

1. *Introdução Geral*

Ciclo de vida de um bioprocesso: produção, controlo de qualidade e inativação.

- Porque fermentamos?
- Porque analisamos?
- Porque inativamos as células?

Os bioprocessos industriais seguem um ciclo de vida estruturado que envolve três etapas fundamentais: produção, controlo de qualidade/análises e inativação. Cada fase é essencial para garantir que os produtos obtidos são eficazes, seguros e produzidos de forma reproduzível.

1. Produzimos porque a biotecnologia utiliza microrganismos, células como “fábricas vivas” capazes de gerar compostos de interesse — desde proteínas recombinantes, como a proteína recombinante da celulase com GFP como gene repórter, usada neste trabalho, até metabolitos da fermentação, como ácidos orgânicos, etanol, aromas ou compostos bioativos, presentes nas bebidas fermentadas. A etapa de fermentação representa o núcleo do bioprocesso: é aqui que se formam os produtos desejados, e onde variáveis como pH, temperatura, nutrientes e tempo alteram diretamente o rendimento e a eficiência.
2. Analisamos porque qualquer bioprocesso necessita de mecanismos de controlo de qualidade que permitam medir/identificar o que está a ser produzido, verificar a pureza do produto, etc. Técnicas como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permitem identificar e quantificar metabolitos-chave, como os ácidos orgânicos presentes em bebidas fermentadas. A análise é essencial para validar o desempenho do processo, comparar condições experimentais e garantir que o produto final cumpre os requisitos esperados.
3. Inativamos porque, após a produção e a análise, é necessário garantir a biossegurança e o descarte adequado das culturas microbianas. A inativação térmica permite eliminar ou reduzir significativamente a viabilidade das células, minimizando riscos biológicos e assegurando conformidade com boas práticas laboratoriais. Esta etapa constitui o encerramento natural do ciclo de vida de um bioprocesso, assegurando a proteção dos utilizadores e do ambiente.

Em conjunto, estas três fases — fermentação, análise e inativação — representam a sequência lógica e integrada de qualquer bioprocesso. Nas seguintes atividades, os estudantes exploram cada uma delas através: da produção de celulase recombinante com GFP, em fermentação com meio autoindutor; da análise cromatográfica de ácidos orgânicos em bebidas fermentadas produzidas em

aulas anteriores, e da avaliação da morte celular por tratamento térmico, compreendendo de forma aplicada como se desenha, monitoriza e encerra um bioprocesso.

Parte I — Produção em reator (GFP)

Resultados: curva de crescimento, fluorescência, rendimento em proteína recombinante

O procarionte *Escherichia coli* é amplamente utilizado na produção de proteínas heterólogas devido ao seu rápido crescimento, facilidade de manipulação genética e elevada produtividade. Neste contexto, a produção de proteínas fluorescentes, como a GFP (*Green Fluorescent Protein*), constitui uma ferramenta fundamental em biotecnologia, permitindo monitorizar a expressão génica, otimizar condições de cultivo e desenvolver processos de produção de proteínas recombinantes.

A expressão de proteínas recombinantes em *E. coli* é frequentemente regulada por sistemas induutíveis associados ao operão *lac*. Tradicionalmente, a indução é realizada com IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranósido), um análogo não metabolizável da lactose que se liga ao repressor LacI, promovendo a transcrição do gene de interesse. No entanto, em processos de maior escala ou em contextos de otimização de processos, é vantajoso recorrer a meios autoindutores, nos quais a própria composição do meio controla o momento da indução.

Nestes meios, a combinação de diferentes fontes de carbono (por exemplo, glucose ou glicerol e lactose) permite separar uma fase inicial de crescimento preferencial (suportada por glucose e/ou glicerol) de uma fase posterior em que a lactose passa a ser utilizada como fonte de carbono e, simultaneamente, como indutor da expressão da proteína recombinante. Desta forma, a expressão de GFP é desencadeada de forma progressiva, sem necessidade de adição de IPTG, simplificando a operação do processo em biorreator.

Objetivos

Neste trabalho laboratorial pretende-se estudar o crescimento de *E. coli* recombinante expressando GFP num biorreator descontínuo de 2 L, utilizando um meio autoindutor contendo lactose. Pretende-se acompanhar a cinética de crescimento e produção de GFP ao longo do tempo, recorrendo à medição da densidade ótica (DO₆₀₀) e da fluorescência (medido em microplaca no RT-pcr), de forma a relacionar o perfil de expressão com as condições de cultivo e a composição do meio.

Procedimento

1. Preparação do meio autoindutor (1500 mL)

1.1. Composição base (escala para 1550 mL)

- Luria Bertani em pó: 31 g
- Na₂HPO₄: 9,3 g
- KH₂PO₄: 4,7 g
- Água destilada q.b. 1550 mL

Misturar bem até dissolução completa. Autoclavar a 121º C durante 15 min. Distribuir previamente o volume por erlenmywers para autoclavar. Preparar 1 erlenmeyer (30 ml de meio nutritivo)

- Após arrefecimento do meio à temperatura ambiente: Adicionar canamicina para uma concentração final de 50 µg/mL, sob condições assépticas para cada volume de meio nos erlenmeyers.

1.2 Fontes de carbono (meio autoindutor) para 750 ml de meio nutritivo:

- Solução de glicerol 50% (v/v): 18 mL
- Solução de glucose 10% (m/v): 7,5 mL

- Solução de lactose 5% (m/v): 60 mL

Adicionar as soluções de 1.2 ao meio base (cerca de 650 ml) após esterilização e acertar volume final nos 750 ml só quando inocuar.

2. Preparação do pré-inóculo (8h)

(com 30 mL de LB + kanamicina 50 µg/mL).

1. Inocular com a estirpe recombinante de *E. coli* contendo o plasmídeo com GFP, e incubar 8h a 37°C com agitação (180–220 rpm).
2. No dia do ensaio em biorreator, medir a DO₆₀₀ e garantir que a cultura está em fase adequada (tipicamente fim de exponencial/início da fase estacionária).

