± 0	0,000	0,108
0,122	n.d	0,145	0,167
0,192	$0,049 \pm 0,006$	0,228	0,220
0,230	$0,06 \pm 0,01$	0,273	0,292
0,313	$0,10 \pm 0,02$	0,371	0,386
0,458	$0,29 \pm 0,03$	0,543	0,557
0,591	$0,51 \pm 0,06$	0,701	0,687
0,678	$0,53 \pm 0,04$	0,804	0,818
0,843	$0,81 \pm 0,06$	1,000	1,000
1,000	$1,00 \pm 0,08$	($A = 0,528$)	($[\text{H}^+] = 0,0008 \text{ M}$)
($A = 0,620$)	($-I_p = 59,55 \text{ nA}$)	1,186	1,164
1,300	$1,08 \pm 0,08$	1,541	1,327
1,619	$1,57 \pm 0,07$	1,919	1,556
1,849	$1,8 \pm 0,1$	2,192	1,762
2,159	$2,0 \pm 0,1$	2,559	2,013
2,429	$2,3 \pm 0,1$	2,879	2,349

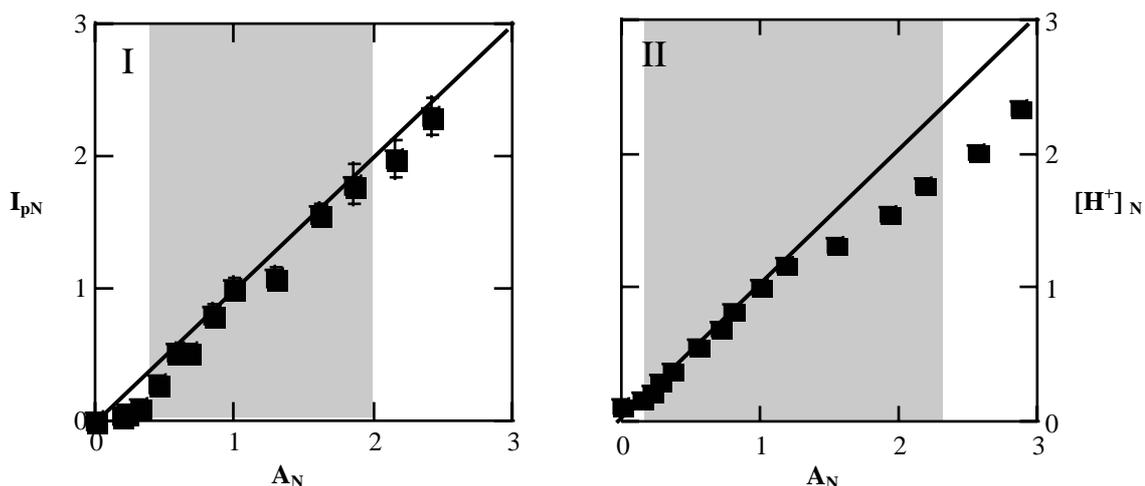


Figura 3.30 – Intensidade de corrente pico normalizada em função da absorvância normalizada (I). Concentração de H^+ normalizada em função da absorvância normalizada (II). Os resultados voltamétricos foram obtidos com o microeléctrodo de 50 μm de diâmetro, em culturas de leveduras de *Candida utilis* em meio contendo etanol. Na zona a sombreado estão representados os valores obtidos na zona de crescimento exponencial da cultura. A recta traçada, $y = x$, traduz a equivalência das grandezas representadas.

Os desvios à recta $y = x$ são verificados nos quatro primeiros pontos representados na figura 3.30-I. Todos estes pontos se encontram abaixo do valor do limite de quantificação calculado em 1.2.2 ($l.d.q = 25,6 \text{ nA}$) com o microeléctrodo de $50 \mu\text{m}$ por SWV. Os pontos obtidos na fase exponencial apresentam poucos desvios à recta $y = x$, o que traduz a equivalência entre as duas técnicas na avaliação do crescimento nesta fase.

Na representação gráfica da concentração do ião hidrogénio normalizada em função da absorvância normalizada, figura 3.30-II, os desvios à recta $y = x$ são verificados para valores de absorvância normalizados superiores a 1,186 ($A = 0,626$), incluídos na zona de crescimento exponencial. Assim, poderá concluir-se que as medidas de pH não são equivalentes às de absorvância.

A comparação entre a intensidade de corrente de pico normalizada em função da concentração do ião hidrogénio normalizada pode ser efectuada a partir da figura 3.31. Os quatro primeiros pontos que correspondem a valores de intensidade de corrente de pico inferiores ao valor do limite de quantificação apresentam desvios à recta $y = x$. Para valores de concentração normalizada do ião hidrogénio superiores a 1,141, (correspondente a concentração do ião hidrogénio de 1,09 mM) observa-se um desvio constante à recta que traduz a equivalência dos métodos.

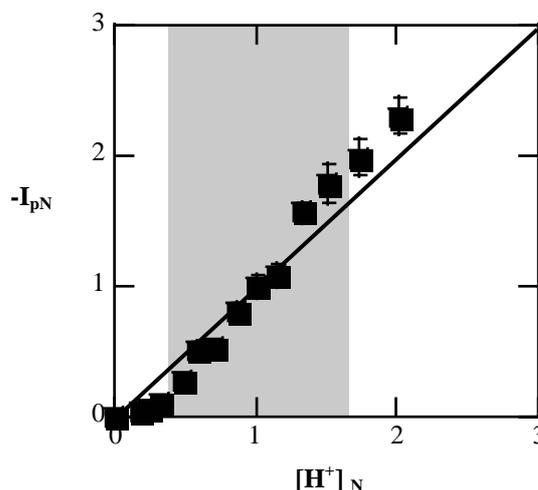


Figura 3.31 – Intensidade de corrente pico normalizada em função da concentração de H^+ normalizada. Os resultados foram obtidos com o microeléctrodo de $50 \mu\text{m}$ de diâmetro em culturas de leveduras de *Candida utilis* em meio contendo etanol (valores apresentados na tabela 3.24 e foram normalizados para o ponto (0,00095 M, 59,55 nA). Na zona a sombreado estão representados os valores obtidos na zona de crescimento exponencial da cultura. A recta traçada, $y = x$, traduz a equivalência das grandezas representadas.

Para a determinação das taxas específicas de crescimento da levedura *Candida utilis* em meio contendo etanol, efectuou-se uma representação semi-logarítmica das medidas de absorvância e da intensidade de corrente de pico em função do tempo de crescimento (figura 3.32). Os valores representados foram obtidos na fase exponencial do crescimento das culturas e encontram-se apresentados na tabela 3.26 a sombreado.

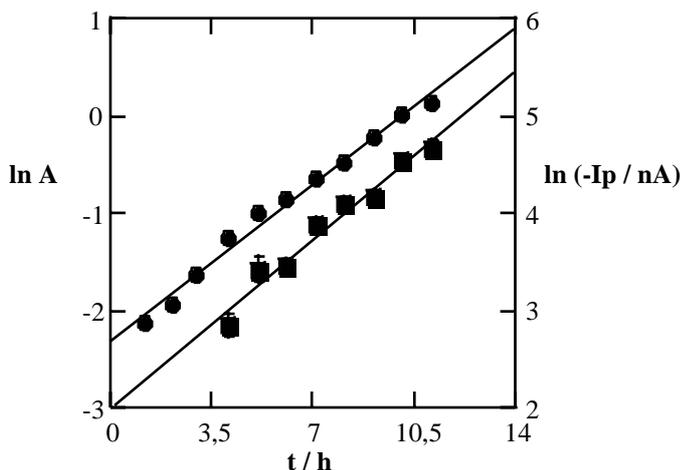


Figura 3.32 – Representação semi-logarítmica da absorvância e a intensidade de corrente de pico, obtida com o microeléctrodo de 50 μm de diâmetro por SWV, em culturas de células de *Candida utilis* em meio contendo etanol em função do tempo, na fase exponencial do crescimento.

Como se pode verificar pela figura 3.32, assim como pelos valores dos coeficientes de correlação (tabela 3.27) existe uma boa correlação entre as medidas turbidimétrica e voltamétrica com o tempo de crescimento na fase exponencial do crescimento da *Candida utilis* em meio contendo etanol. Os valores dos declives a partir dos quais se estima a taxa específica de crescimento, obtidos para as rectas apresentadas na figura 3.32 são semelhantes. Como foi verificado na figura 3.29 a fase exponencial definida por voltametria de onda quadrada corresponde aos pontos experimentais que se encontram acima do limite de quantificação desta técnica.

Tabela 3.26 – Valores dos logaritmos da absorvância ($\ln A$) e da intensidade de corrente de pico ($\ln(-I_p)$) para diferentes tempos de crescimento (t) em culturas de células de *Candida utilis* em meio etanol 0,5%.

t (h)	ln A	ln (-I_p / nA)
0,00	-2,580	n.d
1,17	-2,127	1,1 ± 0,1*
2,17	-1,947	1,2 ± 0,2*
3,00	-1,641	1,8 ± 0,2*
4,08	-1,259	2,8 ± 0,1*
5,08	-1,004	3,4 ± 0,1
6,08	-0,867	3,45 ± 0,07
7,08	-0,648	3,88 ± 0,08
8,08	-0,478	4,09 ± 0,08
9,08	-0,216	4,16 ± 0,08
10,08	0,003	4,54 ± 0,04
11,08	0,136	4,67 ± 0,08
12,00	0,291	4,77 ± 0,07
13,00	0,409	4,92 ± 0,06

n.d – não detectado

* – inferior ao l.d.q

Tabela 3.27 – Valores da ordenada na origem (a), do declive (b) e coeficiente de correlação determinados por SWV com o microelectrodo de 50 μm de diâmetro e turbidimetria em culturas da levedura *Candida utilis* em meio contendo etanol e determinados a partir da representação na figura 3.32.

Técnica	a ± ts_a	b ± ts_b (h⁻¹)	r	n
SWV	2,0 ± 0,4	0,25 ± 0,05	0,98	8
A	-2,3 ± 0,1	0,23 ± 0,02	0,994	11

2.3. Meio contendo ácido láctico 0,5%

O comportamento voltamétrico de suspensões preparadas a partir de culturas de células de levedura *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo ácido láctico é diferente do verificado em culturas de células destas espécies no meio K ou contendo etanol, conforme se verificou na secção 1.2.3 deste capítulo.

