



DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE MEDIÇÃO EM TEMPO REAL,
POR ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA, CAPAZ DE DETERMINAR
A CONCENTRAÇÃO CELULAR

Marcos Antonio Salvino da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Biomédica.

Orientador: Marcio Nogueira de Souza

Rio de Janeiro
Junho de 2020

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE MEDIÇÃO EM TEMPO REAL,
POR ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA, CAPAZ DE DETERMINAR
A CONCENTRAÇÃO CELULAR

Marcos Antonio Salvino da Silva

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO
LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA
DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR
EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA BIOMÉDICA.

Orientador: Marcio Nogueira de Souza

Aprovada por: Prof. Marcio Nogueira de Souza
Prof. Alexandre Visintainer Pino
Prof^a. Andrea Medeiros Salgado
Prof. Pedro Lopes de Melo
Prof. Eduardo Borba Neves

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL
JUNHO DE 2020

Salvino da Silva, Marcos Antonio

Desenvolvimento de um sistema de Medição em Tempo Real, por Espectroscopia de Bioimpedância, Capaz de Determinar a Concentração Celular/Marcos Antonio Salvino da Silva. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2020.

XXIV, 175 p.: il.; 29, 7cm.

Orientador: Marcio Nogueira de Souza

Tese (doutorado) – UFRJ/COPPE/Programa de Engenharia Biomédica, 2020.

Referências Bibliográficas: p. 70 – 76.

1. Bioimpedância. 2. *Bacillus thuringiensis*. 3. *Saccharomyces cerevisiae*. 4. Bioprocesso. I. Souza, Marcio Nogueira de. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Biomédica. III. Título.

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais MANOEL SALVINO DA SILVA (in memoriam) e HELENA DA CONCEIÇÃO SÁ DA SILVA (in memoriam) por todos os esforços realizados em prol da minha educação e por todo amor e carinho.

A minha esposa GLAUCE DE MOURA VENTURA que é uma mulher sábia, por sua paciência nos meus vários momentos de ausência e introspecção, me acompanhou em todas as etapas no desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

Agradeço...

à DEUS por planejar e cuidar dos mínimos detalhes da minha vida, renovando minhas forças, energias e fé para acreditar em mais esta conquista;

aos meus pais que desde cedo me encorajaram a estudar e atingir meus objetivos;

à minha família, em especial à minha esposa GLAUCE VENTURA que compartilhou todas as angústias e vitórias durante o desenvolvimento deste trabalho;

à minha filha OLÍVIA HELENA pois com sua chegada encheu nossas vidas com um sentimento divino e aqueles sorrisos e abraços transbordantes de amor após o trabalho sempre me incentivaram e fortaleceram para continuar até atingir meu objetivo;

à Dra. ELIZABETH GOMES SANCHES, colega de trabalho e amiga, que muito me ajudou tanto na sugestão do tema quanto na atuação como coorientadora, esclarecendo-me sobre os assuntos da tese envolvendo bioprocessos, microbiologia, bioquímica entre outros e, também, pela cessão da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (**Bti**) para a realização dos experimentos conduzidos de um bioprocessos industrial de Farmanguinhos/Fiocruz;

ao meu orientador, Prof. D.Sc. MARCIO NOGUEIRA DE SOUZA, que apesar das inúmeras tarefas do Programa de Engenharia Biomédica (PEB) e do Laboratório de Instrumentação Biomédica (LIB), se dedicou para que este trabalho alcançasse seu objetivo;

aos professores do PEB que colaboraram com ideias, sugestões e críticas em nossas reuniões semanais;

ao professor emérito Ph.D. NEI PEREIRA JÚNIOR por permitir minhas “noitadas” em seu Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessos (LADEBIO), bem como a troca de ideias, sugestões e críticas nos seminários internos foram produtivas e úteis para minha tese;

aos meus colegas do PEB e do LIB, por toda ajuda, apoio durante o tempo de estudo e pelos bons momentos de conversas e cafés;

aos meus colegas do LADEBIO por toda ajuda com meus experimentos conduzidos e pelos bons momentos de conversas e cafés. Espero que eu possa retribuir toda a atenção dispensada colaborando em novos trabalhos;

a todos aqueles que, direta e indiretamente, contribuíram para a conclusão deste trabalho; e

a FAPERJ, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro ao meu programa, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

*“Não vos amoldeis ao padrão deste mundo, mas transformai-vos pela renovação da mente, para que sejais capazes de experimentar e comprovar a boa, agradável e perfeita vontade de DEUS”.
(Bíblia Sagrada, Romanos 12:2) .*

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE MEDIÇÃO EM TEMPO REAL,
POR ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA, CAPAZ DE DETERMINAR
A CONCENTRAÇÃO CELULAR

Marcos Antonio Salvino da Silva

Junho/2020

Orientador: Marcio Nogueira de Souza

Programa: Engenharia Biomédica

Este trabalho desenvolveu um sistema alternativo de medição de biomassa aplicado à monitorização em tempo real (*online*) de bioprocessos, através da espectroscopia de bioimpedância, utilizando a técnica BIS-STEP. A construção deste trabalho foi elaborada em duas etapas: a primeira, para testar a viabilidade da aplicação desta técnica na monitorização de bioprocessos, cujos experimentos foram com levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*. Nesta etapa, utilizou-se a regressão linear multivariada (RLM) para estimar o número total de células totais e viáveis, através dos parâmetros de bioimpedância. A segunda etapa, por interesse de Farmanguinhos/Fiocruz, para extrapolar esta técnica para bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (**Bti**). Este último (**Bti**) apresentou maior dificuldade na aplicação direta da RLM comumente usada nas técnicas de espectroscopia dielétrica ou de bioimpedância. A solução encontrada, com o uso do parâmetro respiratório – demanda de oxigênio (OUR), se apresentou mais abrangente e também pôde ser aplicada nos dados obtidos dos experimentos da primeira etapa. Os resultados estatísticos foram satisfatórios para ambos os microrganismos apresentando um coeficiente de correlação de Pearson médio (\bar{r}) acima de 0,9 e o modelo de Bland-Altman avaliou a concordância entre os métodos analítico e de bioimpedância.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF A REAL TIME MEASUREMENT SYSTEM, BY
BIOIMPEDANCE SPECTROSCOPY, ABLE TO DETERMINE CELL
CONCENTRATION

Marcos Antonio Salvino da Silva

June/2020

Advisor: Marcio Nogueira de Souza

Department: Biomedical Engineering

This work developed an alternative biomass measurement system applied for real-time monitoring (*online*) of bioprocesses, through bioimpedance spectroscopy, using the BIS-STEP technique. The construction of this work was carried out in two stages: the first, to test the feasibility of applying this bioprocess monitoring technique, the experiments were carried out with the commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In this step, use a linear regression multivariate (LRM) to estimate the total number of total and viable cells, using bioimpedance parameters. The second step, in the interest of Farmanguinhos/Fiocruz, to extrapolate this technique to bacteria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (**Bti**). The latter (**Bti**) presented greater difficulty in the direct application of LRM commonly used in dielectric spectroscopy or bioimpedance techniques. A solution found, using respiratory parameters - oxygen uptake rate (OUR), shows the most comprehensive ones and can also be applied to the data obtained from the first experiments. The statistical results were satisfactory for both microorganisms with an average Pearson correlation coefficient (\bar{r}) above 0.9 and the Bland-Altman model evaluated the agreement between analytical and bioimpedance methods.