O volume de inóculo deverá ser 2% (v/v) do volume de trabalho do biorreator:

- Volume de trabalho: 1500 mL, logo volume de inóculo: $0.02 \times 1500 \text{ mL} = 30 \text{ mL}$

3. Esterilização do reator e introdução do meio (véspera da aula).

Na câmara de fluxo, preparar um volume de 720 ml de meio nutritivo com canamicina, incluindo o inóculo (30 ml).

Inoculação do reator (esterilizado previamente em autoclave) à chama com os 750 ml.

Deixar crescer *overnight*, a 37°C, com agitação mecânica. Ler D.O. no tempo zero e cerca de 1h depois. Ler pH, e temperatura sempre que fizer leituras.

4. Adicionar meio autoindutor ao bioreator à chama

Tirar amostra do meio e ver em que fase estão as células. Se estiverem com cerca de 3 de D.O., adicionar os 750 ml de meio autoindutor ao vaso do bioretor à chama.

5. Amostragem e análises

Ao longo da fermentação:

1. Amostragem
 - Recolher pequenos volumes (ex.: 1-2 mL) em intervalos regulares (ex.: de 30 em 30 min ou de 1 em 1 h, conforme o tempo disponível em aula).
2. Medição de DO₆₀₀
 - Diluir a amostra, se necessário.
 - Medir a absorvância a 600 nm para estimar a concentração celular.
3. Medição da fluorescência
 - Medir a fluorescência da GFP em fluorímetro ou equipamento de Real-Time PCR, com:
 - Excitação ~488 nm
 - Emissão ~509 nm

Tratamento de resultados

Os estudantes deverão:

- Construir curvas de crescimento (DO₆₀₀ vs. tempo).
- Construir curvas de produção de GFP (fluorescência vs. tempo).
- Se possível, calcular fluorescência específica (fluorescência/DO₆₀₀).
- Identificar:
 - fase de crescimento exponencial
 - momento de início de aumento significativo de fluorescência (ligado à ação da lactose como autoindutor)
 - eventual fase de plateau na produção de GFP.

Parte II — Caracterização analítica por HPLC
Quantificação dos ácidos orgânicos →
exemplo de controlo analítico num processo fermentado.

Os ácidos orgânicos desempenham um papel central na qualidade sensorial, estabilidade, segurança e caracterização química de bebidas naturais e fermentadas. Estes compostos influenciam a acidez, o aroma, o sabor, o equilíbrio microbiológico e o perfil de fermentação, constituindo marcadores químicos importantes para processos biológicos e tecnológicos. A sua quantificação é, por isso, essencial tanto em contexto industrial como em análises laboratoriais de controlo de qualidade ou investigação académica.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é uma técnica analítica amplamente utilizada para a separação e quantificação de compostos orgânicos em matrizes complexas. É particularmente indicada para ácidos orgânicos devido à sua elevada sensibilidade, reproduzibilidade e capacidade de separar componentes estruturalmente semelhantes presentes em misturas complexas como sumos de fruta, kombucha, hidromel ou outras bebidas fermentadas. Em fase reversa (RP-HPLC), utilizando uma coluna C18, os ácidos orgânicos podem ser separados com recurso a fases móveis aquosas acidificadas (pH 2–3) e detetados por UV, geralmente a comprimentos de onda baixos (210–220 nm), onde estes compostos apresentam absorvância significativa devido aos grupos carboxilo.

Ácidos orgânicos mais comuns em bebidas naturais e fermentadas

A composição em ácidos orgânicos varia de acordo com a matéria-prima (fruta, mel, chá, cereais), o tipo de fermentação (láctica, acética, alcoólica) e os microrganismos envolvidos. Alguns dos ácidos mais relevantes incluem:

- Ácido cítrico – muito abundante em frutos tropicais e cítricos; contribui para acidez intensa e frescura.
- Ácido mágico – comum em maçã, romã e frutos vermelhos; confere sabor mais “verde” ou ácido.
- Ácido tartárico – predominante na uva; presente também em pequenas quantidades noutras frutas.
- Ácido láctico – indicador de fermentação láctica (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*); encontrado em kombucha, bebidas fermentadas e hidromel secundariamente fermentado.
- Ácido acético – resultante de fermentação acética; presença típica em kombucha e bebidas expostas à oxidação.
- Ácido succínico – gerado por leveduras durante a fermentação alcoólica.
- Ácido glucónico/ ácido acético – característicos do SCOPY da kombucha (bactérias acéticas).

Composição típica por bebida

- Sumo de ananás
Rico em ácido cítrico, com quantidades menores de mágico e succínico.
- Sumo de frutos vermelhos (ex.: morango, framboesa, mirtilo)

Predominância de ácido cítrico e málico, podendo conter pequenas quantidades de ácido benzoico natural.

- Sumo de ameixa

Concentrações relevantes de ácido málico, cítrico e quínico (3,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico); perfil mais equilibrado.

- Sumo de romã

Rico em ácido málico e cítrico; presença de ácido succínico e, ocasionalmente, tânico.

- Hidromel (bebida fermentada de mel)

Antes da fermentação contém poucos ácidos; após fermentação surgem:

– ácido láctico, succínico, acético e pequenas quantidades de gluconato.

- Kombucha

Apresenta um dos perfis mais complexos devido ao SCOBY:

– ácido acético, gluconato, láctico, málico e traços de cítrico. O ácido acético é normalmente dominante.