Nos voltamogramas da figura 3.33, obtidos por SWV em culturas de células da levedura *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo ácido láctico observa-se, ao longo do tempo a diminuição do sinal a um potencial de pico ≈ -520 mV. Este pico ocorre a um potencial de pico mais negativo que os sinais observados nas culturas de ambas as espécies em meio K e meio contendo etanol. A resolução do sinal é pior do que a verificada nos voltamogramas obtidos nas culturas nos meio K e contendo etanol.

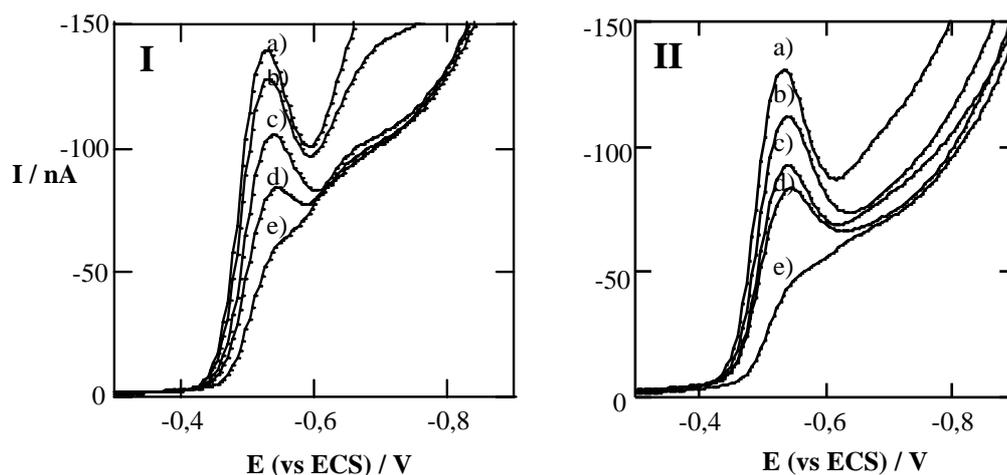


Figura 3.33 – Voltamogramas obtidos por voltametria de onda quadrada com o microeléctrodo de 50 μm de diâmetro no crescimento em meio láctico 0,5% obtidas ao longo do tempo de *Candida utilis* (I) a diferentes tempos de crescimento: a) 0,00; b) 0,75; c) 3,67; d) 11,00 e e) 12,67 h; de *Saccharomyces cerevisiae* (II): a) 0,00; b) 2,83; c) 23,83; d) 29,58 e e) 33,00 h.

A intensidade de corrente de pico apresentou um valor máximo no meio de cultura. Este sinal deixa de ser mensurável quando ainda se verificam variações muito acentuadas de absorvância. Este facto relaciona-se com o elevado limite de quantificação determinado para o ácido láctico neste meio que corresponde a 0,013 M de ácido láctico (secção 1.2.3 deste capítulo). Em ambas as culturas o último valor de I_p medido encontra-se abaixo do limite de quantificação e não têm portanto significado analítico.

As medidas turbidimétricas apresentam um aumento ao longo do tempo, tal como os valores de pH, nas culturas das duas espécies de leveduras (tabela 3.28).

Tabela 3.28 – Tempo de crescimento (t), absorvância (A), pH e variação da intensidade de corrente de pico média (ΔI_p) para um número de réplicas (n) em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio com ácido láctico 0,5%.

t (h)	<i>Candida utilis</i>					<i>Saccharomyces cerevisiae</i>					
	A	-I _p (nA)	ΔI_p (nA)	n	pH	t (h)	A	-I _p (nA)	ΔI_p (nA)	n	pH
	0,000	83 ± 4	0	5	4,13		0,000	65 ± 4	0	5	4,12
0,00	0,013	77 ± 3	6 ± 1	7	4,12	0,00	0,018	54 ± 3	11 ± 5	4	4,00
0,75	0,013	73 ± 2	10 ± 4	6	4,11	1,00	0,022	55 ± 4	10 ± 6	5	4,00
1,25	0,018	76 ± 4	7 ± 5	5	4,11	1,83	0,022	57 ± 5	8 ± 4	4	4,12
2,08	0,018	68 ± 3	15 ± 4	6	4,11	2,83	0,022	54 ± 5	11 ± 4	5	4,12
2,92	0,022	69 ± 2	14 ± 4	7	4,09	20,83	0,108	60 ± 2	5 ± 1	5	4,18
3,67	0,027	60 ± 3	23 ± 5	6	4,11	22,33	0,125	50 ± 4	15 ± 5	4	4,16
4,33	0,032	61 ± 2	22 ± 4	7	4,11	23,83	0,161	47 ± 4	18 ± 5	7	4,19
5,00	0,036	65 ± 3	18 ± 5	5	4,12	24,75	0,174	46 ± 3	19 ± 5	6	4,24
5,75	0,041	68 ± 2	15 ± 4	6	4,13	25,83	0,201	38 ± 5	27 ± 6	5	4,26
6,58	0,051	62 ± 3	21 ± 3	5	4,13	26,83	0,215	38 ± 3	27 ± 5	4	4,23
7,25	0,071	58 ± 4	25 ± 5	7	4,14	28,33	0,260	41 ± 6	24 ± 7	5	4,27
8,00	0,092	57 ± 3	26 ± 5	4	4,16	29,58	0,301	22 ± 4	43 ± 6	7	4,31
8,75	0,125	51 ± 3	32 ± 5	4	4,18	30,83	0,347	18 ± 2	47 ± 5	7	4,35
9,33	0,168	51 ± 2	32 ± 4	7	4,20	32,00	0,409	16 ± 3	49 ± 5	7	4,44
10,17	0,215	48 ± 3	35 ± 5	5	4,24	33,00	0,444	10 ± 2	55 ± 5	5	4,54
11,00	0,276	36 ± 4	47 ± 5	5	4,31						
12,00	0,387	20 ± 2	63 ± 4	7	4,45						
12,67	0,444	8 ± 1	75 ± 4	6	4,58						

As curvas de crescimento definidas a partir das medidas de absorvância de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo ácido láctico estão apresentadas na figura 3.34. Na figura 3.34-I a fase exponencial, assinalada a sombreado, do crescimento de *Candida utilis*, compreende os valores de absorvância obtidos no intervalo entre 2,08 e 12,67 horas. A correspondente curva para a levedura *Saccharomyces cerevisiae* está apresentada na figura 3.34-II.

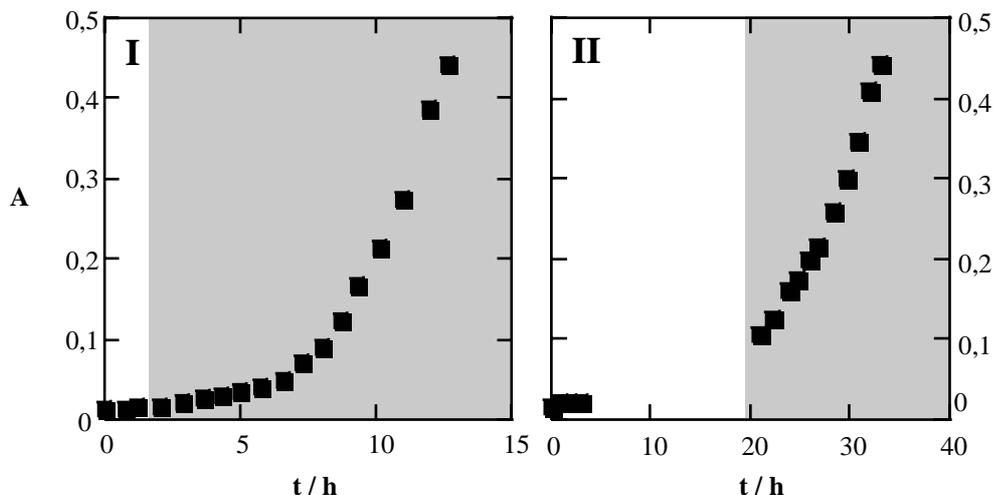


Figura 3.34 – Curvas de crescimento obtidas por turbidimetria em culturas de células de *Candida utilis* (I) e *Saccharomyces cerevisiae* (II) em meio contendo ácido láctico 0,5%. O intervalo a sombreado corresponde à região do crescimento exponencial.

A representação gráfica da intensidade de corrente de pico em função do tempo de crescimento de ambas as leveduras está apresentada na figura 3.35. Os valores de intensidade de corrente correspondentes estão apresentados na tabela 3.28. Observa-se que as intensidades de corrente de pico diminuem com o tempo de crescimento devido ao consumo do ácido láctico pelas leveduras.

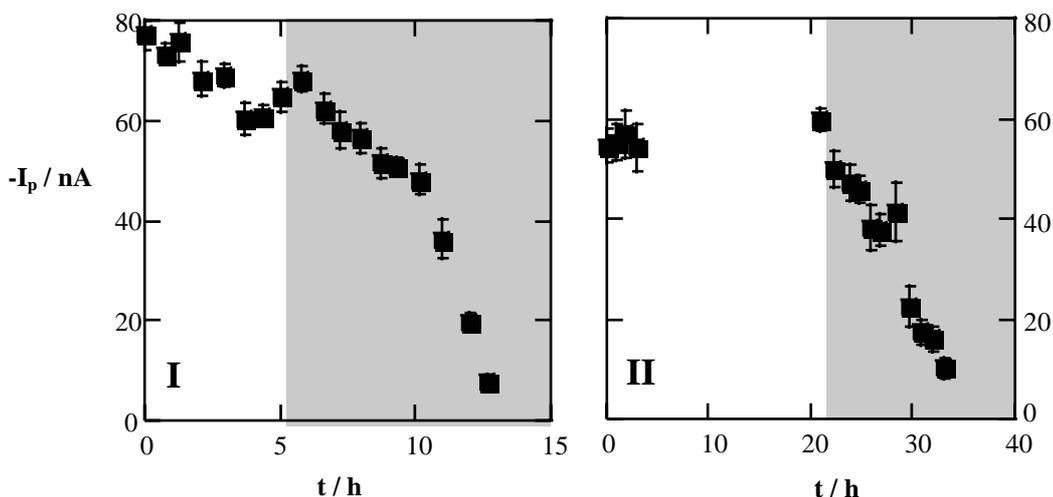


Figura 3.35 – Variação da intensidade de corrente de pico, obtida com o microelctrodo de 50 µm, em função do tempo de crescimento de culturas de células de *Candida utilis* (I) e *Saccharomyces cerevisiae* (II) em meio contendo ácido láctico 0,5%. O intervalo a sombreado corresponde à região do crescimento exponencial.

