



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA**

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76  
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**  
**COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

## **XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2023**

### **ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A CONCENTRAÇÃO DE LEVEDURAS EM DENSIDADE ÓTICA ( $G.L^{-1}$ ) E EM CÂMARA DE NEUBAUER ( $CEL.ML^{-1}$ )**

**Emerson de Souza dos Santos Brandão<sup>1</sup>; Marília Lordelo Cardoso Silva<sup>2</sup>; Fátima Luscher Albinati<sup>3</sup>; Tamires Bastos de Almeida<sup>4</sup> e Ernesto Acosta Martinez<sup>5</sup>**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [emersonbrandao773@gmail.com](mailto:emersonbrandao773@gmail.com)
2. Orientador, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [mlcsilva@uefs.br](mailto:mlcsilva@uefs.br)
3. Participante do projeto, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [flalbinati@uefs.br](mailto:flalbinati@uefs.br)
4. Participante do projeto, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [tamires.b.a@outlook.com](mailto:tamires.b.a@outlook.com)
5. Participante do projeto, Departamento de Tecnologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: [ernesto.amartinez@uefs.br](mailto:ernesto.amartinez@uefs.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** Levedura; concentração celular; hidromel.

### **INTRODUÇÃO**

As leveduras são fungos dos quais muitos são utilizados na produção de alimentos e bebidas a partir de uma fermentação, na qual ocorre a conversão de açúcares em álcool e gás carbônico. Esses microrganismos são muito importantes, pelo seu grande uso nas indústrias alimentícias e farmacêuticas, estando presentes em processos, como, produção de bebidas fermentadas (cervejas, vinhos, sidras e hidromel), de pães, e de queijos, na biodegradação, no tratamento de efluentes e na atividade enzimática (Abreu; Rovida; Pamphile, 2015; Oliveira et al., 2022).

Segundo Carvalho et al., (2016), o cultivo de leveduras utilizadas em pesquisas é realizado geralmente em meios sólidos ou em frascos agitados, já que as leveduras conseguem se desenvolver favoravelmente em suspensão, com temperaturas em torno de 25-30°C.

A viabilidade celular de leveduras pode ser utilizada para estimar a proporção de células viáveis em uma cultura ou processos fermentativos, geralmente os métodos mais empregados para determinar a viabilidade celular são a coloração das células da levedura com azul de metileno e o cultivo por plaqueamento (Vieira; Fernandes, 2012). Além disso, pode-se utilizar a análise da turbidez para estimar a concentração celular de uma cultura microbiana. Esse método consiste na dispersão de um feixe de luz que está focado em uma suspensão microbiana, sendo que a transmitância é medida por recurso de um espectrofotômetro, já a densidade óptica se baseia na interação da luz com as partículas em suspensão, ou seja, com a quantidade de luz absorvida pela partícula (Mira et al., 2022; Fukuda, 2023).

Dessa forma, o presente trabalho teve como principal objetivo correlacionar a concentração celular em  $g.L^{-1}$  e em células. $ML^{-1}$  de diferentes cepas de leveduras, como, *Saccharomyces bayanus* Premier Cuvée e *Saccharomyces cerevisiae* Premier Côte des Blancs e Montrachet, que podem ser utilizadas para a produção de bebidas fermentadas usando mosto de mel como meio fermentativo.

## MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

### Ativação da levedura:

As leveduras foram ativadas através da diluição do mel, utilizando-se água destilada esterilizada até um teor de sólidos solúveis de 30° Brix, as leveduras foram inoculadas neste meio e mantidas sob agitação (150 rpm) à temperatura de 30°C por 24 h.

### Curva padrão de crescimento celular em espectrofotômetro:

Após a ativação das leveduras alíquotas de 10 mL do mosto foram filtradas, em triplicata, em membranas de 0,45 mm (Millipore) utilizando bomba à vácuo, em seguida as membranas foram incubadas em estufa a 60°C e pesadas até peso constante. O restante do mosto preparado foi centrifugado a 3500 rpm por 15 min, o sobrenadante foi descartado e, as células ressuspensas em alíquotas de solução salina (0,9%) até atingir o volume de 10 mL. A partir dessa suspensão de células foram realizadas diluições nas concentrações de 1:10, 1:25, 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000 e 1:2000, e determinadas a densidade óptica (DO) com leitura da absorbância no comprimento de onda de 600 nm em espectrofotômetro UV/Vis Femto Modelo 600 Plus.