Sumário

Lista de Figuras	xiii
Lista de Tabelas	xxi
1 Introdução	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Geral	3
1.1.2 Específicos	3
1.2 Justificativa	4
2 Fundamentos	5
2.1 Biotecnologia e Bioprocesso	5
2.1.1 História da Biotecnologia	5
2.1.2 Bioprocessos	6
2.1.3 Biorreatores	9
2.1.4 Microrganismos utilizados	12
2.1.5 Teoria da Demanda de Oxigênio — OUR (<i>Oxygen Uptake Rate</i>)	13
2.2 Bioimpedância	15
2.2.1 Introdução	15
2.2.2 Espectroscopia de Bioimpedância	17
2.2.3 Eletrodos	22
2.2.4 Modelo circuito elétrico para o método BIS-STEP	24
3 Revisão de Literatura	27
4 Materiais e Métodos/Resultados	32
4.1 Etapa 1: Viabilidade do uso da espectroscopia de bioimpedância BIS-STEP no monitoramento de experimentos de crescimento de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
4.1.1 Os experimentos	33
4.1.2 A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34

4.1.3	Métodos <i>offline</i> utilizados para avaliação do número de células viáveis e não-viáveis (“padrão-ouro”)	35
4.1.4	Método <i>online</i> de bioimpedância utilizado para avaliação do número de células viáveis e não-viáveis	37
4.1.5	Análise dos dados	38
4.1.6	Resultados	39
4.2	Etapa 2: Melhoramento e aplicação do método no monitoramento do crescimento <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelenses</i> (Bti)	45
4.2.1	Os experimentos	45
4.2.2	A bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> — Bti	46
4.2.3	O meio de cultivo	46
4.2.4	Métodos <i>offline</i> utilizados para avaliação do número de células (“padrão-ouro”)	47
4.2.5	Observação do comportamento da capacitância de membrana (C_m) e sua relação com OUR	48
4.2.6	Análise dos dados	49
4.2.7	Resultados	50
5	Discussão	60
5.1	Etapa 1: Viabilidade do uso da espectroscopia de bio-impedância BIS-STEP	60
5.2	Etapa 2: Melhoramento e aplicação do método utilizando a teoria da Demanda de Oxigênio — OUR	62
5.2.1	A bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> — Bti	62
5.2.2	A levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	64
6	Conclusão	66
7	Proposta de Continuidade	68
7.1	Expansão do Experimento	68
7.2	Utilização em biorreator	68
7.2.1	Construção de um Sistema de Eletrodos para Biorreator	68
7.2.2	Aplicação em biorreator	69
	Referências Bibliográficas	70
A	Artigo em Congresso Nacional	77
B	Artigo em Congresso Internacional	82
C	Rotina desenvolvida para adquirir os sinais de corrente elétrica	88

D	Cálculo da Corrente do Modelo Elétrico Equivalente da Célula	92
E	Rotina desenvolvida para determinar os coeficientes de Laplace das frações parciais no domínio <i>S</i>	96
F	Dados obtidos nos experimentos conduzidos com a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
G	Figuras do experimento conduzido com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não inclusas no texto	106
	G.1 Curvas utilizando a câmara de Neubauer	106
	G.2 Curvas utilizando a demanda de oxigênio (OUR)	115
H	Dados obtidos nos experimentos conduzidos com a bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> – Bti	123
I	Figuras do experimento conduzido com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti) não inclusas no texto	134
	I.1 Curvas utilizando o densiCHECK® – método de McFarland	134
	I.2 Curvas utilizando a demanda de oxigênio (OUR)	147
J	Método de Bland-Altman para os experimentos conduzidos com a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e com a bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti)	159
	J.1 Curva da Etapa 01 - Viabilidade do BIS-STEP	159
	J.2 Curva da Etapa 02	160
	J.2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> – Bti	160
	J.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> – aplicação do método da Etapa 02 nos dados da Etapa 01	167
A	DensiCHEK® plus — Medição eletrônica da escala de McFarland	173

Lista de Figuras

2.1	Produção de metabólitos.	6
2.2	Áreas de atuação da Biotecnologia.	7
2.3	Rotas bioquímicas da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , por exemplo, produção extracelular de etanol.	7
2.4	Exemplos de produtos finais de fermentação conforme o microrganismo.	9
2.5	Representação simplificada do Tanque Agitado.	10
2.6	Representação simplificada de um Reator com Circulação por Arejamento.	11
2.7	Representação simplificada de um Reator Empacotado.	11
2.8	Reprodução celular por fissão binária	12
2.9	Forma esporulante da bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> - Bti	13
2.10	Resultados do monitoramento de uma cultura de <i>Bacillus thuringiensis</i> num biorreator (<i>fed-bacth</i>)	14
2.11	Comportamento da corrente elétrica num substrato biológico.	16
2.12	Permissividade e condutividade em um substrato biológico em função da frequência.	16
2.13	Propriedades dielétricas de um material com eletrodos de placas paralelas.	17
2.14	Único tempo de relaxação em função da frequência, permissividade complexa e condutividade.	21
2.15	Tipos de constituição física dos sensores: contato e imersão.	23
2.16	Forma e penetração dos eletrodos no substrato biológico (e.g. meio de cultivo).	23
2.17	Eletrodos utilizados durante os testes de verificação da viabilidade de utilização o método BIS-STEP na monitorização <i>online</i> de bioprocessos, tanto para levedura quanto para bactéria.	23
2.18	Meio de cultivo e seu circuito elétrico equivalente.	25
2.19	Circuito elétrico equivalente completo simplificado do microrganismo em um meio de cultivo.	25

2.20	Curva experimental típica da corrente para uma excitação de degrau de tensão e ajuste da equação teórica.	26
3.1	Princípio de medição dielétrica numa suspensão de células.	27
3.2	Variação da frequência de corte em função do tamanho da célula.	28
3.3	Modelo elétrico equivalente proposto.	29
4.1	Diagrama esquemático do arranjo experimental do cultivo da levedura	34
4.2	Levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> comercial	34
4.3	Apresentação e forma da câmara de Neubauer.	36
4.4	Diferenciação entre microrganismos vivos e mortos (levedura) com azul de metileno.	37
4.5	Curva experimental típica da resposta de corrente para uma excitação de degrau de tensão e ajuste da equação teórica.	38
4.6	Contagem de células (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) na câmara de Neubauer.	39
4.7	Curvas normalizadas das capacitâncias de membrana e de eletrodo	41
4.8	Curvas normalizadas das resistências do meio de cultivo e intracelular	41
4.9	Curvas médias das células totais, viáveis e não-viáveis do experimento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
4.10	Meio de cultivo e seu circuito elétrico equivalente.	42
4.11	Curvas de regressão linear multivariada para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para células totais e viáveis.	44
4.12	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) utilizando a regressão linear multivariada do experimento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para células totais	45
4.13	Diagrama esquemático do arranjo experimental	46
4.14	Comparação do comportamento da capacitância de membrana com a demanda de oxigênio (OUR)	49
4.15	Séries temporais da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas).	55
4.16	Curvas normalizadas das capacitâncias de membrana e de eletrodo para Bti	56
4.17	Curvas normalizadas das resistências do meio de cultivo e intracelular para Bti	56
4.18	Método de Bland-Altman para os experimentos 01 e 11 com Bti	57
4.19	Séries temporais da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	58

4.20	Método de Bland-Altman para os experimentos 2 e 8 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	59
7.1	Formato para o suporte dos eletrodos em uma base de Teflon®.	69
7.2	Biorreator TEC-BIO-FLEX da TECNAL®.	69
C.1	Protótipo inicial para <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	88
C.2	Protótipo final para os microorganismos deste estudo.	89
C.3	Fluxograma do programa LabVIEW®.	90
C.4	Tela do programa de aquisição de dados com LabVIEW®.	91
D.1	Modelo elétrico equivalente simplificado da célula em uma suspensão.	92
G.1	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 01 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	107
G.2	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 02 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	108
G.3	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 03 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	109
G.4	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 04 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	110
G.5	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 05 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	111
G.6	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 06 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	112
G.7	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 07 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	113
G.8	Contagem de células, variação das resistências do meio de cultivo e intracelular e variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo do experimento 08 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	114
G.9	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 01 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	115

G.10	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 02 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116
G.11	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 03 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	117
G.12	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 04 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	118
G.13	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 05 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
G.14	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 06 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	120
G.15	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 07 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	121
G.16	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 08 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	122
I.1	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 01 com Bti	135
I.2	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 02 com Bti	136
I.3	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 03 com Bti	137
I.4	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 04 com Bti	138
I.5	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 05 com Bti	139