As curvas de crescimento definidas por medidas voltamétricas revelam uma pior definição que as análogas obtidas por medições de absorvância. Esta má definição está associada à dispersão observada em cada medida assim como oscilações observadas em medidas consecutivas. A origem desta dispersão só poderá ser identificada com a realização de mais ensaios neste.

Com a finalidade de comparar as curvas de crescimento obtidas por voltametria e turbidimetria das culturas de células, a cada intensidade de corrente foi subtraído o valor medido no meio. Assim, foi definida uma curva de crescimento correspondente à variação da intensidade de corrente de pico ($I_p - I_{p0}$) denominada por ΔI em função do tempo (figura 3.36).

Os resultados apresentados indicam no entanto que a diminuição da intensidade de corrente de redução do ácido láctico ocorre paralelamente ao aumento de absorvância, estando deste modo ΔI directamente relacionado com o aumento de biomassa celular.

A definição da fase exponencial através de ambos os métodos não é exactamente a mesma, mais precisamente no que se refere ao seu início. Este facto pode estar associado à falta de reprodutibilidade referida dos sinais electroquímicos neste meio.

Na região de crescimento exponencial, ver figura 3.36, a variação dos valores de ΔI segue uma variação monótona dentro da incerteza associada a cada ponto. Assim, a análise destes valores poderá ser utilizada na determinação da taxa específica de crescimento.

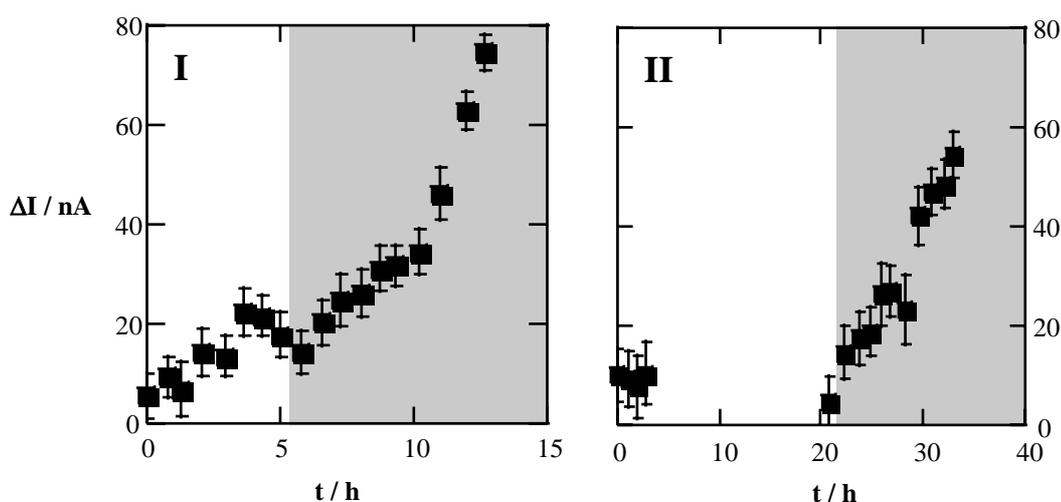


Figura 3.36 – Curvas de crescimento obtidas por SWV de culturas de células de *Candida utilis* (I) e *Saccharomyces cerevisiae* (II) em meio contendo ácido láctico 0,5%. O intervalo a sombreado corresponde à região do crescimento exponencial.

Na figura 3.37 representam-se os gráficos relativos à análise semi-logarítmica da absorvância e intensidade de corrente em função do tempo.

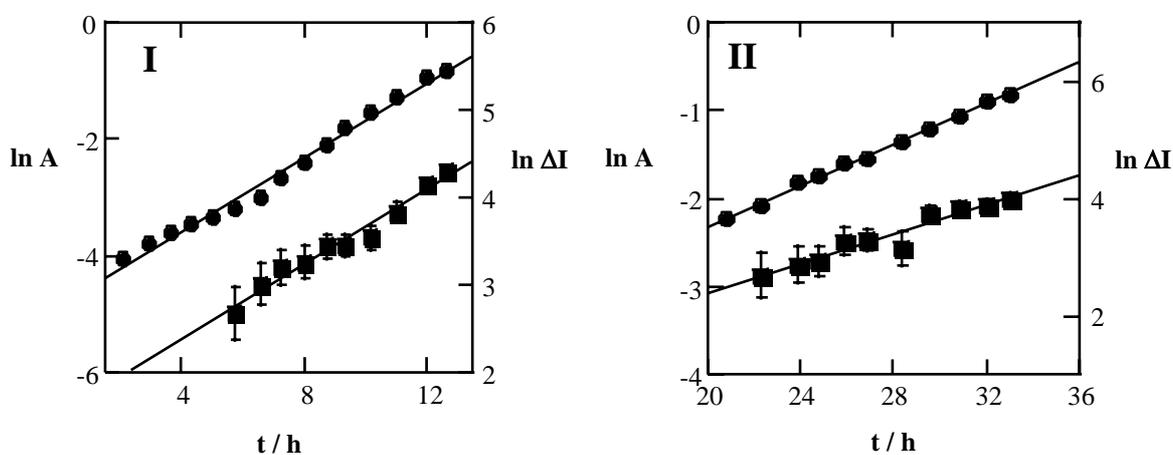


Figura 3.37 – Representação semi-logarítmica das medidas de absorvância (●) e da variação da intensidade de corrente obtida por SWV (■) com o microeléctrodo de 50 μm de diâmetro em função do tempo em culturas de *Candida utilis* (I) e *Saccharomyces Cerevisiae* (II) em meio com ácido láctico 0,5%.

Os valores utilizados nas representações da figura 3.37 encontram-se assinalados a sombreado na tabela 3.29.

As taxas de crescimento determinadas em culturas de *Candida utilis* dependem do método considerado, como se pode verificar através dos resultados apresentados na tabela 3.30. No entanto, é de referir que os valores obtidos são independentes da dimensão do microeléctrodo.

Na tabela 3.31 estão apresentadas as taxas de crescimento determinadas por turbidimetria e voltametria em culturas de *Saccharomyces cerevisiae*, podendo-se verificar que estes valores são independentes da técnica e do microeléctrodo utilizado.

Neste meio de cultura os coeficientes de correlação obtidos para os gráficos semi-logarítmicos da intensidade de corrente e da absorvância em função do tempo não são tão elevados como os que se obtiveram em meio K, traduzindo a falta de reprodutibilidade observada nas experiências efectuadas.

Tabela 3.29 – Valores dos logaritmos da absorvância ($\ln A$) e da intensidade de corrente de pico ($\ln \Delta I$) para diferentes tempos de crescimento (t) em culturas de células de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio láctico.

<i>Candida utilis</i>			<i>Saccharomyces Cerevisiae</i>		
t (h)	$\ln A$	$\ln (\Delta I / nA)$	t (h)	$\ln A$	$\ln (\Delta I / nA)$
0,00	-4,325	$1,7 \pm 0,8$	0,00	-4,033	$2,3 \pm 0,5$
0,75	-4,325	$2,2 \pm 0,4$	1,00	-3,804	$2,2 \pm 0,6$
1,25	-4,033	$1,9 \pm 0,8$	1,83	-3,804	$2,0 \pm 0,8$
2,08	-4,033	$2,7 \pm 0,3$	2,83	-3,804	$2,3 \pm 0,6$
2,92	-3,804	$2,6 \pm 0,3$	20,83	-2,227	$1,6 \pm 0,9$
3,67	-3,617	$3,1 \pm 0,2$	22,33	-2,080	$2,7 \pm 0,4$
4,33	-3,457	$3,1 \pm 0,1$	23,83	-1,825	$2,8 \pm 0,3$
5,00	-3,318	$2,9 \pm 0,3$	24,75	1,749	$2,9 \pm 0,3$
5,75	-3,195	$2,7 \pm 0,3$	25,83	-1,606	$3,3 \pm 0,2$
6,58	-2,983	$3,0 \pm 0,2$	26,83	-1,539	$3,3 \pm 0,2$
7,25	-2,651	$3,2 \pm 0,2$	28,33	-1,349	$3,1 \pm 0,3$
8,00	-2,391	$3,3 \pm 0,2$	29,58	-1,201	$3,7 \pm 0,1$
8,75	-2,080	$3,4 \pm 0,1$	30,83	-1,059	$3,8 \pm 0,1$
9,33	1,787	$3,5 \pm 0,1$	32,00	-0,894	$3,9 \pm 0,1$
10,17	-1,539	$3,5 \pm 0,1$	33,00	-0,813	$3,99 \pm 0,08$
11,00	-1,289	$3,8 \pm 0,1$			
12,00	0,949	$4,14 \pm 0,06$			
12,67	0,813	$4,31 \pm 0,05$			

Tabela 3.30 – Valores da ordenada na origem (a), do declive (b) e coeficiente de correlação (r) da representação semi-logarítmica da intensidade de corrente de pico (SWV) e da absorvância em função do tempo em culturas da levedura *Candida utilis* em meio láctico, determinados a partir da representação na figura 3.37-I.

Técnica	$a \pm ts_a$	$b \pm ts_b$ (h^{-1})	r	n
SWV ($\phi = 25 \mu m$)	$1,2 \pm 0,3$	$0,24 \pm 0,03$	0,99	11
($\phi = 50 \mu m$)	$1,5 \pm 0,3$	$0,21 \pm 0,03$	0,98	10
A	$-4,8 \pm 0,2$	$0,32 \pm 0,02$	0,995	15

Tabela 3.31 – Valores da ordenada na origem (a), do declive (b) e coeficiente de correlação (r) da representação semi-logarítmica da intensidade de corrente de pico (SWV) e da absorvância em função do tempo em culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio láctico, determinados a partir da representação na figura 3.37-II.