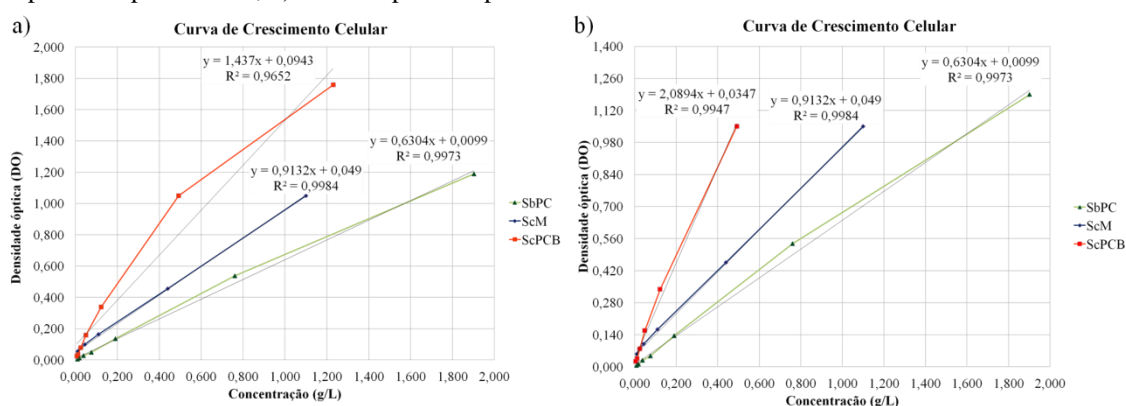
### Contagem celular em Câmara de Neubauer

A concentração celular (células.mL<sup>-1</sup>) foi determinada a partir de contagem em câmara de Neubauer, e a para determinação das células viáveis e não viáveis, foi utilizado o Método Internacional de Coloração, utilizando azul de metileno segundo ASBC (1996).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A curva padrão para a cepa *S. cerevisiae* Premier Côte des Blancs (ScPCB) assim como para *S. cerevisiae* Montrachet (ScM) e, *S. bayanus* Premier Cuvée (SbPC) estão apresentadas na Figura 1a. A retirada de um ponto experimental (densidade óptica 1,758) permitiu um melhor ajuste da curva usada para calcular a concentração celular em g.L<sup>-1</sup> (Figura 1b).

**Figura 1:** Correlação entre densidade óptica (DO) 600nm e concentração celular em g.L<sup>-1</sup>, a) com todos os pontos experimentais; b) com um ponto experimental a menos.



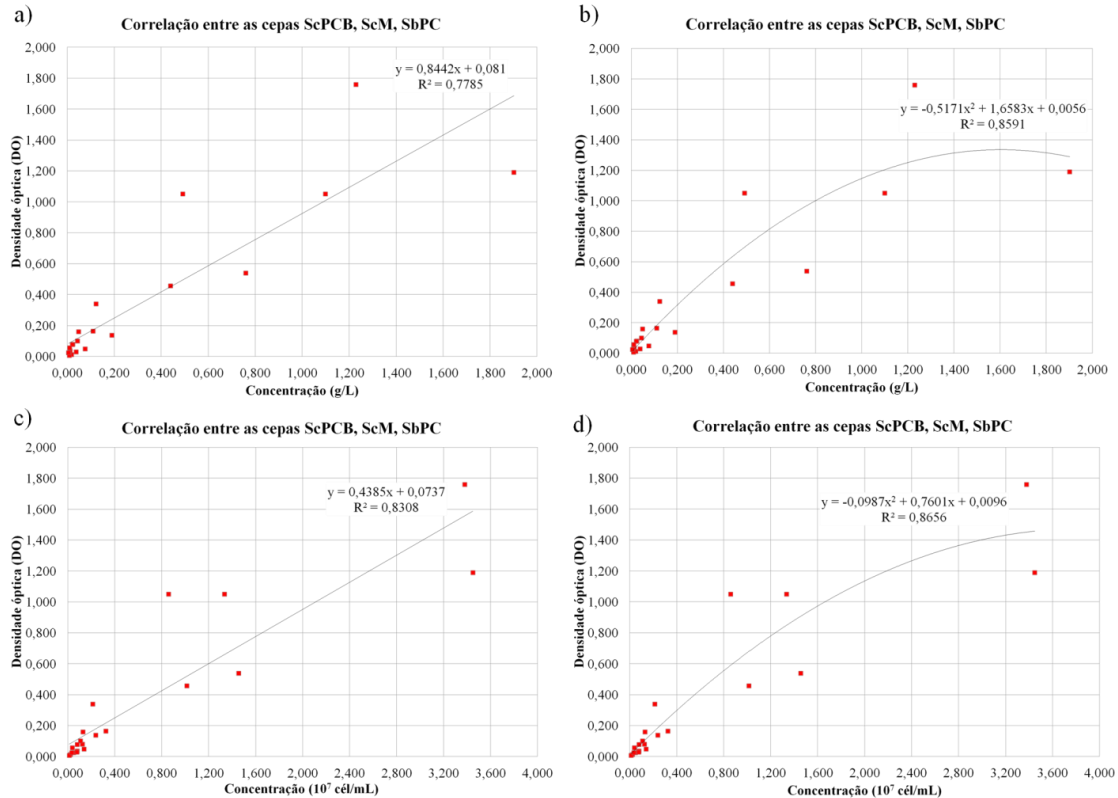
Considerando todos os dados experimentais é possível verificar que das três leveduras analisadas, as curvas para a Premier Cuvée ( $R^2 = 0,9973$ ) e a Montrachet ( $R^2 = 0,9984$ ) apresentaram melhor ajuste quando comparada com a Premier Côte des Blancs ( $R^2 = 0,9652$ ) (Figura 1a). Para a levedura Premier Côte des Blancs quando retirado um ponto experimental o ajuste linear da curva foi melhorado, chegando a um  $R^2$  de 0,9947 (Figura 1b).