I.6	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 06 com Bti	140
I.7	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 07 com Bti	141
I.8	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 08 com Bti	142
I.9	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 09 com Bti	143
I.10	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 10 com Bti	144
I.11	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 11 com Bti	145
I.12	Variação das capacitâncias de membrana e de eletrodo; e das resistências do meio de cultivo e intracelular do experimento 12 com Bti	146
I.13	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 01 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	147
I.14	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 02 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	148
I.15	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 03 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	149
I.16	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 04 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	150
I.17	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 05 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	151
I.18	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 06 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	152

I.19	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 07 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	153
I.20	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 08 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	154
I.21	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 09 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	155
I.22	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 10 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	156
I.23	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 11 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	157
I.24	Série temporal da capacitância de membrana e das células totais, experimentais e estimadas, para o experimento 12 com <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>	158
J.1	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) utilizando a regressão linear multivariada do experimento com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para células totais	160
J.2	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 01 com Bti	161
J.3	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 02 com Bti	162
J.4	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 03 com Bti	162
J.5	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 04 com Bti	163
J.6	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 05 com Bti	163

J.7	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 06 com Bti	164
J.8	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 07 com Bti	164
J.9	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 08 com Bti	165
J.10	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 09 com Bti	165
J.11	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 10 com Bti	166
J.12	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 11 com Bti	166
J.13	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 12 com Bti	167
J.14	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 01 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	168
J.15	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 02 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	169
J.16	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 03 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	169
J.17	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 04 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	170
J.18	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 05 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	170
J.19	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 06 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	171

J.20	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 07 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	171
J.21	Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o experimento 08 com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	172
A.1	Exemplo de utilização do <i>método de McFarland</i>	173
A.2	<i>DensiCHEK</i> : Turbidímetro digital baseado em McFarland.	174
A.3	Material de referência certificado (MRC) para <i>DensiCHEK</i>	174
A.4	<i>DensiCHEK</i> : Procedimento de utilização e operação.	175

Lista de Tabelas

2.1	Produtos de origem fermentativa.	8
4.1	Composição do meio de cultivo (fontes nutricionais) e do inóculo. . .	35
4.2	Valores iniciais dos parâmetros elétricos (bioimpedância) e de células totais (câmara de Neubauer) para cada experimento conduzido da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
4.3	Regressão linear multiparamétrica do experimento conduzido com a levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , resultante dos modelos descritos pelas Equações 4.4 e 4.5.	43
4.4	Valores iniciais dos parâmetros elétricos (bioimpedância) e de células totais (McFarland) para cada experimento conduzido do <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti).	50
4.5	Comparação entre fontes nutricionais do cultivo de Bti deste estudo com o de PANAROTTO (2014).	51
4.6	Determinação das médias pelo método de Bland-Altman para Bti . . .	52
4.7	Correlação entre as células totais experimentais e estimadas para cada experimento conduzido do <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> (Bti).	53
4.8	Correlação entre as células totais experimentais e estimadas para cada experimento conduzido da <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
4.9	Determinação das médias pelo método de Bland-Altman para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
F.1	Dados dos experimentos conduzidos com levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	101
H.1	Dados dos experimentos conduzidos com a bactéria <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i> – Bti	124
J.1	Determinação das médias pelo método de Bland-Altman para Bti . . .	161
J.2	Determinação das médias pelo método de Bland-Altman para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	168

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

α	Parâmetro ajustável da distribuição do tempo de relaxação
$\frac{1}{Y_{G0}}$	rendimento celular do consumo de oxigênio (g/mmolO ₂)
μ	representa a taxa de crescimento específico de um microrganismo (h^{-1})
ω	Frequência angular do campo elétrico aplicado
σ	Condutividade do material biológico
σ_s	Condutividade do material (meio de cultivo – extracelular) em corrente contínua ($\frac{mS}{cm}$)
σ_m	Condutividade do citoplasma (intracelular) ($\frac{mS}{cm}$)
τ	Tempo ou constante de relaxação
ε	Permissividade ($\frac{F}{m}$)
ε''	Parte imaginária da permissividade ou fator de perda
ε'	Parte real da permissividade ou constante dielétrica
ε_0	Permissividade relativa no vácuo — $8,85 \times 10^{-12} \frac{F}{m}$
ε_∞	Constante dielétrica em uma frequência muito elevada
A	Área da placa do capacitor (eletrodos)
B	Parte imaginária ou susceptância
C	Capacitância ou capacitor (eletrodo)
C_m	Capacitância por área de membrana ($\frac{F}{m^2}$)
d	Distância entre as placas do capacitor (eletrodos)

E	Campo elétrico harmônico
$f(\tau)$	Função de distribuição dos tempos de relaxação
f_c	Frequência de corte (Hz)
F_{ent}	vazão de entrada da fração molar de O_2 (mol/h)
F_{sai}	vazão de saída da fração molar de O_2 (mol/h)
G	Parte real ou condutância
i	Corrente elétrica no domínio do tempo
J	Densidade de corrente
m_0	coeficiente de manutenção para o oxigênio ($\text{mmolO}_2/\text{g/h}$)
N	Densidade celular (m^3)
NAD^+	Nicotinamida adenina dinucleótido oxidada
$NADH$	Nicotinamida adenina dinucleótido reduzida
P	Fração de volume das células (ou biovolume)
r	Raio da célula (m)
R	Parte real ou resistiva ou resistência
v	Tensão elétrica no domínio do tempo
X	Parte imaginária ou reativa ou reatância
X	concentração celular (g/L)
Y	Admitância complexa
Z	Impedância complexa
% v/v	fração em volume de um inóculo é quociente entre o volume desse inóculo e o volume do meio de cultivo.
aaaa	ano
Bioprocessos	Processos, fermentativos ou não, realizados por microrganismos
BIS	Bioelectric or Bioelectrical Impedance Spectroscopy

BIS-STEP	Bioelectric or Bioelectrical Impedance Spectroscopy STEP-voltage response
Bti	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>israelensis</i>
dd	dia
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
Erlenmeyer	frasco de vidro cônico com base circular, esterelizável, utilizado para titulações, aquecimento de líquidos, dissolução de substâncias e procedimento em reações/fermentações em incubadora climatizada com agitação
HH	horas
LRM	RLM em inglês: linear regression multivariate
MFBIA	MultiFrequency BioImpedance Analyzer
microtubos	são tubos cônicos esterelizáveis fabricados em polipropileno, testados e certificados, também conhecidos como <i>ependorf</i> . Suportam força de centrifugação de 35.000g
MM	minutos (tempo)
mm	mês
OUR	<i>Oxygen Uptake Rate</i> - Taxa de demanda de oxigênio
pellet	precipitado resultante da retirada do sobrenadante de um microtubo (<i>ependorf</i>)
pH	potencial de Hidrogênio
pO ₂	pressão parcial de oxigênio
RLM	regressão linear multivariada
SS	segundos (tempo)
V	volume do meio de cultivo (L)
xx	concentração do pré-inóculo conectado ao eletrodo
y	identificação do eletrodo

Capítulo 1

Introdução

Um bioprocesso pode ser definido como um processo de aplicação industrial de reações ou vias biológicas, mediadas por células vivas de animais, vegetais, microrganismos ou por enzimas sobre condições controladas para a transformação de matérias primas em produtos. Tais processos ocorrem normalmente em um biorreator, onde no caso de um bioprocessos microbiano, as diversas fases de crescimento dos microrganismos (latência, exponencial, estacionária e declínio (morte)) devem ser monitoradas e controladas para maximizar o processo de biotransformação [BORZANI *et al.* (2001); DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); LEI (2014)].

O biorreator é o principal elemento em um bioprocessos industrial, pois nele se desenvolvem as transformações desejadas através da rota bioquímica realizada pelos microrganismos. Para se alcançar a transformação desejada, há dois procedimentos que devem ser consideradas, a saber [BORZANI *et al.* (2001); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008)]:

- Tratamentos iniciais ou *Upstream processes* – procedimentos que antecedem a operação no reator, cuja finalidade é adequar o sistema nas condições idealizadas previamente, de modo que as transformações ocorram como desejado. Por exemplo, na produção de álcool etílico a partir da *Saccharomyces cerevisiae*, a etapa de *Upstream* é caracterizada pelo crescimento celular e produção de metabólito;
- Tratamentos finais ou *Downstream processes* – procedimentos que abrangem a separação e a purificação dos produtos e subprodutos resultantes da rota bioquímica, além do tratamento dos resíduos gerados.

