

## **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 reprodutível.

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 bioprocessos: 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 bioprocessos 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 bioprocessos, 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 bioprocessos. 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 bioprocessos.

## **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 indutíveis associados ao operão *lac*. Tradicionalmente, a indução é realizada com IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo), 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 (DO<sub>600</sub>) 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
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 9,3 g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 4,7 g
- Água destilada q.b. 1550 mL

Misturar bem até dissolução completa. Autoclavar a 121° C durante 15 min. Distribuir previamente o volume por erlenmeyers 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 so 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 DO<sub>600</sub> 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 DO<sub>600</sub>
  - 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 (DO<sub>600</sub> vs. tempo).
- Construir curvas de produção de GFP (fluorescência vs. tempo).
- Se possível, calcular fluorescência específica (fluorescência/DO<sub>600</sub>).
- 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, reprodutibilidade 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 málico – 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 SCOBY da kombucha (bactérias acéticas).

#### **Composição típica por bebida**

- Sumo de ananás

Rico em ácido cítrico, com quantidades menores de málico 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-trihidroxíciclohexanocarboxílico); 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.

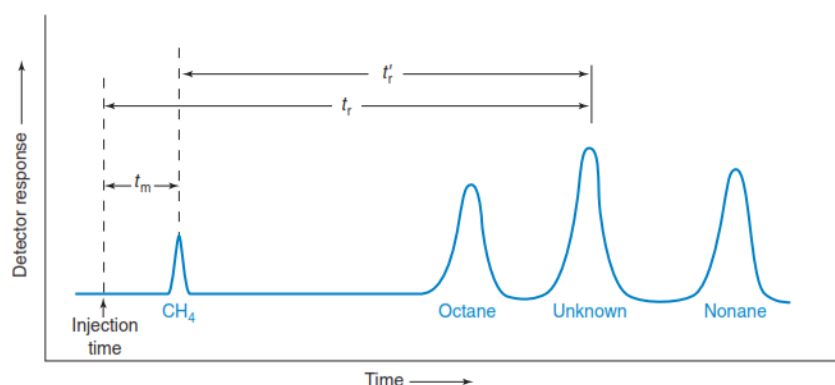
- Kombucha

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 cromatograma, 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 ( $-\text{C}_2\text{H}_4\text{CN}$ ), diol ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{OCH}_2\text{CHOHCH}_2\text{OH}$ ) ou amino ( $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ ). 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 ( $\text{C}_8$ ) ou n-octildecil ( $\text{C}_{18}$ ). 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, espectroscopia 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.

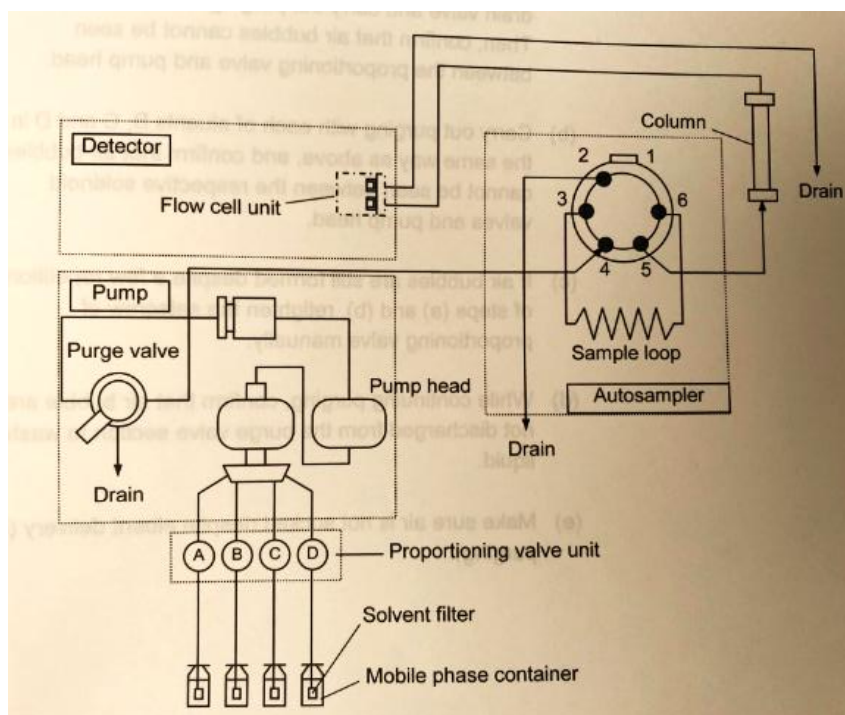
No computador deverá escolher e introduzir o programa adequado (definir o fluxo ou caudal do eluente, definir o comprimento de onda a que fará a deteção, definir o tempo de duração da corrida e a composição do solvente ao longo da análise: método isocrático ou de gradiente), a fim de recolher os dados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