Há poucos trabalhos acadêmicos na literatura que reportam os resultados de concentração celular na unidade de g.L<sup>-1</sup>. Entre eles, Queiroz et al., (2023), avaliaram o

crescimento celular de uma cepa de *Saccharomyces bayanus* durante a produção de melomel usando polpa de jaca hidrolisada, pólen e extrato de farelo de arroz como suplementos não convencionais.

As correlações entre a densidade óptica e a concentração celular em  $\text{g.L}^{-1}$ , e em  $\text{cél.mL}^{-1}$ , usando os dados experimentais das três cepas está apresentado na Figura 2.

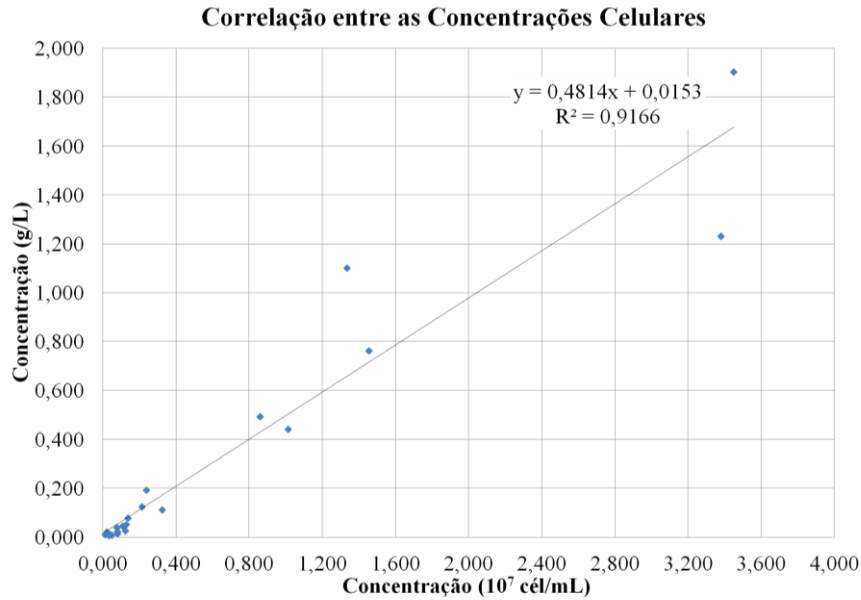
**Figura 2:** a) e b) correlação entre DO 600nm e a concentração em  $\text{g.L}^{-1}$ , a) ajuste linear, b) ajuste polinomial; c) e d) correlação entre DO 600nm e a concentração em  $\text{cél.mL}^{-1}$ , c) ajuste linear; d) ajuste polinomial.



O melhor ajuste da curva para a correlação da concentração celular em  $\text{g.L}^{-1}$ , foi obtido com um ajuste polinomial,  $R^2 = 0,8591$ , enquanto que com o ajuste linear o  $R^2$  foi de apenas 0,7785 (Figuras 2a, b). O mesmo ocorre no ajuste da curva para a correlação da concentração em  $\text{cél.mL}^{-1}$ , com valores de  $R^2$  de 0,8308 e 0,8656 para a equação linear e polinomial, respectivamente.