Existem alguns métodos que são utilizados para a medição em tempo real (*online*) da concentração da biomassa. Entre eles, a densidade ótica ou turbidimetria que é baseada na transmissão, reflexão ou espalhamento da luz e que mede, por absorvância (mais usual), a densidade total de células vivas e/ou mortas, além de

outras partículas encontradas no meio, bolhas de ar e agregação de células ou microrganismos. Este método necessita de uma curva de calibração prévia de acordo com o microrganismo [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009)]. Tem-se também o citômetro de fluxo que é um equipamento para avaliar bioprocessos na detecção de uma proteína humana recombinada com a levedura *Pischia pastoris* [BROGER *et al.* (2011)] e da concentração de esporos viáveis com fungo filamentosos *Penicillium chrysogenum* [EHGARTNER *et al.* (2016)].

Outro método utilizado para medições em tempo real diz respeito a medição da taxa de oxigênio consumido e da taxa de gás carbônico liberado, pois conhecendo-se estas taxas específicas de cada microrganismo utilizado no meio de cultivo, pode-se estimar a concentração de biomassa. A limitação desse método é que as taxas são consideradas constantes durante todo o processo, embora elas possam variar de acordo com o estado fisiológico do microrganismo em questão [DABROS *et al.* (2009)].

Tem-se também, para medição em tempo real, métodos elétricos como a espectroscopia capacitiva ou dielétrica e a espectroscopia de bioimpedância [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); MARTINSEN e GRIMNES (2008a)]. O primeiro, baseia-se no princípio de medição da parte reativa (imaginária) da impedância e quantifica somente os microrganismos vivos em suspensão num meio de cultivo, os quais agem como pequenos capacitores sob influência de um campo elétrico. Assim, a capacitância total da suspensão é diretamente proporcional ao volume total de microrganismos vivos afetados por este campo [DABROS *et al.* (2009); MARTINSEN e GRIMNES (2008a)]. Alguns equipamentos comerciais que usam este método necessitam para o seu correto funcionamento de uma curva de calibração prévia de solução salina em diversas concentrações [DABROS *et al.* (2009)].

O segundo método elétrico baseia-se na medição da parte resistiva (real) e da parte reativa (imaginária) da impedância. Verifica-se que este método utiliza o anterior para a quantificação de microrganismos vivos, enquanto a parte resistiva avalia o comportamento do meio de cultivo (suspensão). Em ambos os métodos se consegue avaliar o comportamento morfológico, crescimento e a quantidade de microrganismos vivos aderentes (eletrodos) normalmente através de varredura de senóides (mais usual) [DABROS *et al.* (2009); YANG e BASHIR (2008)]. Entretanto, a literatura mostra que o método de bioimpedância tem sido aplicado na monitorização de bioprocessos somente em algumas condições específicas, tais como a quantificação de microrganismos vivos em uma determinada fase de crescimento (fase exponencial) onde se tem a esporulação [DINORÍN-TÉLLEZ-GIRÓN *et al.* (2015)]; a utilização em minibioreatores com densidade muito pequenas e fase exponencial [MARTINEZ TERUEL *et al.* (2013)], na observação da morfologia dos microrganismos [SARRÓ *et al.* (2015)] e da aderência dos microrganismos nos eletrodos [MARTINEZ TE-

RUEL *et al.* (2013)]. Na maior parte destas aplicações; é requerido um tempo de aquisição de aproximadamente 100 s (1,67 min ou 1 min 40 s) para varredura de frequência (normalmente, senóides), sendo repetida a cada 900 s (15 min), em alguns casos a cada hora [KARGUPTA *et al.* (2018); SARRÓ *et al.* (2012, 2015)], dependendo das condições operacionais e de crescimento incluídas no bioprocesso.

Outro aspecto da espectroscopia de bioimpedância é o uso de sinais banda larga no domínio do tempo, cuja principal vantagem está na varredura de várias componentes de frequência numa única excitação, bem como a aquisição de um número menor de amostras. No domínio da frequência, facilita o algebrismo matemático e a transformada de Fourier [KLÖSGEN *et al.* (2011)]. Tem-se, como exemplo, aplicação de um degrau de tensão, sendo um sinal no domínio do tempo, denominado de BIS-STEP (*Bioelectric Impedance Spectroscopy STEP-voltage response*) [NEVES e SOUZA (2000)], tendo a resposta em corrente elétrica (no domínio da frequência, possui ampla faixa de frequência) em um tempo menor de aquisição e, também, a diminuição do intervalo de repetição da aquisição dos dados.

1.1 Objetivos

Verificar a viabilidade de uma técnica alternativa de espectroscopia de bioimpedância, BIS-STEP [NEVES e SOUZA (2000)], no monitoramento de bioprocessos envolvendo microrganismos com crescimento simples e complexo.

1.1.1 Geral

O presente trabalho propôs o desenvolvimento de um método de monitoramento em tempo real do número total de microrganismos por espectroscopia de bioimpedância, baseada na resposta da corrente a excitação de um degrau de tensão (BIS-STEP – *Bioelectric Impedance Spectroscopy STEP-voltage response*) [NEVES e SOUZA (2000)].

1.1.2 Específicos

1. Avaliar a viabilidade da aplicação da técnica de espectroscopia BIS-STEP na monitorização de biomassa microbiana em bioprocessos com experimentos envolvendo microrganismos de crescimento simples;
2. Realizar estimativa numérica de biomassa; e
3. Aplicar o método desenvolvido, e avaliar sua capacidade de substituição dos métodos clássicos (analíticos), no monitoramento de um bioprocessos industrial

desenvolvido em Farmanguinhos, envolvendo microrganismo de crescimento complexo.

1.2 Justificativa

A tendência atual é que as medições sejam realizadas em tempo real de modo a agilizar as tomadas de decisões, evitando perdas de recursos e de materiais. Apesar da crescente popularização da espectroscopia dielétrica (capacitiva) como método de medição *online*, ainda se justifica a necessidade de desenvolvimento de novos métodos que operam em tempo real e que possam contribuir com a diminuição do tempo de medição, além de serem competitivos em termos de custo e substituam as importações, contribuindo para nossa balança comercial.

Cabe lembrar que nos processos fermentativos há a limitação técnica e financeira para quantificação do crescimento celular, pois o custo de um sensor de biomassa é elevado. Para se ter uma ideia, as empresas internacionais (Infors HT[®], Bioengineering[®]) que comercializam biorreatores com sensor de biomassa, a saber:

- Optek[®] → Turbidímetro - ASD12-N e ASD25-N (método analítico);
- Mettler-Toledo[®] → Turbidímetro - InPro8000 (método analítico); e
- Aber[®] → Espectroscopia dielétrica (método elétrico).

Observa-se que há somente um método elétrico para quantificação de células ou microrganismos em tempo real. A nova ferramenta desenvolvida no presente trabalho poderia ser apresentada ou oferecida como uma alternativa ao mercado existente.

Capítulo 2

Fundamentos

Nesse capítulo serão apresentados os conceitos relativos à biotecnologia, e aos bioprocessos e biorreatores, à espectroscopia de bioimpedância e aos eletrodos utilizados em tal método de medição empregados no desenvolvimento desta tese.

2.1 Biotecnologia e Bioprocesso

2.1.1 História da Biotecnologia

O homem utiliza microrganismos na transformação da matéria desde tempos remotos, observando que alguns processos se desenvolviam naturalmente devido à presença de microrganismos no meio ambiente ao seu redor. Os povos que habitavam antes de 6000 AC a região atualmente conhecida como Oriente Médio já produziam álcool através de leveduras. Por volta de 2500 AC, a produção de queijos na Ásia utilizava o *Penicillium rouquefortii* e processo de fabricação de *koji* (base do molho de soja) usava-se o fungo *Aspergillus oryzae*, antes de ser difundido no Japão no século VII [BORZANI *et al.* (2001); SANCHES (2006)].