A cromatografia líquida de alta eficiência – HPLC

A cromatografia é uma técnica largamente utilizada para a separação, identificação e quantificação de compostos químicos em amostras complexas. É difícil definir rigorosamente o significado do termo *Cromatografia* pois engloba uma grande variedade de sistemas e técnicas. No entanto, todos estes métodos têm em comum o uso de uma fase estacionária e de uma fase móvel. Os componentes constituintes de uma amostra (solutos), são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel líquida (se for gasosa, estamos a referir-nos à cromatografia gasosa, GC). As separações são baseadas na diferença de velocidade de migração dos vários componentes da amostra. A eficiência de uma coluna cromatográfica na separação de dois ou mais solutos depende numa amostra depende da relação entre as velocidades com que as espécies a separar são eluídas. Estas velocidades são, por sua vez determinadas pelas razões de distribuição de solutos entre as duas fases (móvel e estacionária). O cromatograma construído após a análise, pode ter um ou mais picos, dependendo da quantidade de compostos existentes na amostra e dos seus tempos de retenção (quando eluem da coluna), que se referem ao tempo contado desde a injeção da amostra até ao aparecimento do pico, no cromatograma, representado por t_R . O tempo de retenção depende das interações diferenciais dos solutos e da fase móvel com a fase estacionária, podendo ser do tipo: dispersivas (hidrofóbicas); polares (dipolo; pontes de hidrogénio); iónicas, Figura 2.

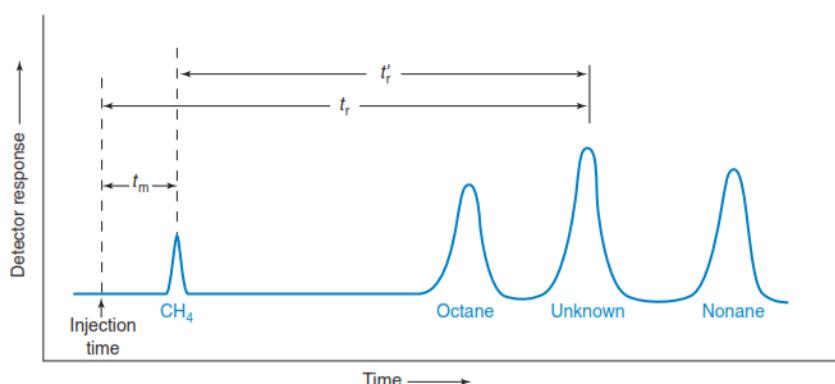


Figura 2. Exemplo de um chromatograma, onde está indicado o t_R (tempo de retenção) e o t'_R (tempo de retenção corrigido) para o tempo de retenção do volume morto da coluna (t_m).

No presente trabalho vai-se recorrer a uma coluna C-18, cujo revestimento é apolar ou pouco polar. O HPLC de fase reversa é uma técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High-Performance Liquid Chromatography) onde a fase estacionária (coluna) é apolar e a fase móvel (solvente) é polar. É uma das abordagens mais comuns de HPLC devido à sua versatilidade e eficiência na separação de compostos com uma ampla gama de polaridades.

Componentes e Funcionamento

1. Fase Estacionária (coluna):

- A coluna de cromatográfica é geralmente uma coluna de metal que é preenchida com um adsorvente, tipicamente partículas de sílica porosas de 3 a 10 µm: fase estacionária.
- É revestida com materiais apolares, como cadeias de hidrocarbonetos longas (C18 ou C8). No caso do presente trabalho é uma coluna C18.
- Como a fase estacionária pode ser parcialmente solúvel na fase móvel, pode eluir ao longo do tempo. Para evitar a perda da fase estacionária, que encurta o tempo de vida da coluna, liga-se a fase estacionária covalentemente às partículas de sílica. Exemplo: uma coluna C18 tem grupos n-octadecil ligados.

2. Fase Móvel (solvente):

- Geralmente é uma mistura polar, como água com metanol ou acetonitrilo.
- O pH da fase móvel pode ser controlado para proteger a integridade da coluna e melhorar a separação.

3. Separação dos Compostos:

- Compostos apolares têm maior afinidade com a fase estacionária (apolar) e são retidos por mais tempo.
- Compostos polares interagem preferencialmente com a fase móvel (polar) e eluem mais rapidamente da coluna.

Principais Características

- **Interações predominantes:** forças hidrofóbicas entre os compostos apolares da amostra e a coluna.
- **Uso:** ideal para compostos orgânicos e moléculas apolares ou com baixa polaridade (e.g., cafeína, fármacos, lipídios).
- **Facilidade de utilização:** a fase reversa é amplamente usada devido à disponibilidade de colunas padrão e à solubilidade de muitos compostos orgânicos na fase móvel.

Vantagens do HPLC de Fase Reversa

1. **Versatilidade:** cobre uma ampla gama de compostos.
2. **Reprodutibilidade:** permite obter separações consistentes.
3. **Simplicidade:** fases móveis baseadas em água são seguras e de fácil manipulação.

Alguns problemas mais frequentes na técnica de HPLC são:

- Picos distorcidos;
- Baixa retenção dos compostos polares e pouco resolvidos;
- Tempo para desenvolver o método;

- Diferentes polaridades na amostra;
- Estabilidade das colunas;
- Limites de deteção reduzidos;
- Temperatura (todas as separações devem ser feitas a temperatura controlada).

A técnica de HPLC permite, não só fazer uma análise qualitativa, mas também quantitativa. A análise qualitativa permite reconhecer a presença ou ausência de outros componentes, para além do analito que se usa como padrão ou que se quer quantificar, numa dada amostra em análise, como uma bebida. É importante notar que embora um cromatograma possa não levar à identificação de um dado analito numa amostra, deverá garantir a ausência da espécie (a menos que tenha outro analito com o mesmo tempo de retenção na amostra). Assim, quando uma amostra não apresenta um pico com o tempo de retenção de um padrão obtido nas mesmas condições, tal indica que o composto em questão não está presente, ou está presente numa concentração abaixo do limite de deteção do método.