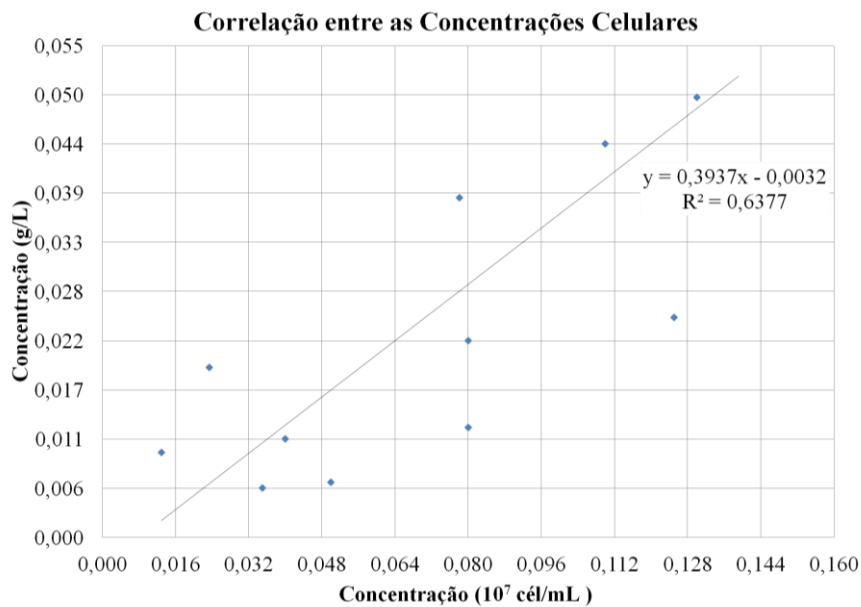
Na Figura 3 é apresentado o gráfico com a correlação entre as concentrações celular em  $\text{g.L}^{-1}$  e  $\text{cél.mL}^{-1}$  para as três cepas de leveduras. O ajuste linear da curva apresentou um bom ajuste ( $R^2 = 0,9166$ ). A partir da correlação percebe-se que  $0,600 \text{ g.L}^{-1}$  é o equivalente a uma concentração celular de aproximadamente  $1,200 \times 10^7 \text{ células.mL}^{-1}$ . Dessa forma, 1 única célula pode ser equivalente a  $5,000 \times 10^{-11} \text{ g}$ .

**Figura 3:** Correlação entre a concentração em g.L<sup>-1</sup> e a concentração em cél.mL<sup>-1</sup> para as três cepas.



Analisando a Figura 3 é possível verificar que a maior quantidade de pontos se encontra na região abaixo da concentração de  $0,200 \times 10^7$  cél.mL<sup>-1</sup>, sendo assim, na Figura 4 é apresentado o mesmo gráfico da Figura 3, porém de forma reduzida, sendo possível observar melhor os pontos abaixo da região de  $0,200 \times 10^7$  cél.mL<sup>-1</sup>. Considerando-se um ajuste lineal, com intercepto aproximadamente igual a 0, foi verificado um ajuste com correlação ( $R^2$ ) igual a 0,6377. Para melhorar o ajuste seriam necessários realizar uma maior quantidade de determinações de concentração celular assim como obter a curva de absorbância x peso seco para outras leveduras utilizadas nos processos de fermentação alcoólica. Assim, poderemos ter uma equação que permita realizar a transformação dos dados de concentração celular reportados na literatura e compara-los.

**Figura 4:** Correlação entre a concentração em g.L<sup>-1</sup> e a concentração em cél.mL<sup>-1</sup> abaixo da concentração de  $0,200 \times 10^7$  cél.mL<sup>-1</sup>, para as três cepas.



## CONCLUSÃO

Foi possível obter a correlação da concentração celular em g.L<sup>-1</sup> e em cél.mL<sup>-1</sup> para três cepas de leveduras utilizadas na produção de hidromel. Para melhorar o coeficiente de correlação entre as medidas de concentração celular deve-se aumentar a quantidade de pontos experimentais e utilizar outras cepas de leveduras.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, J. A. S.; ROVIDA, A. F. S.; PAMPHILE, J. A. Fungos de interesse: aplicações biotecnológicas. **UNINGÁ Review**, Maringá, PR, v. 21, n. 1, p. 55-59, jan./mar. 2015.
- CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1 parte – as leveduras. **Revista Analytica**, São Paulo, n. 25, p. 36 – 42, out. 2006.
- FUKUDA, N. Apparent diameter and cell density of yeast strains with different ploidy. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1513, 2023. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-023-28800-z>>. Acessado em: 26 jun. de 2023.
- MIRA, P. et al. Estimating microbial population data from optical density. **Plos One**, v. 17, n. 10, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0276040>>. Acesso em: 02 jul. de 2023.
- OLIVEIRA, V. M. et al. Microorganisms: the secret agents of the biosphere, and their key roles in biotechnology. **Biota Neotropica**, v. 22, p. 1 - 10, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/1676-0611-BN-2022-1343>>. Acessado em: 01 jul. de 2023.
- QUEIROZ, E. L. et al. Melomel Production by *Saccharomyces bayanus* Using Hydrolyzed Jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) Pulp, Pollen, and Rice (*Oryza sativa*) Bran Extract as Unconventional Supplements. **Industrial biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 151-162. 15 jun. de 2023. Disponível em: <<https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/ind.2023.0005>>. Acessado em: 01 set. de 2023.
- VIEIRA, D. A. P.; FERNANDES, N. C. A. Q. **Microbiologia Aplicada**. Inhumas: IFG, 2012.