A partir do século XIX, Luis Pasteur estudou a função dos microrganismos na produção de gêneros alimentícios fermentados (vinho, cerveja, queijo, iogurte) e de outros produtos (combustíveis e química fina); identificando diversos processos microbiológicos e descobrindo um dos mais importantes princípios da fermentação: a produção de metabólitos primários e secundários utilizando-se de substratos e microrganismos. Isolando alguns microrganismos em um meio de cultivo adequado, Pasteur conseguiu desvendar a base para a produção em larga escala de antibióticos [BORZANI *et al.* (2001); SANCHES (2006)].

Nos primórdios da biotecnologia, os agricultores foram capazes de selecionar as melhores e mais adequadas sementes e/ou culturas; isto é, as de maiores rendimentos, para produzir alimentos suficientes para sustentar uma população crescente. Posteriormente, outros povos produziram o processo de fermentação láctica, resul-

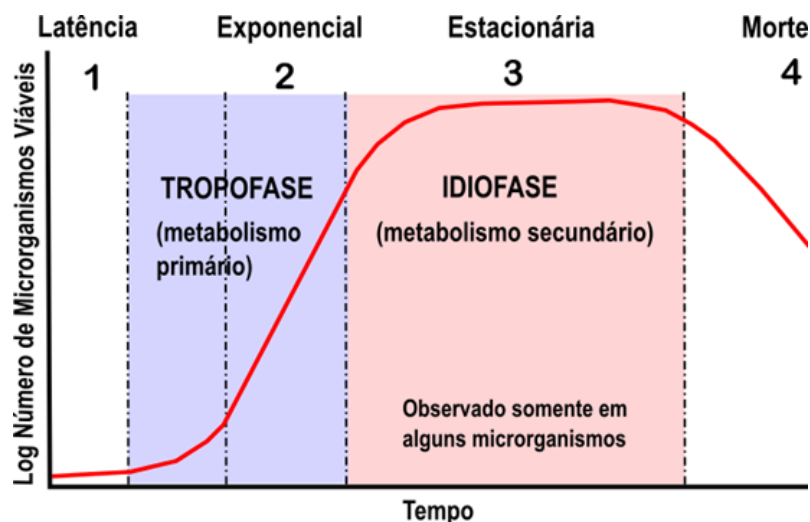


Figura 2.1 – Produção de metabólitos: primário e secundário.

Fonte e adaptada de: <http://colegiovascodagama.pt/ciencias3c/decimo/unidade312.html>

tando na fermentação e na preservação de outras formas de alimentos [BORZANI *et al.* (2001); SANCHES (2006)].

A produção de metabólitos, tanto primários quanto secundários, é representada pela curva padrão de crescimento celular apresentada na Figura 2.1. Os metabólitos primários, como o etanol, são formados durante a fase de crescimento exponencial (também conhecida como tropofase) paralelamente à produção de novas células. Já os metabólitos secundários, como penicilina e polissacarídeos, são produzidos na fase estacionária (também conhecida como idiofase) [BORZANI *et al.* (2001); SANCHES (2006)].

Até o final da década de 1960 o termo biotecnologia era empregado principalmente na indústria de alimentos e na agroindústria. A partir daí, começou a ser difundido por instituições científicas de renome em referência às técnicas de laboratório desenvolvidas em pesquisa biológica ou cultura de tecidos. A Biotecnologia, considerada como uma área interdisciplinar do conhecimento, abrange as áreas de Biologia, da Engenharia e da Química, atuando principalmente em sete categorias setoriais conforme ilustrado na Figura 2.2 [BIOMINAS (2007); BORZANI *et al.* (2001); SANCHES (2006)].

2.1.2 Bioprocessos

Bioprocessos são processos, fermentativos ou não, realizados por células vivas de animais, vegetais, microrganismos ou por enzimas, doravante utilizado microrganismo e/ou célula. O termo “fermentação” possui diversos significados em função da área do conhecimento que o utiliza. Geralmente o termo significa qualquer processo de cultura de microrganismos que ocorre na presença do ar (aeróbica) ou na ausência dele (anaeróbica) [BORZANI *et al.* (2001); SANCHES (2006)]. A defini-

ção bioquímica de fermentação era conhecida como “fermentador”, sendo utilizado para descrever os tanques aeróbicos onde acontecia o cultivo de microrganismos. Começou-se a utilizar o termo “biorreator”, em condições aeróbicas e anaeróbicas, para descrever o equipamento onde se realizavam os cultivos de microrganismos, sendo construídos com diferentes materiais em função do processo fermentativo. O produto final encontra-se dentro da célula ou microrganismo (intracelular) ou fora dela (extracelular) (Figura 2.3) [BORZANI *et al.* (2001); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); SANCHES (2006)].

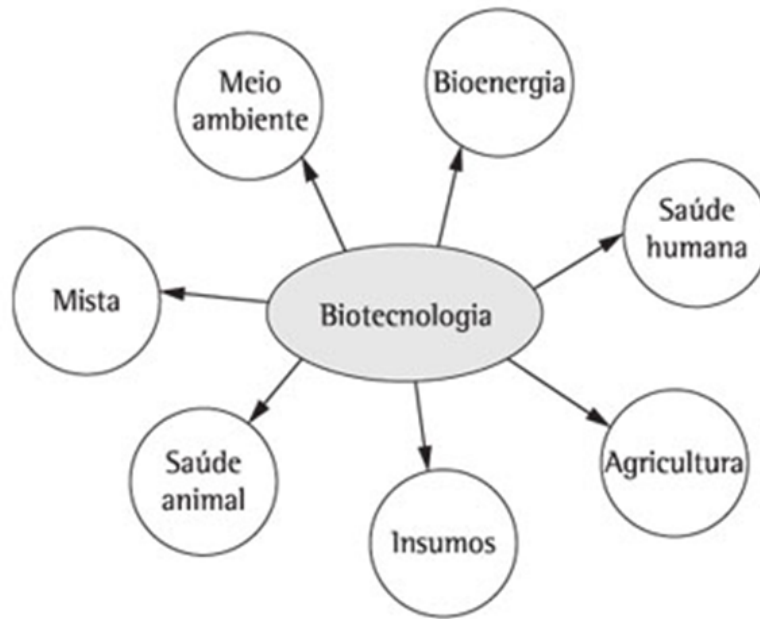


Figura 2.2 – Áreas de atuação da Biotecnologia.
 Fonte e adaptada de: BIOMINAS (2007)

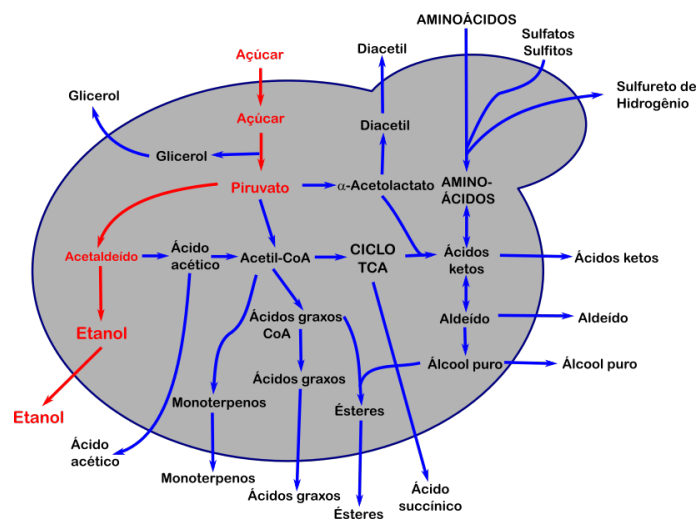


Figura 2.3 – Rotas bioquímicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, por exemplo, produção extracelular de etanol.