Técnica		$a \pm ts_a$	$b \pm ts_b$ (h^{-1})	r	n
SWV	($\phi = 25 \mu m$)	$-0,3 \pm 0,5$	$0,11 \pm 0,02$	0,97	11
	($\phi = 50 \mu m$)	$-0,1 \pm 0,8$	$0,13 \pm 0,03$	0,96	10
A		$-4,7 \pm 0,1$	$0,117 \pm 0,004$	0,999	11

3. Análise Cromatográfica

3.1. Análise de nutrientes e possíveis metabolitos celulares por HPLC

As amostras de sobrenadante de culturas de células de *Candida utilis* e de *Saccharomyces cerevisiae* crescidas em diferentes meios foram recolhidas ao longo do tempo de crescimento de forma a ser posteriormente submetidas a uma análise cromatográfica, de modo a identificar e quantificar os compostos presentes nas culturas de leveduras.

Foram analisados por HPLC alguns compostos descritos na literatura como possíveis produtos consumidos/libertados pelas células e ainda os componentes dos meios de cultura segundo o procedimento indicado na literatura [61] e descrito na secção 4.3 e 4.4 do capítulo II. Os compostos seleccionados, assim como os seus tempos de retenção, estão apresentados na tabela 3.32. A arabinose foi escolhida como padrão interno. Os tempos de retenção da glucose, da arabinose, do ácido acético e do etanol são idênticos aos descritos na literatura [61].

Como se verifica pela análise da tabela 3.32, o ácido láctico apresenta dois picos, com tempos de retenção bastante próximos, sendo o segundo cerca de duas vezes e meia maior que o primeiro. O ácido cítrico e o ácido glucónico aparecem ao mesmo tempo de retenção, sendo muito próximo do tempo de retenção da glucose. Relativamente ao pico do ácido succínico este aparece no mesmo tempo de retenção que o 2º pico do ácido láctico ($t_r = 15,46$ minutos). Apenas dois dos constituintes do meio mineral, o dihidrogenofosfato de potássio e sulfato de amónio foram detectados.

Tabela 3.32 -Valores de concentração, tempo de retenção (t_r) de cada componente e razão entre a área de cada padrão e a do padrão interno (A_p/A_a).

Padrões	C (g/L)	t_r (min.)	A_p / A_a
Sulfato de amónio	2,706 ± 0,007	7,20	0,385
Dihidrogenofosfato de potássio	2,704 ± 0,007	9,29	0,310
Ácido cítrico	2,268 ± 0,006	10,06	0,3650
Ácido glucónico	2,055 ± 0,005	10,07	0,3540
Glucose	9,93 ± 0,01	11,10	1,906
Ácido málico	2,237 ± 0,006	12,30	0,3697
Arabinose	4,999 ± 0,003	13,32	1,000
Ácido láctico	2,42 ± 0,02	14,46	0,1815
		15,96	0,4714
Ácido succínico	2,391 ± 0,006	15,47	0,3480
Ácido acético	2,100 ± 0,002	18,94	0,2036
Etanol	1,580 ± 0,001	24,68	0,1164
Cloreto de cálcio	0,271 ± 0,001	n.d	n.d
Sulfato de magnésio	0,122 ± 0,001	n.d	n.d

n.d – não detectado

As substâncias para as quais se efectuaram curvas de calibração foram: a glucose, o ácido láctico, o etanol, o ácido málico e o ácido acético.

A partir das curvas de calibração determinaram-se os parâmetros estatísticos: limite de detecção, limite de quantificação, ordenada na origem, declive e coeficiente de correlação, apresentados na tabela 3.33.

Os valores obtidos para os coeficientes de correlação das rectas de calibração, apresentados na tabela 3.33 mostram que existe uma relação linear entre o sinal cromatográfico e a concentração de cada padrão na gama de concentrações estudadas.

Tabela 3.33 – Valores de ordenada na origem (a), declive (b), limite de detecção (l.d.d), limite de quantificação (l.d.q) e coeficiente de correlação (r) para n =10, das rectas de calibração obtidas por HPLC.

Padrões	Gama de concentrações (%)	a ± ts_a (10⁻²)	b ± ts_b (10⁻² %⁻¹)	r	l.d.d (%)	l.d.q (%)
Glucose	0,202 – 2,016	-1 ± 5	195 ± 5	0,9994	0,04	0,1
Ácido láctico (1)	0,025 – 0,500	-0,2 ± 1,1	31 ± 4	0,99	0,04	0,2
Ácido láctico (2)		-0,6 ± 0,9	91 ± 4	0,999	0,01	0,04
Etanol	0,020 – 0,400	-0,5 ± 0,6	63 ± 3	0,998	0,01	0,04
Ácido málico		-2 ± 2	185 ± 8	0,998	0,01	0,04
Ácido acético		-0,3 ± 0,8	101 ± 4	0,999	0,01	0,03

3.2. Determinação de nutrientes e metabolitos celulares nas culturas de leveduras

3.2.1. Meio K

As amostras de sobrenadante de culturas de células de *Candida utilis* cultivadas em meio K recolhidas, após tratamento prévio (Cap.II, secção 4.3), foram submetidas à análise cromatográfica. No cromatograma, figura 3.38, obtido numa amostra de sobrenadante, com absorvância igual a 0,620, podem-se observar seis picos. A análise do cromatograma permitiu identificar o sulfato de amónio, o dihidrogenofosfato de potássio, a glucose, a arabinose, o ácido málico e o etanol. Os valores determinados da razão entre a área de cada componente e a do padrão interno estão apresentados na tabela 3.34, assim como os valores da concentração de glucose, ácido málico e etanol determinados por interpolação nas rectas de calibração e atendendo à diluição do sobrenadante com uma solução de arabinose.

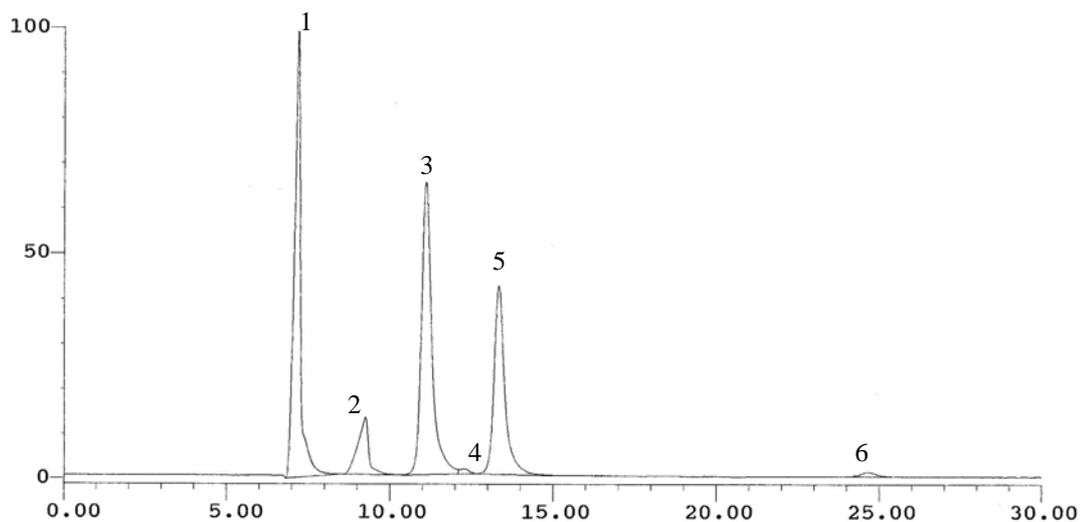


Figura 3.38 – Cromatograma obtido no sobrenadante de uma cultura de células de *Candida utilis* em meio K com uma absorvância de 0,620: 1) sulfato de amónio; 2) dihidrogenofosfato de potássio; 3) glucose; 4) ácido málico; 5) arabinose e 6) etanol.

Na tabela 3.34 verifica-se que o valor da razão entre a área do dihidrogenofosfato de potássio e a de padrão interno obtido nas amostras de sobrenadantes mantém-se aproximadamente constante ao longo do tempo. Esses valores são praticamente iguais aos obtidos para este composto no meio de cultura. Para o sulfato de amónio, os valores das razões não seguem uma variação sistemática ao longo do tempo, sendo muito diferentes dos obtidos no meio. Este facto pode ser explicado pela existência de outro composto ao mesmo tempo de retenção do sulfato de amónio nas culturas de *Candida utilis* em meio K.

Como se pode observar na tabela 3.34 a concentração de ácido málico nas amostras de sobrenadantes de *Candida utilis* em meio K não varia de forma sistemática com o tempo de crescimento. Os valores de concentração do ácido málico estão próximos do limite de quantificação determinado (0,04 %). A variação da quantidade de ácido málico presente nas amostras de sobrenadante de *Candida utilis* não acompanha a variação da intensidade de corrente de pico ou de absorvância ao longo do crescimento da levedura, de acordo com os valores da tabela 3.34. Na amostra recolhida a 13,83 horas o pico correspondente a este composto não aparece.

A concentração de etanol aumenta ao longo do crescimento da *Candida utilis*, o que traduz a produção deste composto como resultado da actividade celular.