A técnica de HPLC envolve quatro componentes principais:

- O sistema de entrega de solvente (fase móvel), que transporta as amostras através da coluna, sendo bastante importante pois a polaridade afeta a capacidade do sistema para separar as moléculas.
- As propriedades da fase estacionária dependem do grupo alquílico do organossilano. Se R é um grupo funcional polar, então a fase estacionária é polar. Exemplos de fases estacionárias polares incluem aquelas em que R contém um grupo funcional ciano ($-C_2H_4CN$), diol ($-C_3H_6OCH_2CHOHCH_2OH$) ou amino ($-C_3H_6NH_2$). Como a fase estacionária é polar, a fase móvel é um solvente não polar ou moderadamente polar. A combinação de uma fase polar estacionária e uma fase móvel não polar é designada por cromatografia de fase normal.
- Na cromatografia de fase reversa, que é a forma mais comum de HPLC, a fase estacionária é apolar e a fase móvel é polar. As fases estacionárias não-polares mais comuns utilizam um organoclorossilano em que o grupo R é uma cadeia de hidrocarbonetos n-octilo (C_8) ou n-octildecil (C_{18}). A maioria das separações de fase reversa é realizada usando uma solução aquosa tamponada como uma fase móvel polar, ou com outros solventes polares, tais como metanol e acetonitrilo. Como o substrato de sílica pode sofrer hidrólise em soluções básicas, o pH da fase móvel deve ser inferior a 7,5.
- O sistema de introdução da amostra é constituído por uma espécie de porta de injeção para introduzir a amostra a ser analisada para o sistema de entrega de solvente. Normalmente é utilizada uma injeção em Loop de volume fixo.
- O tipo de detetor utilizado depende do tipo de amostra e dos compostos dos quais se pretende isolar. Detetores vulgarmente usados são de UV-Visível, espetroscopia de massa, índices de refração, ou detetores de fluorescência, entre outros.

De uma forma resumida o procedimento para a análise de HPLC é o seguinte: primeiro liga-se o detetor, forno; sistema de injeção; as bombas (que são usadas para adicionar pressão ao mover a fase móvel através da fase estacionária), e o computador que irá gravar o cromatograma.

No computador deverá escolher e introduzir o programa adequado (definir o fluxo ou caudal do eluente, definir o comprimento de onda a que fará a deteção, definir o tempo de duração da corrida e a composição do solvente ao longo da análise: método isocrático ou de gradiente), a fim de recolher os dados desejados.

Antes de qualquer análise/corrida, deverá primeiro limpar, com o solvente que vai usar, as linhas e tubagens por onde irá passar o solvente antes de entrar para a coluna. Este processo serve para remover todas as bolhas de ar que estejam presentes e garantir que quando se iniciar a análise de HPLC, a fase móvel que está a entrar na coluna é o solvente desejado e não outro líquido que foi usado noutra análise anterior. Este passo é chamado de WASH e alguns programas de computador de controlo cromatográfico têm esta função automática. Noutros sistemas/aparelhos é necessário efetuar de modo manual, abrindo válvulas de purga para curte-circuitar a entrada do solvente na coluna.

Depois deve equilibrar a coluna com a fase móvel usando o mesmo fluxo que irá usar durante as corridas.

O sistema de HPLC que a utilizar é o Chromaster 5160 da Hitachi, que possui um sistema de injeção automático.

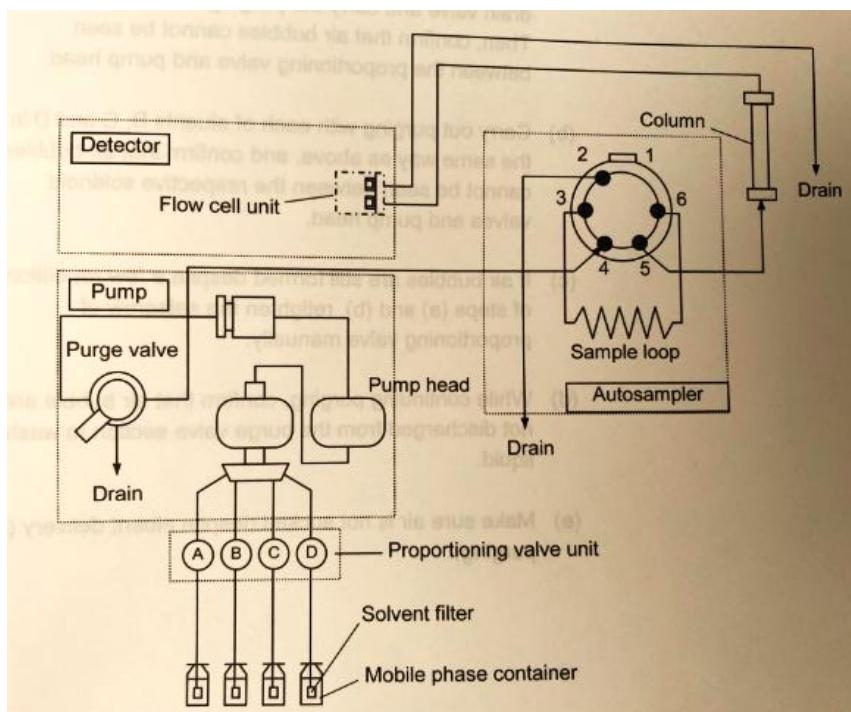


Figura 3. Diagrama do funcionamento do aparelho HPLC.

Para evitar aumentos de pressão súbitos ou má resolução de picos, deverá sempre filtrar todas as soluções que aplicar na coluna: tanto o solvente, como as amostras, usando filtros de $0.22\text{ }\mu\text{m}$. Para além de filtrado, o solvente deve também ser desarejado (particularmente importante no caso de análise de amostras gaseificadas). Todos os solventes usados em análises de HPLC devem ser de muito elevada pureza.

A identificação de compostos faz-se por comparação dos t_R dos compostos puros ou padrões, de composição conhecida e analisando-as segundo o mesmo procedimento.

Quantificação direta

A quantificação dos compostos faz-se através da integração dos picos, ou seja, através do cálculo da área do pico. Este cálculo é feito pelo computador. A área do pico de um composto, por exemplo

do ácido acético, é diretamente proporcional à sua concentração na solução analisada. Para converter áreas de picos em concentrações deve ser efetuada uma curva de calibração para um dado padrão (ou ácido orgânico) (vide Figura 4).