Fonte e adaptada de: <https://phdinbeer.com>

A fermentação e seus processos tem grande importância em vários setores, como na indústria química, farmacêutica, alimentícia e agricultura [PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); SANCHES (2006)], podendo o processo de fermentação ser resumido em quatro etapas primordiais, a saber [BORZANI *et al.* (2001); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); SANCHES (2006)]:

- Preparação do meio de cultivo (ou reacional), onde sua composição é dependente do produto final;
- Fermentação, que é o processo em que os microrganismos transformam o meio de cultivo (matéria-prima) no produto final;
- Finalização, que pode ser definida como o processo em que se obtém o produto desejado (final) com qualidade e pureza; e
- Geração de resíduos, que afeta o custo do produto final em função do meio de cultivo, podendo corresponder em até 70%. Assim, quanto mais barato for o meio de cultivo, menor será o custo do produto final.

A Tabela 2.1 apresenta alguns produtos resultantes de processos fermentativos.

Tabela 2.1 – Produtos de origem fermentativa.

Produto da Fermentação	Microrganismo	Aplicação
Etanol (não usado em bebidas)	<i>Saccharomices cerevisiae</i>	Química Fina
Ácido 2-cetoglucônico	<i>Pseudomonas sp.</i>	Ácido D-araboascórbico
Pectinase Protease	<i>Aspergillus niger</i> <i>A. aureus</i>	Agente clarificante em sucos de frutas
Amilase bacteriana	<i>Bacillus subtilis</i>	Amido modificado
Protease bacteriana	<i>Bacillus subtilis</i>	Removedor de manchas
Dextrano	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Estabilizador alimentício
Cobalamina (vit. B12)	<i>Streptomyces olivaceus</i>	Suplemento alimentar
Ácido glucônico	<i>Aspergillus niger</i>	Produtos farmacêuticos
Ácido lático	<i>Rhizopus oryzae</i>	Alimentos e Produtos farmacêuticos
Acetona-butanol	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Solventes e intermediários químicos
Insulina Interferon	<i>E. coli</i> recombinante	Terapia Humana
Levedura de pão	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Produção de pães, queijo e iogurte
Penicilina	<i>Penicillum chrysogenum</i>	Antibióticos
Cefalosporina	<i>Cephalosparium ecremonium</i>	Antibióticos
Eritromicina	<i>Streptomyces erythreus</i>	Antibióticos

Os microrganismos podem ser cultivados em diferentes escalas: de bancada ou laboratorial, piloto e de planta industrial. Para a escala de bancada (laboratorial) o volume varia de alguns decilitros a centenas de litros; entretanto para uma planta industrial este volume pode chegar a centenas de milhares de litros [BORZANI *et al.* (2001); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); SANCHES (2006)].

Objetivando minimizar as perdas materiais e econômicas, o processo é iniciado em escala laboratorial para investigar qual é o melhor microrganismo a ser utilizado, qual é o melhor meio de cultivo que proporcionará um crescimento adequado e quais são as condições operacionais e/ou parâmetros para a obtenção do produto desejado (Figura 2.4). Normalmente os parâmetros comumente estudados são: transferência de massa, agitação do meio de cultivo, taxa de crescimento do microrganismo, formação de espuma, taxa de diluição, forma e tamanho do biorreator/fermentador, pH do meio, temperatura entre outros [GOMES (2010); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); ROCHA (2009)].

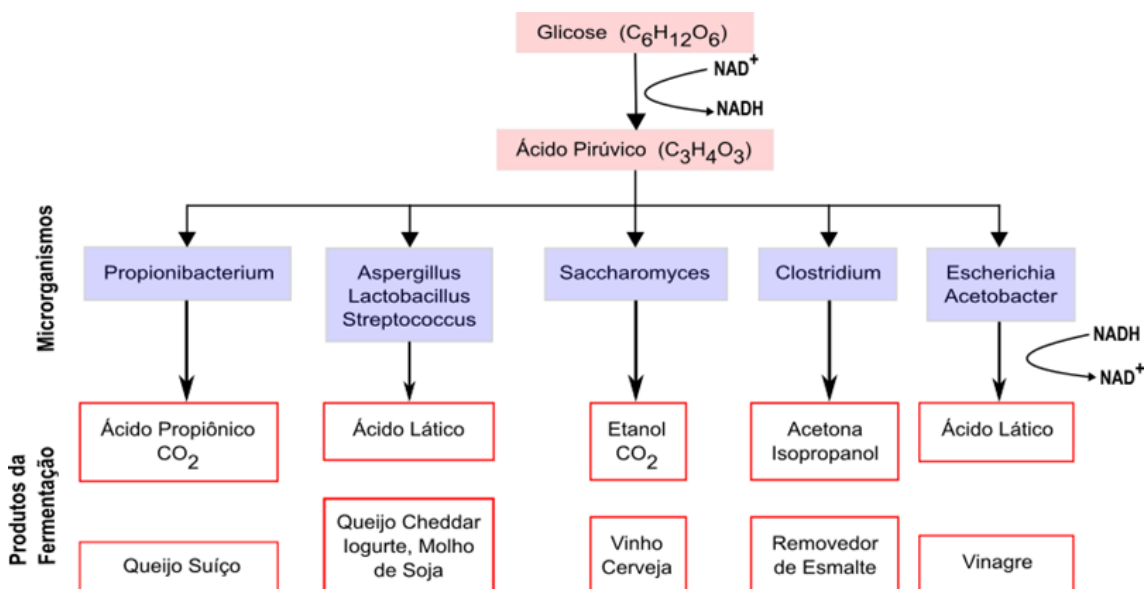


Figura 2.4 – Exemplos de produtos finais de fermentação conforme o microrganismo.

Fonte e adaptada de: <http://colegiovascodagama.pt/ciencias3c/decimo/unidade312.html>

2.1.3 Biorreatores

Biorreatores são equipamentos onde os processos de cultivo de microrganismos se desenvolvem em sistemas abertos (aeróbicos) ou fechados (anaeróbicos), permitindo a manipulação dos parâmetros físico-químicos envolvidos, tais como pH, concentração de reagentes, transferência de calor e massa, aeração, agitação dentre outros; objetivando a obtenção de um melhor rendimento em biomassa e/ou produto, além de minimizar os custos do processo de produção [PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); ROCHA (2009)].

Como já mencionado, a nível industrial, os produtos são gerados em biorreatores ou fermentadores, destacamos três comumente utilizados [PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); ROCHA (2009)]:

- Tanque agitado (em inglês: *Stirred Tank Bioreactor*): Este é o tipo mais usado em fermentação, permitindo a utilização em sistema fechado (descontínuo), semicontínuo ou contínuo, conforme mostra a Figura 2.5. A principal diferenciação dos demais reatores é que este possui um agitador mecânico provido de um eixo central com diversas pás. Além disso, alguns modelos deste biorreator pode possuir uma entrada de gás e uma camisa de aquecimento, cuja função é manter a temperatura do meio constante.

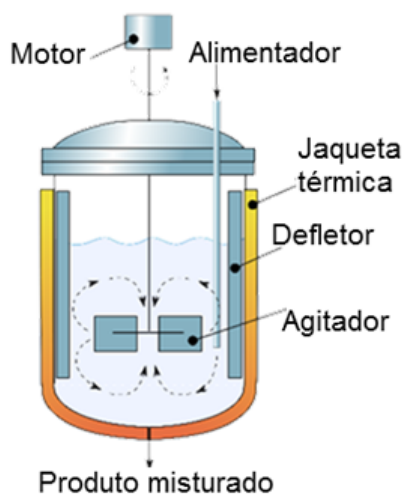


Figura 2.5 – Representação simplificada do Tanque Agitado.

Fonte e adaptada de: https://en.wikipedia.org/wiki/Continuous_stirred-tank_reactor

- Reator com circulação por arejamento (em inglês: *Airlift*): A agitação deste biorreator é realizada pela circulação do líquido no seu interior. Ele é constituído por dois tubos, conectando o topo com o fundo, conforme a Figura 2.6. O ar é injetado no fundo do reator com a pressão muito pequena – quase nula, fazendo com que o líquido circule por diferença de densidade entre os tubos.
- Reator empacotado (em inglês: *Packed-bed and fluidized bed reactor*): Este reator é constituído por um tubo cheio de partículas de (bio)catalisador, cuja alimentação pode ser feita pela extremidade inferior ou superior (Figura 2.7).