Tabela 3.34 – Medidas de absorvância (A), de intensidade de corrente de pico (I_p) e razão entre a área de cada componente e a da arabinose (A_p/A_a) em amostras de sobrenadantes de culturas da levedura *Candida utilis* em meio K recolhidas em diferentes tempos de crescimento (t).

t (h)	A	- I_p (nA)	A_p / A_a					C / %		
			Sulfato de amónio	Dihidrogenofosfato de potássio	Glucose	Ácido málico	Etanol	Glucose ± 0,04	Ácido málico ± 0,01	Etanol ± 0,01
Meio K	0,000	n.d	0,461 ± 0,004	0,34 ± 0,01	1,83 ± 0,01	n.d	n.d	1,89	n.d	n.d
1,58	0,143	n.d	2,01 ± 0,08	0,34 ± 0,01	1,94 ± 0,02	0,02 ± 0,02	n.d	2,00	0,04	n.d
3,92	0,319	6 ± 2	1,58 ± 0,01	0,34 ± 0,01	1,81 ± 0,01	0,029 ± 0,004	0,008 ± 0,009	1,87	0,05	0,04
5,25	0,523	25 ± 2	2,89 ± 0,02	0,370 ± 0,002	1,700 ± 0,002	0,0333 ± 0,0004	0,014 ± 0,006	1,76	0,05	0,06
5,83	0,620	26 ± 3	2,00 ± 0,01	0,34 ± 0,02	1,67 ± 0,02	0,028 ± 0,006	0,024 ± 0,005	1,73	0,05	0,09
6,33	0,699	37 ± 6	1,38 ± 0,02	0,309 ± 0,002	1,503 ± 0,005	0,026 ± 0,005	0,033 ± 0,006	1,56	0,05	0,12
8,67	1,936	79 ± 6	2,04 ± 0,02	0,388 ± 0,003	1,19 ± 0,02	0,02 ± 0,01	0,142 ± 0,001	1,23	0,04	0,47
13,83*	4,202	127 ± 8	1,47 ± 0,01	0,257 ± 0,003	n.d	n.d	0,150 ± 0,003	n.d	n.d	0,49

n.d – não detectado

* – não se encontra na fase exponencial do crescimento.

Verifica-se ainda na tabela 3.34 que o consumo de glucose ao longo do crescimento é assim comprovado pelos valores da concentração determinados nestas amostras de sobrenadantes, assim como a libertação de ácido málico e etanol nas culturas de *Candida utilis*.

Na figura 3.39 está representada a variação da concentração de glucose com a absorvância (3.39-I) e com os valores de intensidade de corrente de pico (3.39-II) medidos em culturas de células de *Candida utilis* ao longo do tempo. A concentração de glucose varia linearmente com a absorvância (figura 3.39-I). Esta variação linear traduz que o consumo de glucose é proporcional ao aumento da massa celular.

Na figura 3.39-II verifica-se uma relação linear entre a concentração de glucose e a intensidade de corrente de pico obtida nessas culturas. Como o sinal voltamétrico obtido nas culturas de células de *Candida utilis* é devido à redução electroquímica de ácidos fracos comprova-se que a produção destes ácidos pelas células se relaciona com o consumo da glucose.

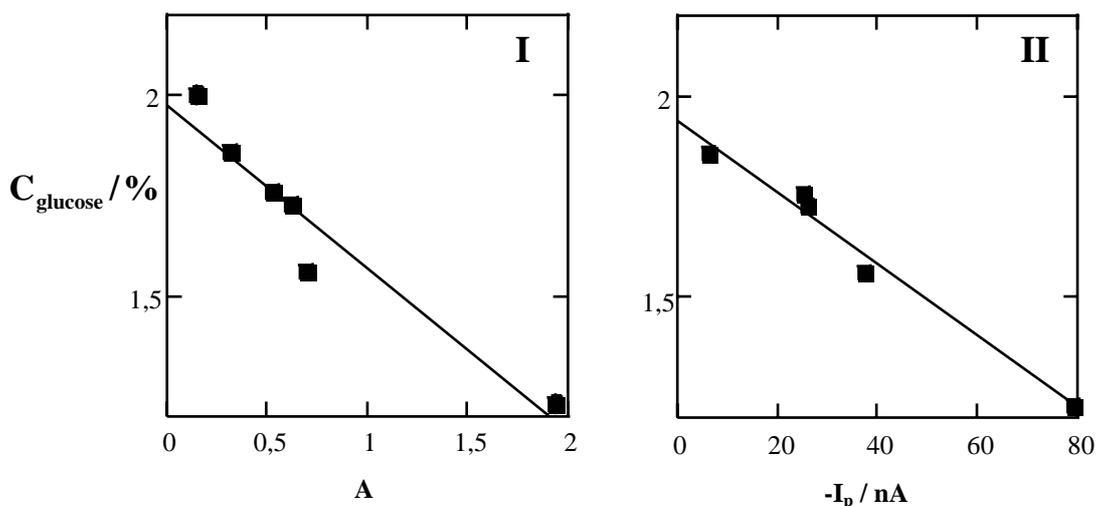


Figura 3.39 – Variação da concentração da glucose com as medidas de absorvância (I), e os valores de intensidade de corrente de pico (microeléctrodo de 25 μm) (II) obtidas em culturas de células de *Candida utilis* em meio K.

As amostras de sobrenadantes de culturas de *Saccharomyces cerevisiae* em meio K foram também analisadas. Os resultados são semelhantes aos obtidos em sobrenadantes de *Candida utilis*. Nos cromatogramas obtidos foram identificadas as mesmas espécies. Foi detectado um outro pico a um tempo de retenção de 16,5 minutos, não identificado. Os resultados verificados para os dois componentes do meio mineral detectados nos

sobrenadantes de *Saccharomyces cerevisiae* foram iguais aos obtidos nos sobrenadantes de *Candida utilis*. Os valores da razão da área de cada componente e o padrão interno em diferentes tempos de crescimento apresentam-se na tabela 3.35, assim como as concentrações determinadas de cada um dos compostos identificados nestas amostras de sobrenadantes.

Na tabela 3.35 verifica-se que quantidade de ácido málico determinada nos sobrenadantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio K é constante ao longo crescimento. No intervalo de tempo de 1,42 a 4,17 horas o valor de concentração de ácido málico determinado é inferior ao limite de quantificação (0,04 %) como se pode verificar pelos valores apresentados na tabela 3.33. Verifica-se também que a quantidade de etanol libertada no meio aumenta ao longo do crescimento com excepção do valor medido a 4,83 horas.

A diminuição da concentração (tabela 3.35) traduz o consumo da glucose pela levedura, tal como se verificou em culturas de *Candida utilis*. Na amostra correspondente a um tempo de crescimento de 8,5 horas a concentração é inferior ao limite de quantificação determinado a partir da recta de calibração (0,1 %).

Tabela 3.35 – Medidas de absorvância (A), de intensidade de corrente de pico (I_p) e razão entre a área de cada componente e a área da arabinose em amostras de sobrenadantes de culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio K recolhidas em diferentes tempos de crescimento (t).

t (h)	A	$-I_p$ (nA)	A_p / A_a			C / %		
			Glucose	Ácido málico	Etanol	Glucose $\pm 0,04$	Ácido málico $\pm 0,01$	Etanol $\pm 0,01$
Meio K	0,000	n.d	$1,83 \pm 0,01$	n.d	n.d	1,89	n.d	n.d
1,42	0,180	n.d	$1,728 \pm 0,006$	$0,0138 \pm 0,0002$	$0,030 \pm 0,003$	1,79	0,03	0,11
2,83	0,301	25 ± 3	$1,591 \pm 0,003$	$0,0122 \pm 0,0006$	$0,0500 \pm 0,0008$	1,65	0,03	0,17
4,17	0,469	65 ± 4	$1,39 \pm 0,02$	$0,015 \pm 0,007$	$0,0760 \pm 0,0004$	1,44	0,03	0,26
4,83	0,569	85 ± 2	$1,254 \pm 0,006$	$0,021 \pm 0,006$	$0,0245 \pm 0,0003$	1,30	0,04	0,09
5,42	0,678	99 ± 7	$1,069 \pm 0,001$	$0,02 \pm 0,02$	$0,112 \pm 0,003$	1,11	0,04	0,37
8,50*	1,936	254 ± 9	$0,042 \pm 0,001$	n.d	$0,2885 \pm 0,0002$	0,06	n.d	0,93

n.d – não detectado

* – não se encontra na fase exponencial do crescimento.

Na figura 3.40 está representada a variação da concentração de glucose com a absorvância e intensidade de corrente. A linearidade observada na figura 3.40-I traduz a relação entre o consumo da fonte de energia e carbono e o aumento da massa celular. O consumo de glucose também varia linearmente com as medidas de intensidade de corrente obtidas nas culturas de *Saccharomyces cerevisiae*.

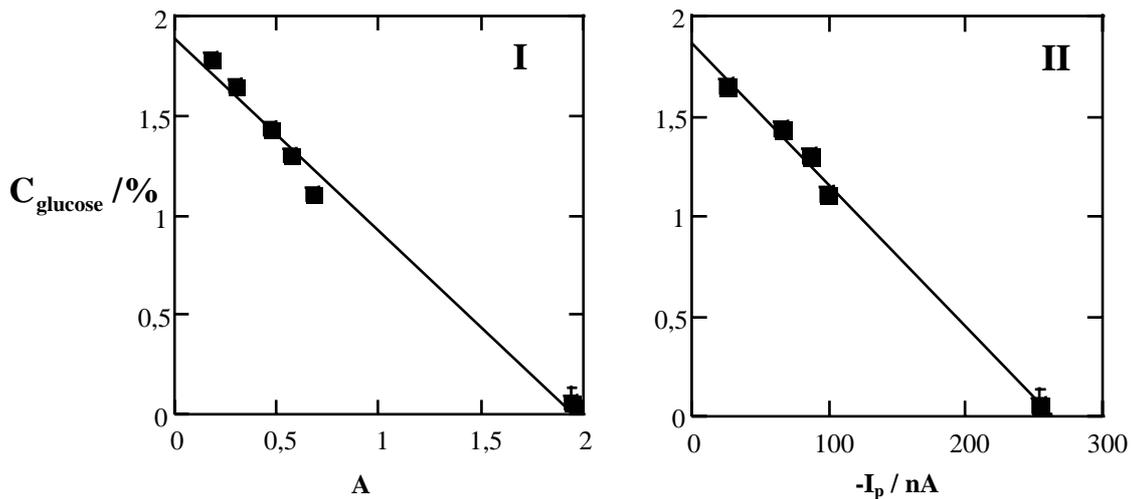


Figura 3.40 – Variação da concentração de glucose com as medidas de absorvância (I), e com os valores de intensidade de corrente de pico (microeléctrodo de 50 μm) (II) obtidas em culturas de células de *Saccharomyces cerevisiae* em meio K.