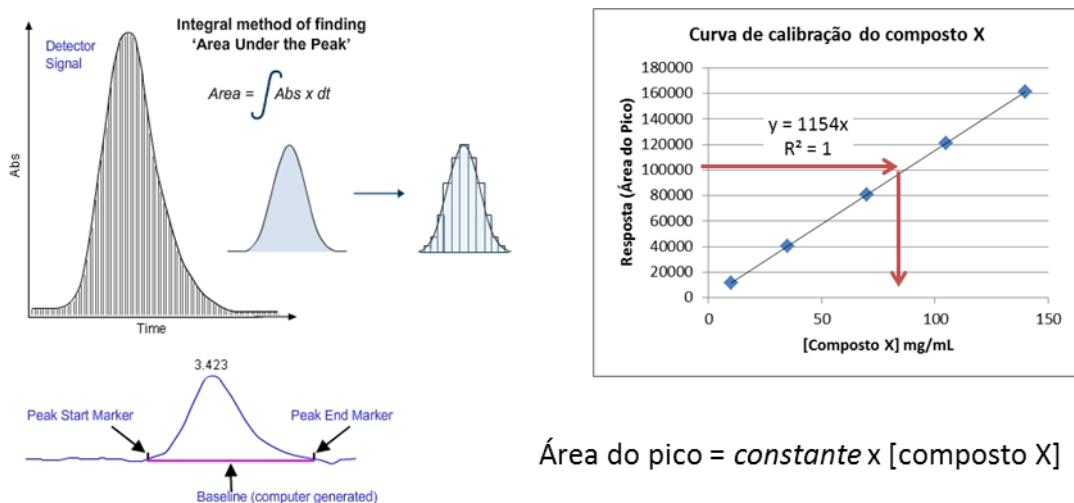


Figura 4. Integração do sinal e cálculo da concentração através da curva de calibração do composto X.

Objetivos:

- Consolidar os princípios da análise HPLC.
- Interpretar um cromatograma e usar as informações para determinar os componentes de uma mistura, bem como a concentração desses componentes.
- Analisar a qualidade o processo de separação com os parâmetros eficiência, seletividade e resolução.
- Interpretar e explicar o efeito da polaridade do solvente nos tempos de retenção e parâmetros do processo de separação.

Procedimento Experimental

Materiais, Reagentes e Equipamentos

- Sistema HPLC com detetor UV-Vis.
- Coluna de fase reversa C18 (, 125 mm × 4,6 mm, 5 µm).
- Filtros 0,22 µm
- Vials para preparar as soluções a analisar (as soluções são preparadas para um volume final de 1ml, num eppendorf e depois filtradas para o respetivo vial)
- Gobelés (atenção para reduzir o risco de impurezas passar primeiro por água destilada)
- micropipetas e pontas (P1000; P200; P20)
- Todos os reagentes a usar deverão ser grau de pureza HPLC (água, metanol e acetonitrilo)
- Soluções desconhecidas (bebidas fermentadas produzidas).

HPLC e método

- Coluna C18, 125 mm × 4,6 mm, 5 µm.
- Fase móvel: KH₂PO₄ 10 mM, pH 2,2 (ajustar com H₃PO₄), filtrada e desgaseificada.
- Modo isocrático.
- Caudal: 0,7 mL/min.
- Temp. coluna: 25°C.
- Detetor UV: 220 nm.
- Volume de injeção: 10–20 µL.
- Tempo de corrida: 10 min (permite ver bem todos os ácidos).

Padrões e soluções

- Solução padrão mista de ácidos orgânicos (já preparada com as concentrações conhecidas).
- Fase móvel em volume suficiente para a atividade.
- Filtros 0,22 µm, seringas, vials e tampas de HPLC.

Padrões de Calibração

Os padrões de ácidos orgânicos a partir da solução-mãe cada um 1mg/ml (em 25 ml de fase móvel) já foram preparados num volume final de 1 ml:

- Concentrações: 10, 20, 50, 75e 100 µg/mL.

Amostras

1. Realize diluições das bebidas a analisar de 1/10 e 1/20 (frutos vermelhos ou româ) na fase móvel, em Eppendorfs para um volume final de 1 ml.

2. Filtre as amostras (cerca de 1 ml, com filtro 0.22 µm) para os vials.

Análise qualitativa da amostra por HPLC

- Ligue o aparelho de HPLC (*vide* instruções no documento em anexo).
- Introduza o método de análise e registe todas as condições.
 - Composição do eluente (fase móvel)
 - Caudal do eluente
 - Especificações da coluna (marca, modelo, comprimento, diâmetro)
 - Tempo da corrida, Temperatura.
- Limpe as linhas antes de começar a análise das amostras. Verifique se há líquido suficiente nos reagentes (linhas A, B, C e D e linhas S1 e S2). Identifique as linhas para o seu caderno de laboratório.
- No final, não se esqueça de confirmar que a bomba está parada.
- Limpe a seringa, a agulha, e outros componentes do injetor antes da análise.
- No controlo manual da bomba, programe a composição e fluxo de solvente pretendido de 0.3 mL/min e verifique se a Pressão está estabilizada.
- Ligue a bomba e equilibre a coluna com o solvente
 - **Fase móvel:** KH₂PO₄ 10 mM, pH 2,2 (ajustar com H₃PO).
 - **Caudal:** 0,8 mL/min.
 - **Comprimento de onda do detetor:** 220 nm.
 - **Tempo de corrida:** 10 minutos.
- Limpe as linhas com a fase móvel e purgue as bolhas de ar.
- Equilibre a coluna com a fase móvel durante 5 minutos.
- Registe a pressão na coluna no início do trabalho e verifique que não varia ao longo da aula.
- Coloque **um dos vials** de cada uma das diluições no suporte e registe a sua posição na *sample table*
- Proceda à análise. O Professor irá decidir quais as amostras/padrões a testar.