Os biorreatores possuem quatro modos de operação, a saber [PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); ROCHA (2009)]:

- Fechado ou descontínuo: o biorreator é preparado com o meio fermentativo, podendo ser substratos (biocatalizadores), e adiciona-se somente ácido ou base

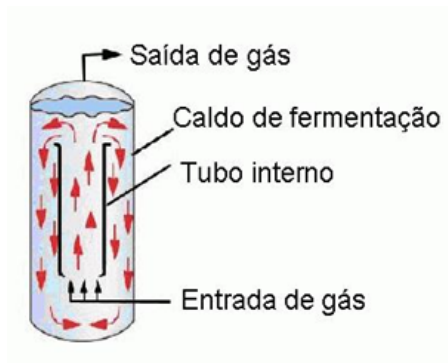


Figura 2.6 – Representação simplificada de um Reator com Circulação por Arejamento.

Fonte e adaptada de: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Airlift_bioreactor.jpg

para manter o pH constante. Considera-se que o processo finalizou quando o substrato do meio fermentativo foi totalmente consumido;

- Semicontínuo: O biorreator é preparado, parcialmente, com o meio fermentativo e no decorrer do processo adiciona-se o substrato, continuamente ou não, até atingir o volume desejado, onde a produtividade máxima é alcançada;
- Contínuo: A característica principal é a manutenção do volume constante, considerando as entradas e as saídas do biorreator; e
- Batelada alimentada: É caracterizada pela alimentação contínua das culturas, de um ou mais nutrientes, sem a necessidade de retirada de material durante a operação.

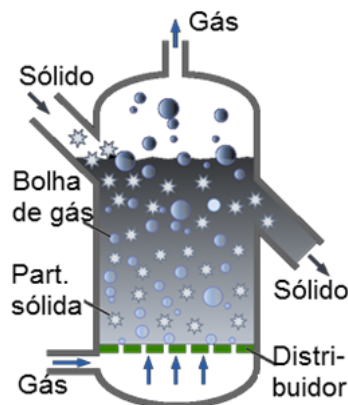


Figura 2.7 – Representação simplificada de um Reator Empacotado.

Fonte e adaptado de: https://en.wikipedia.org/wiki/Fluidized_bed_reactor

2.1.4 Microrganismos utilizados

2.1.4.1 Levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Inicialmente, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizada por ser um microrganismo conhecido e estabelecido no mercado, cuja reprodução se dá pelo processo de fissão binária, também conhecida por bipartição ou cissiparidade, consistindo na divisão de uma célula em duas, cada uma possui o mesmo genoma da "célula-mãe", conforme mostra Figura 2.8. A temperatura de crescimento ótimo é em torno de 30 °C [WALSH e MARTIN (1977)].

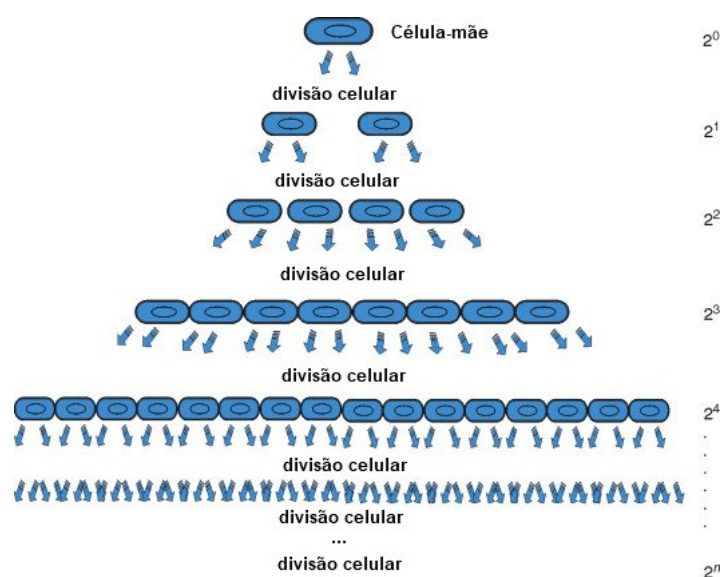


Figura 2.8 – Reprodução celular por fissão binária, onde cada célula gera duas células e todas possuem o mesmo genoma da "célula-mãe".

Fonte e adaptada de: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-370519-8.00003-1>

2.1.4.2 Bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – Bti

De interesse de Farmanguinhos/Fiocruz, onde trabalha o autor, a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – **Bti** possui um crescimento complexo, onde suas células vegetativas mudam para a forma esporulante (Figura 2.9) em função do esgotamento de nutrientes ao longo do tempo.

O trabalho de SARRAFZADEH *et al.* (2005) mostrou que após uma fase *lag* curta duração, a primeira fase do crescimento do **Bti** é caracterizada por uma fase de crescimento rápido seguida por uma fase onde o crescimento mais lento é observado (fases Φ_1 e Φ_2 na Figura 2.10). Ambas as fases estão associadas à produção de células vegetativas. O esgotamento dos nutrientes do meio de crescimento ao final da segunda fase de crescimento induz o início da esporulação (fase Φ_3 na Figura 2.10), levando à transformação morfológica e à formação de esporos que caracterizam a terceira fase. Nesta condição, a bactéria **Bti** esporula, produzindo um esporo e

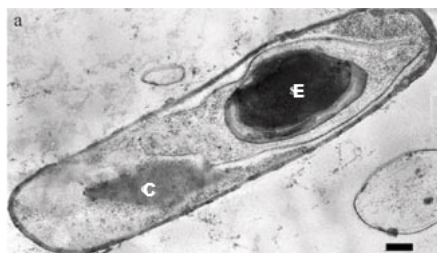


Figura 2.9 – Forma esporulante da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* - **Bti**, apresentando o esporo (E) e o cristal (C). A barra indica 5 μm .

Fonte e adaptada de: https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-566X2010000500016

corpo para-esporal, este último constituído principalmente de uma ou mais proteínas inseticidas (também conhecida como δ -endotoxina(s)) sob a forma cristalina, inseridos numa membrana *exosporium* [FEDERICI *et al.* (2010)].

Estas três fases de crescimento não são facilmente identificadas pela evolução da concentração de biomassa ao longo do tempo [SARRAFZADEH *et al.* (2005)]. Alterações metabólicas associadas às três fases de crescimento anteriormente mencionadas levam as células a consumir os substratos e a exigir altas quantidades de oxigênio durante a fase vegetativa [RIVERA *et al.* (1999)]. Por outro lado, a demanda celular de oxigênio é muito baixa após o deslocamento da fase vegetativa para a fase esporulante. Isso ocorre porque um ou mais nutrientes são depletados no meio de cultura e as células vão para um estágio em que há mudanças significativas da membrana do citoplasma e a construção de uma camada protetora ao redor do DNA da célula, ou seja, o desligamento do metabolismo normal das células [SARRAFZADEH *et al.* (2005); STRAGIER e LOSICK (1996)].

2.1.5 Teoria da Demanda de Oxigênio — OUR (*Oxygen Uptake Rate*)

Na estimativa da concentração celular de microrganismos a partir dos parâmetros respiratórios (oxigênio consumido), considera-se que o teor de oxigênio dissolvido no meio de cultivo não foi limitado e admitindo-se que o microrganismo em questão estivesse utilizando somente a via respiratória. Então, o quociente respiratório é igual a 1, isto é, para cada 1 *mol* O_2 consumido, 1 *mol* CO_2 produzido. Assim, tem-se que a vazão de oxigênio que entrou no biorreator foi maior à vazão que saiu do biorreator [PANAROTTO (2014)]:

$$OUR = \frac{F_{ent} - F_{sai}}{V} \cdot 100 \quad (2.1)$$

onde:

OUR representa a demanda de oxigênio pelo cultivo (mmol/L/h);