Antes de qualquer análise/corrída, 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.

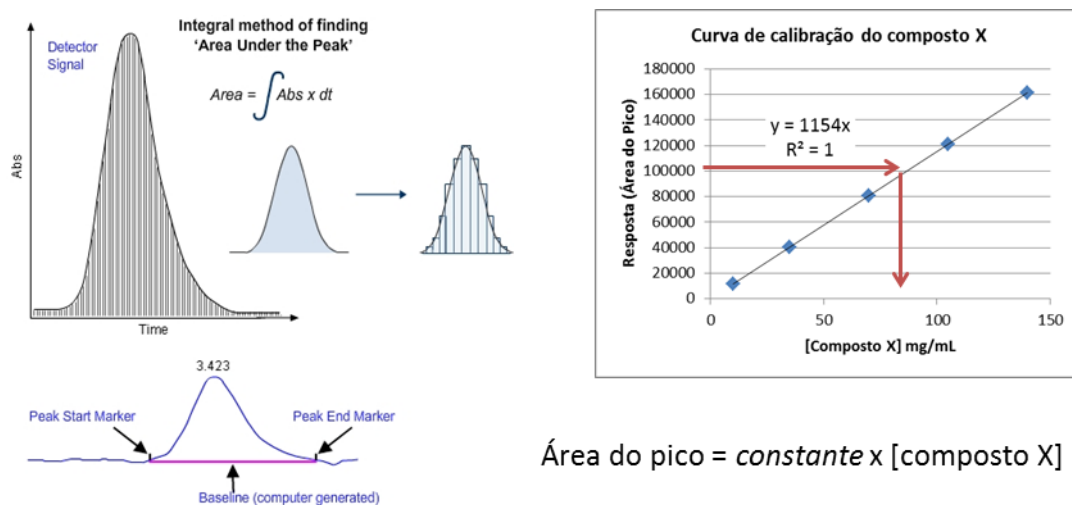
Para evitar aumentos de pressão súbitos ou má resolução de picos, deverá sempre filtrar todas as soluções que aplicar na coluna: tanto o solvente, como as amostras, usando filtros de 0.22  $\mu\text{m}$ . Para além de filtrado, o solvente deve também ser desarejado (particularmente importante no caso 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:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 2,2 (ajustar com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ), 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 romã) na fase móvel, em Eppendorfs para um volume final de 1 ml.

2. Filtre as amostras (cerca de 1 ml, com filtro 0.22  $\mu\text{m}$ ) 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 registre 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:**  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10 mM, pH 2,2 (ajustar com  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ).
  - **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 registre 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 respectivas 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)
<b>Cítrico</b>	4–10
<b>Málico</b>	0,5–2
<b>Glicónico</b> (se oxidação mínima)	0–1
<b>Succínico</b> (produzido pela levedura)	0,3–1,5
<b>Acético</b>	0,1–0,6

#### Frutos Vermelhos (misto de frutos vermelhos / frutos silvestres)

Ácidos muito característicos:

Ácido	Concentração (g/L)
<b>Cítrico</b>	5–9
<b>Málico</b>	1–3
<b>Quínico</b>	0,5–4
<b>Succínico</b>	0,2–1,2
<b>Acético</b>	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)
<b>Málico</b>	3–10
<b>Quínico</b>	1–5
<b>Succínico</b>	0,2–1,0
<b>Acético</b>	0,1–0,5
<b>Cítrico</b>	traços ( $\leq 0,3$ )