Tratamento dos resultados

Curva de Calibração

1. Construa a curva de calibração (área do pico vs. concentração de padrão).
2. Utilize ajuste linear para obter as equações da reta para cada padrão.

Determinação do Teor de ácidos orgânicos

1. Utilize a equação da curva para calcular a concentração de cada ácido nas amostras.

Com base no seu cromatograma calcule e comente:

- A eficiência da coluna
- A seletividade entre picos
- A resolução entre picos

Ácidos orgânicos típicos e respetivas concentrações (g/L)

Valores ajustados para bebidas fermentadas por **levedura** (24–72 h), sem fermentação acética.

Sumo fermentado de ANANÁS (com levedura)

Ácidos principais:

Ácido	Concentração típica (g/L)
Cítrico	4–10
Málico	0,5–2
Glicónico (se oxidação mínima)	0–1
Succínico (produzido pela levedura)	0,3–1,5
Acético	0,1–0,6

Frutos Vermelhos (misto de frutos vermelhos / frutos silvestres)

Ácidos muito característicos:

Ácido	Concentração (g/L)
Cítrico	5–9
Málico	1–3
Quínico	0,5–4
Succínico	0,2–1,2
Acético	0,1–0,5

Ameixa fermentada

Ácidos principais antes da fermentação: **málico** e **quínico**.

Após fermentação: aumento de **succínico** + leve acético.

Ácido	Concentração (g/L)
Málico	3–10
Quínico	1–5
Succínico	0,2–1,0
Acético	0,1–0,5
Cítrico	traços ($\leq 0,3$)

Romã fermentada

A romã tem um perfil muito distinto: **málico + cítrico + succínico**.

Ácido	Concentração (g/L)
Cítrico	1–3
Málico	2–5

Ácido	Concentração (g/L)
Succínico	0,3–1,5
Acético	0,1–0,5
Tartárico	traços ($\leq 0,1$)

Hidromel (mosto de mel + água, fermentado por levedura)

O mel tem muito poucos ácidos. A fermentação é que os cria.

Ácido	Concentração (g/L)
Succínico	0,4–1,8
Acético	0,2–1,0
Láctico	0,1–0,5 (se contaminação leve de LAB, caso contrário pode ser traços)
Málico	traços ($\leq 0,2$)
Cítrico	traços ($\leq 0,1$)

Hidromel é normalmente o menos ácido.

“Kombucha” só com levedura (sem bactérias acéticas)

Só com levedura tem um perfil diferente da verdadeira kombucha.

Ácido	Concentração (g/L)
Succínico	0,3–1,2
Acético	0,1–0,5
Glicónico	0–0,3
Láctico	traços, se houver contaminação

Sem bactérias acéticas, o **acético não ultrapassa 0,5 g/L**.

Dicas para a análise

- 3 Os ácidos orgânicos mais úteis para todas as bebidas:
- 4 Cítrico
- 5 Málico
- 6 Succínico
- 7 Acético
- 8 Detetor UV a 210 nm deteta todos bem.
- 9 Diluição 1:10 funciona para quase todas
- 10 Para frutos vermelhos ou ameixa, podes pedir 1:20.

11 Bibliografia

- (1) D. A. Skoog, (1992) Principles of Instrumental Analysis, 4th Edition, Saunders
- (2) D. C. Harris (2008) Análise Química Quantitativa”, 7ª edição, LTC
- (3) Wanyika, H.N. et al. (2010) Determination of caffeine content of tea and instant brands found in the Kenyan market”, *African Journal of food science*, 4: 353-358.

Anexo

Procedimento do HPLC: instruções base

1. Ligar e iniciar o computador

User: LABEQB

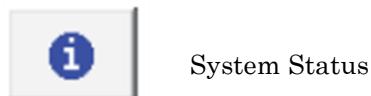
Password: LABEQB2024

Ligar o HPLC (de cima para baixo). Primeiro carregar no botão na parte lateral do tabuleiro dos reagentes- *Organizer*.

2. Abrir o software “Chromaster” no ambiente de trabalho do computador.



3. Selecionar o icon “i” “inicialize no Module Status”; → OK



4. Selecionar *Open File* e depois abrir *Application* “Biotecnologia”. Depois *Open File*- “Cafeína 2425”, dentro da pasta “Biotecnologia”.



5. Clicar no icon da bomba

Turn ON the pump;



6. “Module detailed Information” (realizar todas as etapas)



- Abrir a válvula da purga (manípulo para baixo);
- Washing pump purge;
- Clicar em Stop e fechar a torneira da purga (manípulo para cima)
- Clicar em start; (indicações de acordo com o método Solvente A e B x% (3 min).
- Close
- Autowashing faz lavagem automática; → close

7. Abrir “**Sample Table**” e preencher com o método escolhido, o nome das amostras e fazer *Append to table and Map* para preencher por ordem do tabuleiro na janela que se mostra abaixo. Guardar quando terminar em File/Save- *Table sample*;



Sample Table Setup functions

8. Fazer lavagem do Autosampler, no **Module Detail Information**:

- Washing Pump Purge: Wash solvent 1- Start and Stop.
- Needle Wash- 15s
- Rinse Port Wash-15s
- Syringe Purge: Wash stroke 3; Wash speed 4; Plunger Wash- washtime 15 s.

9. Clicar no icon “**Data Aquisition**” depois de colocar os vials com as amostras no devido lugar do tabuleiro (ordem que foi registada na table);

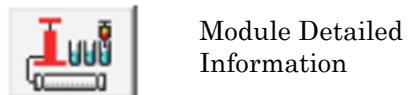


Acquire Data

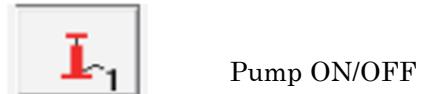
Nota: ligar a bomba previamente a 0.3 ml/min.