3.1.2. Meio contendo 0,5 % de etanol

A resposta electroquímica em culturas de *Candida utilis* em meio contendo etanol é muito semelhante ao verificado em meio K, como se verificou na secção 2.2 deste capítulo. As amostras de sobrenadantes dessas culturas foram também submetidas a uma análise cromatográfica. Na figura 3.41 apresenta-se o cromatograma obtido numa amostra de sobrenadante de uma cultura com um tempo de crescimento correspondente a 2,17 horas e uma absorvância de 0,143. Neste cromatograma são identificados os picos correspondentes ao sulfato de amónio, dihidrogenofosfato de potássio, arabinose e etanol. A quantidade de etanol nas amostras de culturas de *Candida utilis* diminui ao longo do

tempo de crescimento, como se pode verificar pelos valores da concentração determinados e apresentados na tabela 3.36. No entanto, esta tendência não é verificada para um tempo correspondente a 12,08 horas, provavelmente devido à volatilidade deste composto.

Nos cromatogramas apenas se identificaram os sinais correspondentes aos dois constituintes do meio mineral (sulfato de amônio e dihidrogenofosfato de potássio), à fonte de energia e carbono (etanol) e ao padrão interno (arabinose).

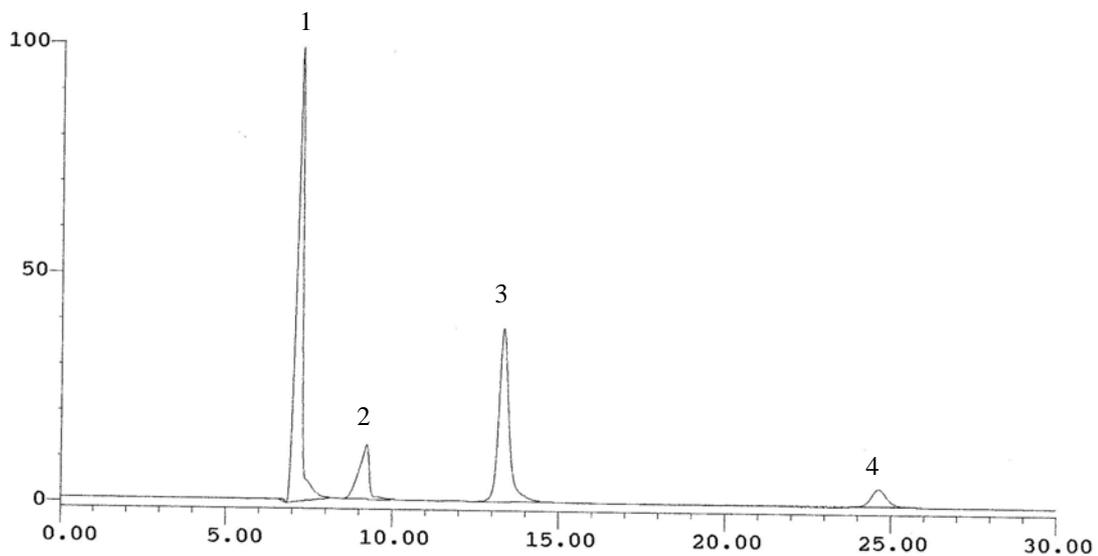


Figura 3.41 – Cromatograma obtido no sobrenadante de *Candida utilis* em meio com 0,5 % etanol, com valor de absorvância igual a 0,143: 1) sulfato de amônio; 2) dihidrogenofosfato de potássio; 3) arabinose e 4) etanol.

Na figura 3.42 está representada a variação da concentração de etanol com a absorvância e a intensidade de corrente. A linearidade observada na figura 3.42-I traduz a relação entre o consumo da fonte de energia e carbono e o aumento da massa celular. O consumo do etanol também varia linearmente com as medidas de intensidade de corrente obtidas nas culturas de *Candida utilis*.

Tabela 3.36 – Medidas de absorvância (A), de intensidade de corrente de pico (I_p), razão entre a área de etanol e de padrão interno (A_{etanol} / A_a) e concentração de etanol determinada a partir da recta de calibração (C) em amostras de sobrenadantes de culturas da levedura *Candida utilis* em meio contendo etanol recolhidas em diferentes tempos de crescimento (t).

t (h)	A	$-I_p$ (nA)	A_p / A_a	C \pm 0,01 (%)
Meio com etanol	0,000	n.d	$0,2 \pm 0$	0,65
2,17	0,143	$1,4 \pm 0,5$	$0,16 \pm 0,01$	0,52
6,08	0,420	$7,9 \pm 0,8$	$0,151 \pm 0,005$	0,50
7,08	0,523	9 ± 2	$0,143 \pm 0,001$	0,47
8,08	0,620	17 ± 1	$0,118 \pm 0,002$	0,39
11,08	1,146	33 ± 3	$0,1141 \pm 0,0007$	0,38
12,08	1,338	41 ± 3	$0,12 \pm 0,02$	0,40
12,92*	1,505	42 ± 4	$0,09666 \pm 0,00005$	0,32

n.d – não detectado

* – não se encontra na fase exponencial do crescimento.

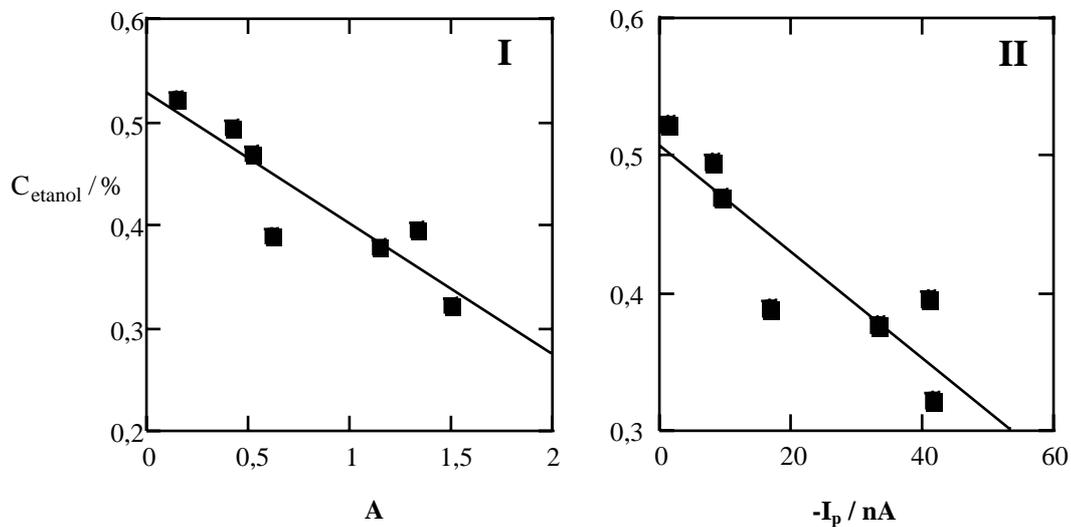


Figura 3.42 – Variação da razão entre a área do etanol e a do padrão interno (A_{etanol} / A_a) com as medidas de absorvância (I), e os valores de intensidade de corrente de pico (microeléctrodo de 25 μm) (II) obtidas em culturas de células de *Candida utilis* em meio contendo etanol.

3.1.3. Meio contendo 0,5% ácido láctico

Nos estudos efectuados em amostras de sobrenadantes nas culturas de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo ácido láctico verificam-se resultados semelhantes. Além dos picos correspondentes à arabinose, ao sulfato de amónio e dihidrogenofosfato de potássio, foram detectados dois sinais atribuídos ao ácido láctico. Nas últimas amostras de *Saccharomyces cerevisiae* para além destes picos foram detectados outros dois sinais (com tempos de retenção de 10,8 e 11,9 minutos), os quais não foram identificados. Na figura 3.43 está apresentado o cromatograma obtido numa amostra do sobrenadante de uma cultura de *Saccharomyces cerevisiae* com uma absorvância igual a 0,301, no qual se podem observar os referidos sinais.

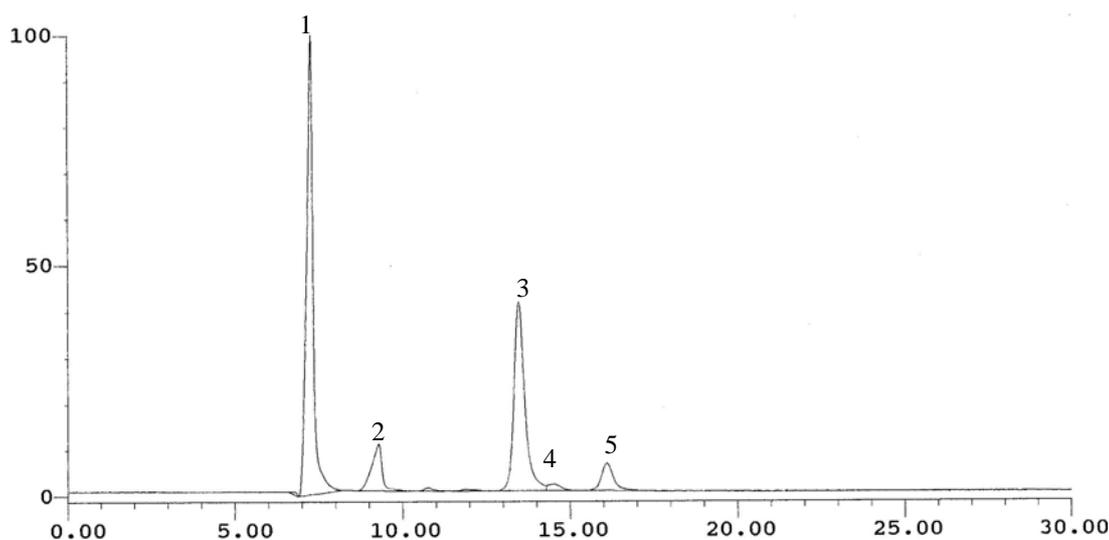


Figura 3.43 – Cromatograma obtido no sobrenadante de *Saccharomyces cerevisiae* em meio com 0,5 % de ácido láctico, correspondente a um tempo de crescimento de 29,58 horas: 1) sulfato de amónio; 2) dihidrogenofosfato de potássio; 3) arabinose; 4) 1º pico ácido láctico e 5) 2º pico de ácido láctico.

Nas tabelas 3.37 e 3.38 estão apresentados os valores das áreas normalizadas relativos a cada componente detectado nas culturas, de ambas as espécies de leveduras,

em diferentes tempos de crescimento, assim como as respectivas concentrações determinadas. Nestas tabelas apresentam-se também os valores de absorvância e de intensidade de corrente obtidos nessas culturas.