#### Romã fermentada

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

Ácido	Concentração (g/L)
<b>Cítrico</b>	1–3
<b>Málico</b>	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



System Status

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



Change Application

5. Clicar no icon da bomba

**Turn ON the pump;**



Pump ON/OFF

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



Module Detailed  
Information

- 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**;



Module Detailed  
Information

**11.** Desligar a bomba no icon da pump



Pump ON/OFF

**12.** Disconnect Module status (i)



System Status

**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 1ª 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  $N_v$  aumenta com o volume de líquido a esterilizar. Para além disso,  $\nabla$  aumenta, quanto maior for a contaminação inicial e quanto maior for a nossa exigência. Para um dado valor de  $\nabla$ , 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  $\nabla$ .

### 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)

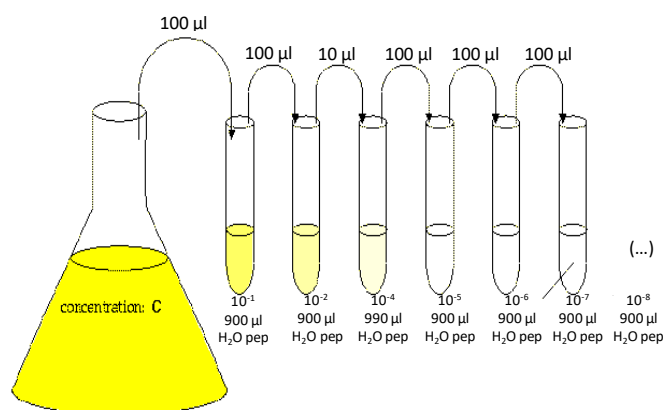
1.2 Preparar 500 ml de água peptonada em água destilada, de acordo com as instruções da embalagem. Dissolver com agitação numa placa de agitação. Verter o preparado para 1 frasco *Schott* de 500 ml. (já preparado)

1.3 Preparar um rack com 40 falcons de 15 ml estéreis. (já preparado)

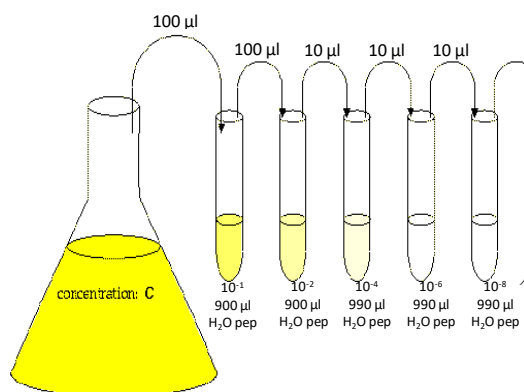
1.4 Esterilizar o preparado de 1.1 a 1.2. O preparado em 1.2 será usado na preparação de placas com meio de cultura. Quando o frasco *Schott* estiver com uma temperatura de cerca de 40-50°C, pode-se verter cerca de 25 ml para placas de cultura estéreis à chama ou na câmara de fluxo laminar. Logo que 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)

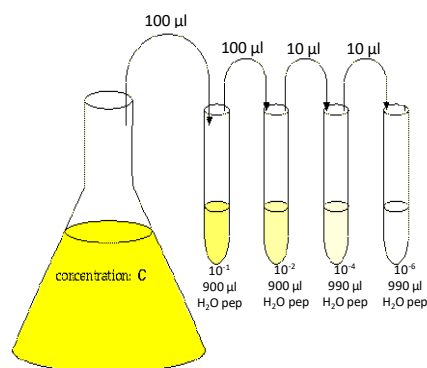
- 1.6 Ler a densidade ótica a 600 nm no Nanodrop das culturas. Esta amostra deve ser preparada na câmara de fluxo laminar. (previamente preparado)
- 1.7 Na câmara de fluxo laminar, medir 5 ml de meio de cultura para tubos falcon de 15 ml estéreis, correspondentes a 0, 5, 10, 20 e 40 min de tratamento 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 4ª feira, manhã e tarde respetivamente).
  - 90 °C (turno 5ª 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 <sup>-4</sup>	0	0	0	0
10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-1</sup>
10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-2</sup>
10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-4</sup>
10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-6</sup>

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 págs 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.