- Clicar em **Start Series** para iniciar a corrida das amostras pelo autosampler;

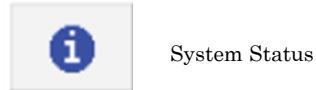
10. No final lavar o HPLC em **autowashing**;



11. Desligar a bomba no icon da pump



12. Disconnect Module status (i)



13. Desligar primeiro o software Chromaster e depois o HPLC sempre de cima para baixo.

Parte III — Inativação térmica

Resultados de sobrevivência, curvas, tempo/temperatura.

Introdução

Os estudos de crescimento bacterianos requerem a inoculação de células viáveis em meio estéril e a incubação da cultura sob condições ótimas de pH, temperatura, condições gasosas (anaeróbias ou aeróbias). Sob estas condições, as células vão reproduzir-se rapidamente e a dinâmica do crescimento microbiano pode ser representado na forma da curva de crescimento, na qual o número de células crescente é representado ao longo do tempo de incubação e pode ser usado para delinear estádios do crescimento. Esta curva também facilita a contabilização de números de células e a velocidade de crescimento de um dado microrganismo, sob condições standard como expresso pelo seu tempo de geração (tempo necessário para duplicar a população microbiana).

Diferentes espécies de microrganismos têm diferentes gamas de temperatura em que conseguem sobreviver e crescer. A temperaturas elevadas (superiores a 50°C no caso dos microrganismos mesófilos), a taxa específica de crescimento é muito inferior à taxa específica de morte ($\mu \ll K_d$) e a variação no tempo do número de sobreviventes (N_v) por exposição a uma temperatura elevada obedece, por isso, a uma cinética de 1^a ordem. A medida de redução do número de microrganismos viáveis produzida por um determinado regime de esterilização é representada pelo termo nabla, ∇ .

$$\frac{dN_v}{dt} = -K_D \cdot N_v \leftrightarrow N = N_0 \cdot e^{-K_M \cdot t}$$
$$\nabla = \ln \frac{N_{vi}}{N_v} = K_d \cdot t = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \cdot t$$

Em que K_D é a constante de morte térmica, N_{vi} é o nível de contaminação inicial e N_v a probabilidade de contaminação final. Quando se leva a cabo uma esterilização há que ter em conta que é impossível atingir um nível de esterilização absoluto, pois o número de sobreviventes diminui exponencialmente para zero ao longo do tempo à temperatura de esterilização.

As melhores esterilizações serão levadas a cabo a temperaturas elevadas durante curtos intervalos de tempo (HTST-“high temperature and short time”). No entanto, este conceito só pode ser materializado numa esterilização em contínuo. Em descontínuo, devido ao período de aquecimento e arrefecimento (que não são feitos à temperatura de esterilização) perde-se muito tempo a temperaturas relativamente altas que podem desativar os nutrientes, para além de também haver morte nestes períodos. Para além disso, o aquecimento e o arrefecimento de grandes volumes de soluções aquosas são operações lentas (muito mais demoradas que a esterilização propriamente

dita). Daqui se percebe que a esterilização em descontínuo não permite obedecer aos melhores critérios de esterilização. O empobrecimento da qualidade nutricional do meio torna-se assim inevitável, podendo ocorrer numa extensão muito significativa. A qualidade do meio é definida por:

$$\Lambda = \ln \frac{C_0}{C} = K_{\text{desnaturação}} \cdot t = A \cdot e^{\frac{-E_a}{RT}} \cdot t$$

Em que C_0 e C é a concentração do componente termolábil inicial e final, respetivamente e $K_{\text{desnaturação}}$ é a constante de desnaturação térmica do componente termolábil.

Uma vez fixada a probabilidade de contaminação após esterilização (N_v) e representando N_{vi} o número absoluto de contaminantes, é óbvio que o nabla aumenta com o volume de líquido a esterilizar. Para além disso, ∇ aumenta, quanto maior for a contaminação inicial e quanto maior for a nossa exigência. Para um dado valor de ∇ , consegue-se atingir o que se pretende através de uma combinação de diferentes valores de tempo e temperatura. Para temperaturas altas, o tempo diminui para atingir o mesmo ∇ .

Objetivo do trabalho prático

Este trabalho prático tem como principal objetivo estudar a eficiência da esterilização de culturas microbianas a várias temperaturas.

Procedimento

- 1.1 Preparar 2500 ml de *Yeast Extract Agar* de acordo com as indicações da embalagem. Para isso, medir a massa necessária para a solução referida e num copo adicionar 2500 ml de água destilada. Dissolver com agitação numa placa de agitação. Verter o preparado para frascos *Schott* de 1L. (já preparado)
- 1.2 Preparar 500 ml de água peptonada em água destilada, de acordo com as instruções da embalagem. Dissolver com agitação numa placa de agitação. Verter o preparado para 1 frasco *Schott* de 500 ml. (já preparado)
- 1.3 Preparar um rack com 40 falcons de 15 ml estéreis. (já preparado)
- 1.4 Esterilizar o preparado de 1.1 a 1.2. O preparado em 1.2 será usado na preparação de placas com meio de cultura. Quando o frasco *Schott* estiver com uma temperatura de cerca de 40-50°C, pode-se verter cerca de 25 ml para placas de cultura estéreis à chama ou na câmara de fluxo laminar. Logo que se verta, deve-se tapar para evitar contaminações. Esperar que o meio solidifique e arrefeça (30 min).
- 1.5 Crescer células de *Escherichia coli* a 37°C, em dois shake flasks de 250 com 100 ml de meio de cultura, na incubadora orbital com 220 rpm, *overnight*. (já preparados)

- 1.6 Ler a densidade ótica a 600 nm no Nanodrop das culturas. Esta amostra deve ser preparada na câmara de fluxo laminar. (previamente preparado)
- 1.7 Na câmra de fluxo laminar, medir 5 ml de meio de cultura para tubos falcon de 15 ml estéreis, correspondentes a 0, 5, 10, 20 e 40 min de tratamento térmico. Tapar logo os tubos e identificá-los. O tubo marcado com “0” não será sujeito ao tratamento térmico para morte celular.
- 1.8 Cada turno fará o tratamento térmico de morte celular a uma temperatura diferente.
 - 60 e 75 °C (turnos 4^a feira, manhã e tarde respetivamente).
 - 90 °C (turno 5^a feira tarde respetivamente).
- 1.9 Colocar o rack com os falcon identificados anteriormente no banho (exceto o tubo marcado com zero) e retirá-los do banho aos tempos marcados de 5, 10, 20 e 40 min. Arrefecê-los rapidamente com água corrente.
- 1.10 À chama, preparar as diluições em água peptonada estéril, nos tubos Eppendorf, que por sua vez, irão depender do tempo de esterilização. O esquema das diluições sucessivas encontra-se esquematizado nas figuras seguintes.