Na tabela 3.37 verifica-se que a concentração de ácido láctico varia de uma forma não sistemática ao longo do crescimento da *Candida utilis*. Um comportamento semelhante é observado nas culturas de *Saccharomyces cerevisiae* (tabela 3.38). Na tabela 3.38 verifica-se que os valores das áreas normalizadas de cada um dos componentes (1 e 2), detectados nos sobrenadantes das culturas de *Saccharomyces cerevisiae* não apresentam uma variação constante ao longo do crescimento.

Os resultados obtidos nas amostras de sobrenadantes de ambas as leveduras em meio contendo ácido láctico são deste modo pouco conclusivos.

Os resultados obtidos pela análise cromatográfica não permitiram identificar os ácidos fracos determinados por voltametria, uma vez que além dos sinais correspondentes às fontes de energia e carbono, praticamente não aparecem sinais correspondentes a ácidos fracos. No entanto, nos sobrenadantes de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K foram determinados o ácido málico e etanol. Nos sobrenadantes de *Saccharomyces cerevisiae* em meio K foi ainda observado um outro sinal ao tempo de retenção a 16,5 minutos.

Tabela 3.37 – Medidas de absorvância (A), de intensidade de corrente de pico (I_p) e razão entre a área de etanol e de arabinose (A_p/A_a) em amostras de sobrenadantes de culturas da levedura *Candida utilis* em meio contendo ácido láctico recolhidas em diferentes tempos de crescimento (t).

t (h)	A	$-I_p$ (nA)	A_p / A_a		C/ %	
			Ácido láctico1	Ácido láctico 2	Ácido láctico1 ± 0,05	Ácido láctico 2 ± 0,01
Meio c/ ácido láctico	0,000	83 ± 4	0,10 ± 0,00	0,30 ± 0	0,65	0,67
1,25*	0,018	76 ± 4	0,002 ± 0,000	0,234 ± 0,004	0,03	0,52
6,58	0,051	62 ± 3	0,005 ± 0,001	0,321 ± 0,005	0,05	0,72
7,25	0,071	58 ± 4	0,032 ± 0,003	0,33 ± 0,001	0,22	0,74
9,33	0,168	51 ± 2	0,0434 ± 0,0004	0,421 ± 0,005	0,29	0,93
10,17	0,215	48 ± 3	0,02 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,14	0,74
11,00	0,276	36 ± 4	0,033 ± 0,002	0,300 ± 0,006	0,22	0,67
12,00	0,387	20 ± 2	0,02 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,14	0,63
12,67	0,444	8 ± 1	0,03 ± 0,02	0,312 ± 0,008	0,21	0,70

* – não se encontra na fase exponencial do crescimento

Tabela 3.38 – Medidas de absorvância (A), de intensidade de corrente de pico (I_p) e razão entre a área de cada pico do ácido láctico e de arabinose (A_p/A_a) em amostras de sobrenadantes de culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo ácido láctico recolhidas em diferentes tempos de crescimento (t).

t (h)	A	$-I_p$ (nA)	A_p / A_a				C / %	
			Componente 1	Componente 2	Ácido láctico 1	Ácido láctico 2	Ácido láctico 1 $\pm 0,05$ %	Ácido láctico 2 $\pm 0,01$ %
Meio c/ ácido láctico	0,000	65 \pm 4	n.d	n.d	0,10 \pm 0,00	0,30 \pm 0,00	0,65	0,67
1,00*	0,022	55 \pm 4	0,02 \pm 0,02	0,015 \pm 0,003	0,059 \pm 0,002	0,304 \pm 0,004	0,39	0,68
2,83*	0,022	54 \pm 5	n.d	0,0187 \pm 0,0002	0,063 \pm 0,003	0,316 \pm 0,002	0,42	0,70
23,83	0,161	47 \pm 4	0,0117 \pm 0,0001	0,0156 \pm 0,0003	0,060 \pm 0,003	0,2883 \pm 0,0005	0,40	0,64
24,75	0,174	46 \pm 3	0,0096 \pm 0,0002	n.d	0,0539 \pm 0,0004	0,250 \pm 0,001	0,36	0,56
29,58	0,301	22 \pm 4	0,0117 \pm 0,0002	0,006 \pm 0,004	0,039 \pm 0,001	0,155 \pm 0,002	0,27	0,35
30,83	0,347	18 \pm 2	0,018 \pm 0,002	0,015 \pm 0,002	0,057 \pm 0,002	0,213 \pm 0,007	0,38	0,48
32,00	0,409	16 \pm 3	0,0157 \pm 0,0007	0,008 \pm 0,003	0,0411 \pm 0,0007	0,151 \pm 0,003	0,28	0,34
33,00	0,444	10 \pm 2	0,018 \pm 0,002	0,008 \pm 0,003	0,0506 \pm 0,0001	0,2 \pm 0,1	0,34	0,45

n. d – não detectado.

* – não se encontra na fase exponencial do crescimento.

O estudo efectuado por cromatografia não permite assim identificar os compostos responsáveis pela resposta electroquímica observada nas culturas de *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meio K.

Os resultados obtidos por HPLC em amostras de sobrenadantes das culturas de ambas as espécies em meio contendo ácido láctico não foram considerados em análises posteriores devido aos resultados não apresentarem uma variação concordante com os obtidos por voltametria.

De modo a certificar a perda ou decomposição da amostra durante o processo de armazenamento analisou-se uma amostra de sobrenadante de células de *Candida utilis*, por voltametria de onda quadrada. Como se pode verificar, na figura 3.44, o voltamograma registado no sobrenadante da cultura é semelhante ao registado na cultura de células.

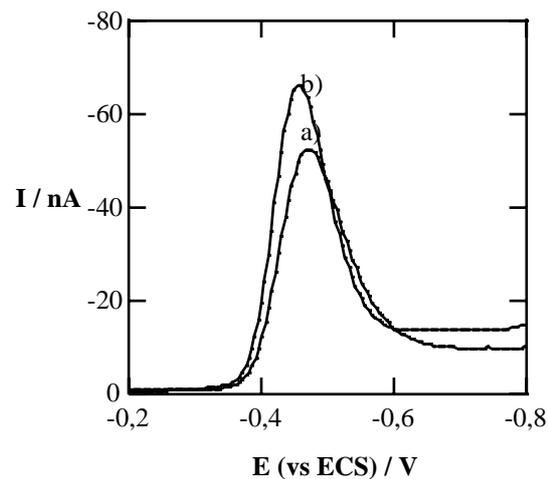
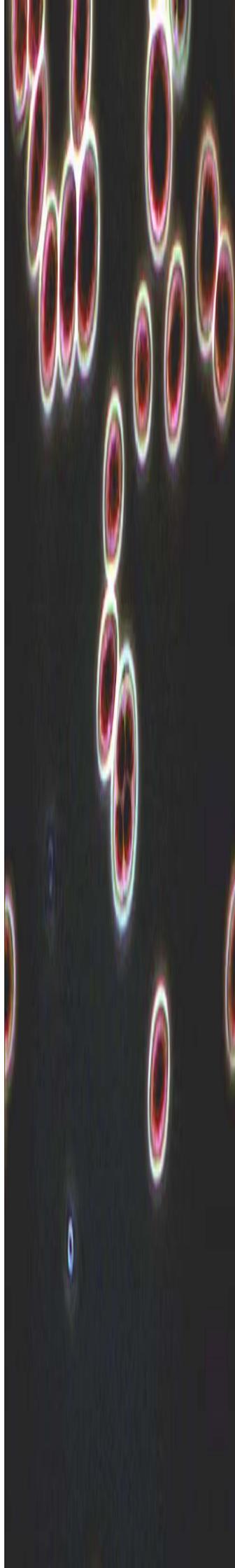


Figura 3.44 – Voltamogramas de onda quadrada de uma amostra de sobrenadantes (a) e da cultura de células de *Candida utilis* em meio K correspondente (b) obtidos com um microeléctrodo de 25 μm .

Capítulo IV

Conclusão



Conclusão

Neste trabalho foram realizadas medidas voltamétricas, potenciométricas e turbidimétricas em culturas de células das leveduras *Candida utilis* e *Saccharomyces cerevisiae* em meios contendo como fonte de carbono a glucose, o etanol e o ácido láctico, com o objectivo de implementar um método electroquímico alternativo para estimar o crescimento microbiano.

O crescimento das leveduras provoca variações das respostas voltamétricas em culturas de células, relacionadas com a redução electroquímica de ácidos.

Nos meios em que se utiliza como fonte de carbono a glucose e o etanol verifica-se que o aumento do sinal correspondente à redução dos ácidos está associado ao aumento da biomassa celular e ao aumento da concentração de H^+ . No meio contendo ácido láctico verifica-se que a diminuição do sinal relativo à redução do ácido láctico se relaciona com o aumento do número de células e com o aumento do pH.

Tendo em consideração os limites de quantificação e linearidade determinados através das técnicas voltamétricas e com os microeléctrodos de diferentes dimensões, obtiveram-se correlações lineares entre os resultados obtidos, com os microeléctrodos, através das duas técnicas voltamétricas e através da absorvância e intensidade de corrente.

As correlações obtidas entre a concentração de H^+ do meio de cultura foram melhores no caso da *Candida utilis* em meio K sugerindo que nestas condições ocorre a produção de ácidos mais fortes que os produzidos pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes dados estão de acordo com os valores mais baixos, em valor absoluto de E_p e de $E_{1/2}$ obtidos nas culturas de *Candida utilis*.