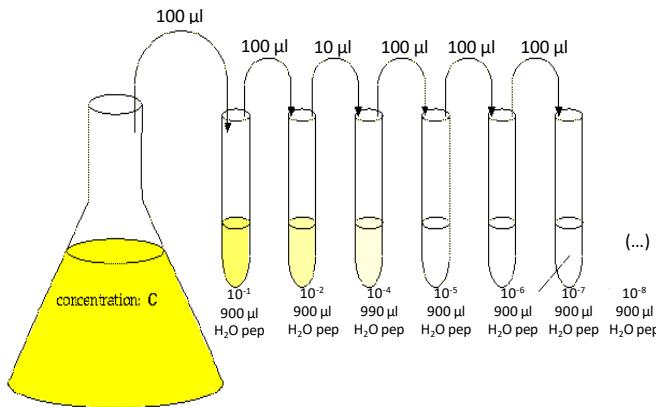


Figura 1- esquema das diluições sucessivas para o tubo zero (sem tratamento térmico).

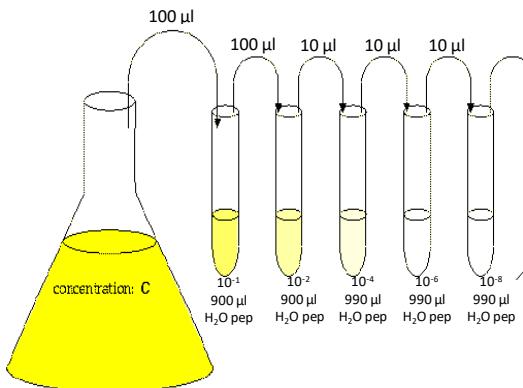


Figura 2- esquema das diluições sucessivas para o tubo 5 e 10 min.

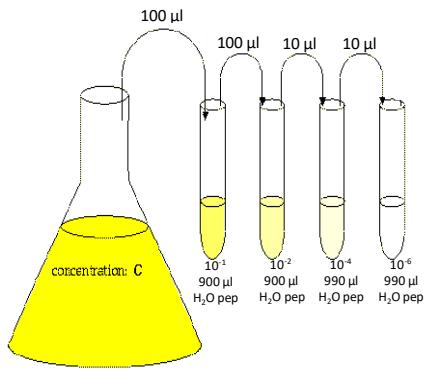


Figura 3- esquema das diluições sucessivas para o tubo 20 e 40 min.

1.11 Identificar cada placa (com cuidado para não a abrir) com: a temperatura, o tempo de esterilização, a diluição e a identificação do grupo/turno.

1.12 À chama, inocular cada placa com 50 µl, para a superfície do meio, no centro da placa. Com um espalhador estéril, espalhar o líquido por toda a placa, sem se aproximar dos seus limites. As placas a preparar serão de acordo com as diluições, referidas na seguinte tabela:

Tabela 1- Esquema das diluições a inocular na placa com meio de Yeast Extract Agar.

Sem esterilização	5 min	10 min	20 min	40 min
10^{-4}	0	0	0	0
10^{-5}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-1}	10^{-1}
10^{-6}	10^{-4}	10^{-4}	10^{-2}	10^{-2}
10^{-7}	10^{-6}	10^{-6}	10^{-4}	10^{-4}
10^{-8}	10^{-8}	10^{-8}	10^{-6}	10^{-6}

1.13 Deixar as placas a secar durante 30 min e depois colocá-las na estufa a crescer a 37°C durante 16 a 24h.

1.14 Após crescimento, as UFC/ml (unidades formadoras de colónias) são contabilizadas para cada diluição e para cada tempo de esterilização. Devem fazer o registo dos valores.

2. Tratamento de resultados e Discussão

2.1 Completar a tabela abaixo com o nº de UFCs em cada placa por ml para cada temperatura (cada grupo trabalha os dados de todos os grupos):

Tabela 2- Resultados do estudo dos tempos de esterilização para uma determinada temperatura. As células marcadas com "x" são para descartar.

Diluição	Tempo de esterilização (min)				Sem esterilização
	5	10	20	40	
0					x
10^{-1}	x	x			x
10^{-2}					x
10^{-4}					
10^{-5}	x	x	x	x	
10^{-6}					
10^{-7}	x	x	x	x	
10^{-8}			x	x	

2.2 Determine o nº de UFC/ml para cada tempo de esterilização na amostra original e a uma determinada temperatura e discuta/conclua em relação à duração e temperatura de morte celular mais eficaz.

2.3 Trace as curvas de “morte logarítmica” de $\ln N_{v0}/N$ versus tempo de esterilização a cada temperatura. Considere que um valor de D.O a 600 nm de 1 corresponde grosseiramente a 10^9 UFCs/ml. Determine a constante de morte celular às várias temperaturas (60, 75 e 90°C).

2.4 Face a uma probabilidade de contaminação de 10^{-3} , discuta qual a melhor temperatura para a morte celular, tendo em conta a qualidade nutricional do meio de crescimento.

Parte IV - Conclusões de cada uma das atividades laboratoriais (até 1.5 páginas no total dos 3 trabalhos)

Escrever um breve resumo das conclusões a que chegaram com os 3 trabalhos com base nos resultados das folhas de cálculo.