De uma forma geral foi possível analisar o crescimento das leveduras por métodos voltamétricos em todos os meios de cultura. Os valores das taxas específicas de

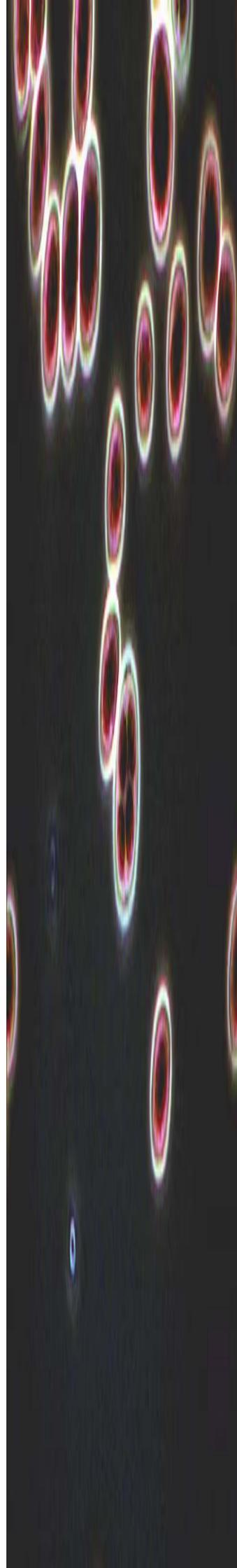
crescimento estimadas pelos métodos voltamétricos foram idênticos aos obtidos pelo método turbidimétrico.

A análise dos componentes presentes nas culturas das leveduras por HPLC permitiu relacionar o crescimento das células com o consumo da fonte de carbono presente nos meios de cultura. Foi possível identificar a produção de compostos como o etanol, o ácido málico e o ácido acético pelas culturas de leveduras. No entanto, não foi possível estabelecer uma correlação entre os ácidos identificados e as respostas electroquímicas, medidas nas culturas de células.

Foram ainda detectados dois componentes nas culturas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* em meio contendo meio láctico, cuja origem não foi possível identificar.

Capítulo V

Bibliografía



Bibliografia

- 1 – M.F. Bento, “Estudos com Microelctrodos em Soluções de Concentração de Electrólito Reduzida”, Tese de Doutoramento, Universidade do Minho, 1996.
- 2 – C. Amatore, “Electrochemistry at Ultramicroelectrodes” em *Physical Electrochemistry: Principles, Methods and Applications*, Ed. I. Rubinstein, M. Dekker, New York, 1995.
- 3 – M.I. Montenegro, M.A. Queirós e J. L. Daschbach (Eds), “Microelectrodes: Theory and Applications”, Nato ASI Series, vol. 107, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1991.
- 4 – Newman, J. *Electrochem. Soc.*, 113, 1966, 501.
- 5 – C. Amatore, M.F. Bento e M.I. Montenegro, *Anal. Chem.*, 67, 1995, 2800.
- 6 – J. Robinson, “Microelectrodes” em *New Techniques for the Study of Electrodes and their Reactions*, Vol. 29, Eds. R.G. Compton e A. Hamett, Elsevier, Amsterdam, 1989.
- 7 – R. Greef, R. Peat, L.M. Peter, D. Pletcher e J. Robinson, “Instrumental Methods in Electrochemistry”, Ellis Horwood, Southampton, 1993.
- 8 – E. Gileadi, “Electrode Kinetics for Chemists, Chemical Engineers and Material Scientists”, New York, 1993.
- 9 – A.C. Fisher, *Electrode Dynamics*, Oxford University Press, n.º 34, 1996.
- 10 – J. Wang, *Anal. Chem.*, 54, 1982, 221.
- 11 – A. Aoki, T. Matsue e I. Uchida, *Anal. Chem.*, 62, 1990, 2206.
- 12 – J.B. Zimmerman e R.W. Wightman, *Anal. Chem.*, 63, 1991, 24.
- 13 – R.A. Saraceno e A.G. Ewing, *Anal. Chem.*, 60, 1998, 2016.
- 14 – R.M. Wightman, R.T. Kennedy, D.J. Wiedenam, K.T. Kawagoe, J.B. Zimmerman e D.J. Leszczysyn, na referência 3, pag 453.
- 15 – F. Bailey, T. Malinski e F. Kiechle, *Anal. Chem.*, 63, 1991, 395.

- 16 – T.M. Oleofirwicz e A.G. Ewing, *Anal. Chem.*, 62, 1990, 1872.
- 17 – B.J. Feldman, J.D. Osterloh, B.H. Hata e A. D' Alessandro, *Anal. Chem.*, 66, 1994, 1983.
- 18 – J-M. Zen e J-S. Tang, *Anal. Chem.*, 67, 1995, 1892.
- 19 – O. Nieto, P. Hernández e L. Hernández, *Talanta*, 43, 1996, 1281.
- 20 – S.C. Lemoult, Y. Cheng, K. Kontturi e D.J. Schiffrin, *Electrochem. Commun.*, 2, 2000, 244.
- 21 – J. Feng, Y.X. Ci, C.M. Gao e Y.Z. Li, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 44, 1997, 89.
- 22 – Y.X. Ci, J. Feng, Z.W. Jiang e D.Z. Luo, *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 43, 1997, 293.
- 23 – M.I. Montenegro, na referência 3 pag. 249.
- 24 – S. Daniele, M. A Baldo, P. Ugo e G.A. Mazzochin, *Anal. Chim. Acta*, 219, 1989, 9.
- 25 – K.R. Wehmeyer e R.M. Wightman, *Anal. Chem.*, 57, 1985, 1989.
- 26 – M. Ciszowska e Z. Stojek, *J. Electroanal. Chem.*, 213, 1986, 189.
- 27 – R.A. Saraceno e A.G. Ewing, *Anal. Chem.*, 60, 1988, 206.
- 28 – D.J. Wiedemann, K.T. Kawagoe, R.T. Kennedy, E.L. Ciolkowski e R.M. Wightman, *Anal. Chem.*, 63, 1991, 2965.
- 29 – S. Daniele, M.A. Baldo, P. Ugo e G.A. Mazzochin, *J. Electroanal. Chem.*, 295, 1990, 95.
- 30 – G.T. Cheek e R. Mowery, *Anal. Chem.*, 61, 1989, 1467.
- 31 – S.S. Wang, *J. Electroanal. Chem. Soc.*, 136, 1989, 713.
- 32 – J. Wang e P. Tuzhi, *Anal. Chim. Acta*, 197, 1987, 367.
- 33 – M.I. Montenegro, *Applications of Microelectrodes in Kinetics em Research in Chemical Kinetics*, cap. 2, Eds: R. G Compton. EG. Hacock, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- 34 – C.P. Andrieux, P. Hapiot e J-M. Savéant, *Chem. Rev.*, 90, 1990, 723.
- 35 – D.E. Williams, na referência 4, pag. 415.
- 36 – N.E. Murr, C.P. Jones e D.E. Williams, UK Atomic Energy Authority Harwell Laboratory Report AEREM-3664, 1989.

- 37 – S. Daniele, M.A. Baldo, P. Ugo e G.A. Mazzochin, *Anal. Chim. Acta*, 238, 1990, 357.
- 38 – M.L. Agüí, A.J. Reviejo, P. Yáñez-Sedeño e J.M. Pingarrón, *Anal. Chem.*, 67, 1995, 2195.
- 39 – S. Daniele, M.A. Baldo, C. Bragato e I. Lavaginini, *Anal. Chim. Acta*, 361, 1998, 141.
- 40 – S. Daniele, C. Bragato, M.A. Baldo, G. Mori e M. Giannetto, *Anal. Chim. Acta*, 432, 2001, 27.
- 41 – E.M. Romeno, “Microbiologia General”, Centro de investigación sobre fijación de nitrógeno, <http://www.biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/>.
- 42 – R. Leite, “Leveduras”, <http://members.fortunecity.com/rl/levedura.htm>.
- 43 – M.C.C. Ferreira, “Toxicidade do Etanol e dos Ácidos Acético, Sórbito e Benzoico na levedura *Dekkara anomala*”, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, 1998.
- 44 – J.L. Arnold, J.S. Knapp e C.L. Johnson, Pergamon, 34, 2000, 3699.
- 45 – P. Christen, F. Domenech, J. Páca e S. Revah, *Bioresource Technol.*, 68, 1999, 193.
- 46 – S. Elmaheh, M.B. Defrance e C.Ghommidh, *Proc. Biochem.*, 35, 1999, 441.
- 47 – P. Christen, F. Domenech e G. Michelena, *J. Hazard. Mat.*, 389, 2002, 253.
- 48 – P.T Olesen e L.H. Stahnke, *Meat Sci.*, 56, 2000, 357.
- 49 – <http://www.biologicabrasil.com.br/frames/corpo/bonatrophen.htm>.
- 50 – <http://www.emedix.com.br/not2000/00mai24asm-grf-envelhecimento.shtml>.
- 51 – R.W. Suñé, P.R.F. Mühlbach e C.M. J. Eggleton, “Efeito da levedura *Saccharomyces cerevisiae* sobre a produção de leite”, <http://www.cnpqc.embrapa.br/biblioteca/bovleite/nutri/sb97296.html>.
- 52 – <http://www.geocitie.com/fermentacao301/econo.htm>.
- 53 – T.D. Brock e M.T. Madigan, *Biology of Microorganisms*, 6ª edição, Prentice-Hall International, Inc. New Jersey, 1991.
- 54 – R.Y. Stanier, J.L. Ingraham, M.L. Wheelis e P.R. Painter, “Microbiologia”, 2ª edição, Barcelona, 1991.
- 55 – M. Peclczar, R. Reid e E.C. Chan, “Microbiologia”, vol. 1, Mc Graw-Hill, São Paulo, 1980.
- 56 – D.A. Skoog, F.J. Holler e T.A. Nieman, “Principles of Instrumental Analysis”, 5ª edição, Saunders Golden Sunburst Series, 1998.

-
- 57 – C. Beriet, “Microelectrode Studies In Low Ionic Strength Media”, Tese de Doutoramento, Universidade de Southampton, November, 1993.
- 58 – M. Ciszowska, A. Jaworski e J.G. Osteryoung, *J. Electroanal. Chem.*, 423, 1997, 95.
- 59 – A.H. Rose e J.S. Harrison, “The Yeasts: Physiology and Biochemistry of Yeasts”, Academic Press., London e New York, 1971.
- 60 – A.J. Bard e L.R. Faulker, “Electrochemical Methods, Fundamentals and applications”, Wiley, New York, 1980.
- 61 – M.M.S. Azevedo, “Estudos sobre a utilização de fontes de carbono e energia pela levedura *Dekkera anomala* com vista à optimização do seu crescimento”, Tese de Mestrado, Universidade do Minho, 1997.