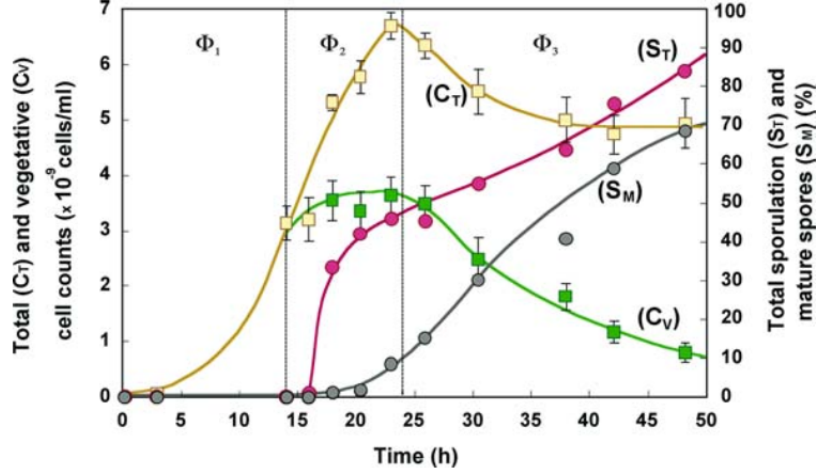


Figura 2.10 – Resultados do monitoramento de uma cultura de *Bacillus thuringiensis* num biorreator (*fed-bacth*): a contagem de células totais (C_T) e vegetativas (C_V) utilizando um hemocitômetro de Thoma. Células esporuladas não lisadas foram contadas como esporos. Esporulação total (S_T) como a razão de células esporuladas lisadas e não lisadas. A porcentagem de células lisadas esporuladas versus contagem total de células foi calculada como esporo maduro (S_M).

Fonte: SARRAFZADEH *et al.* (2005)

F_{ent} representa a vazão de entrada da fração molar de O_2 (mol/h);

F_{sai} representa a vazão de saída da fração molar de O_2 (mol/h); e

V representa o volume do meio de cultivo (L).

A literatura [PANAROTTO (2014); ZABRISKIE e HUMPHREY (1978)] propuseram que a demanda de oxigênio (OUR) (Equação 2.1) pode ser correlacionada com a taxa de crescimento específico, concentração celular, além de outros parâmetros intrínsecos do microrganismo e ser reescrita como:

$$\frac{OUR}{X} = m_0 + \frac{1}{Y_{G0}}\mu = m_0 + \frac{1}{Y_{G0}} \left[\frac{1}{X} \frac{dX}{dt} \right] \therefore OUR = m_0X + \frac{1}{Y_{G0}} \left[\frac{dX}{dt} \right] \quad (2.2)$$

onde:

m_0 representa o coeficiente de manutenção para o oxigênio (mmol O_2 /g/h);

μ representa a taxa de crescimento específico de um microrganismo (h^{-1});

$\frac{1}{Y_{G0}}$ representa o rendimento celular do consumo de oxigênio (g/mm olO_2); e

X representa a concentração celular (g/L).

2.2 Bioimpedância

2.2.1 Introdução

A impedância elétrica é a oposição que um sistema, biológico ou não, oferece à passagem da corrente elétrica. Uma tensão elétrica senoidal (v) aplicada num sistema leva a circulação de uma corrente elétrica (i), cuja intensidade depende desta oposição. A impedância elétrica é uma grandeza complexa obtida pela razão entre a tensão v e a corrente i , sendo constituída por uma parte real ou resistiva R (resistência) e por uma parte imaginária ou reativa X (reatância) [MARTINSEN e GRIMNES (2008a)] (Equação 2.3).

$$Z = \frac{v}{i} = R + jX \quad (2.3)$$

A admitância é uma propriedade elétrica inversa da impedância, constituída por uma parte real G (condutância) e por uma parte imaginária B (susceptância), expressando a facilidade que um sistema possui em propiciar um fluxo de corrente (Equação 2.4). Immitância, por sua vez, é um termo genérico usado para se referir à impedância ou à admitância [MARTINSEN e GRIMNES (2008a)].

$$Y = \frac{1}{z} = G + jB \quad (2.4)$$

O termo bioimpedância diz respeito à impedância elétrica de um sistema biológico ou, às vezes, à técnica da medida utilizada para se medir tal propriedade, fornecendo informação a respeito do substrato biológico por ser influenciada pela mudança da dimensão física e/ou propriedade condutiva dos tecidos [MARTINSEN e GRIMNES (2008a)].

Em 1950, Herman Paul Schwan descobriu a dependência da frequência na passagem da corrente elétrica em um tecido muscular (Figura 2.11), sendo interpretada como consequência do fenômeno de relaxação dos constituintes dielétricos existentes nos tecidos biológicos. Embora as propriedades dielétricas dos substratos biológicos variem muito de substrato para substrato, o comportamento típico é caracterizado, distintamente, por três grandes dispersões dielétricas, muitas vezes referidas como dispersões α , β e γ . Schwan foi um dos primeiros pesquisadores a definir estas dispersões ou regiões de frequência para as propriedades dielétricas de materiais e substratos biológicos (Figura 2.12) [MARTINSEN e GRIMNES (2008b)].

As características de dispersões dielétricas entre 10 Hz e dezenas de MegaHertz (regiões de dispersão α e β) geralmente são associadas com os processos de difusão das espécies iônicas (dispersão α) e as propriedades dielétricas das membranas celulares e as suas interações com os eletrólitos extra e intracelular (dispersão β). As propriedades dielétricas da região γ são atribuídas principalmente ao teor aquoso das

espécies biológicas e a presença de moléculas pequenas (Figura 2.12). Alguns autores fazem referência a uma quarta região de dispersão chamada δ , entre as dispersões β e γ em torno de 100 MHz, pode ser causada pelo momento dipolares das grandes moléculas (proteínas) [KUANG e NELSON (1998); MARTINSEN e GRIMNES (2008b)].

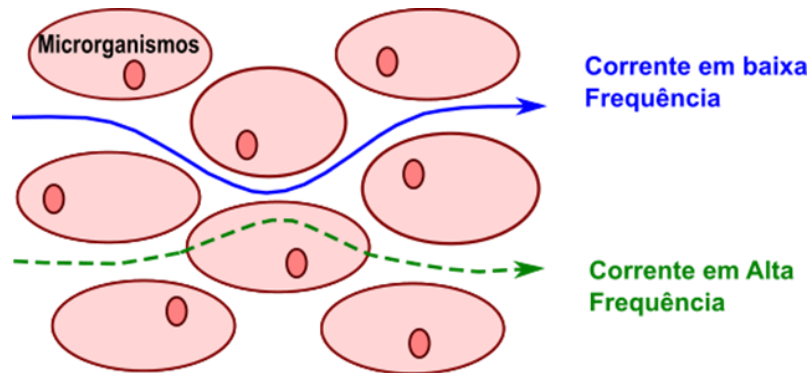


Figura 2.11 – Comportamento da corrente elétrica num substrato biológico – exemplo.

Fonte e adaptado de: <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/8526/memoria.pdf>

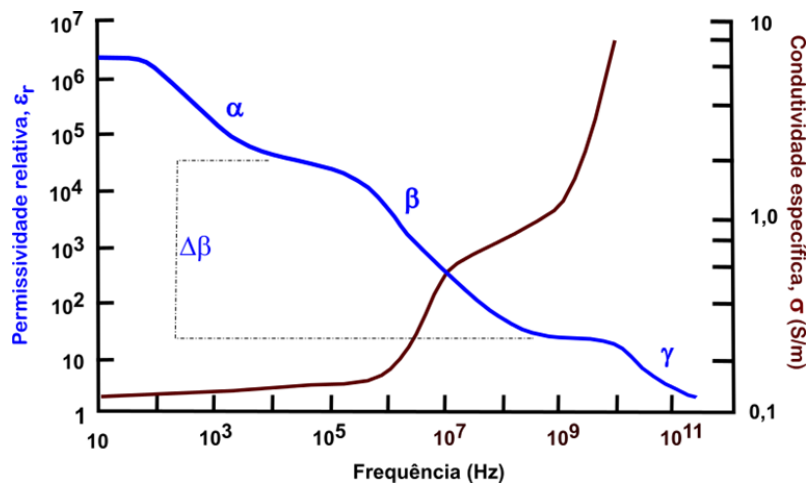


Figura 2.12 – Propriedades elétricas, permissividade e condutividade, do substrato biológico em função da frequência.

Fonte e adaptado de: <http://cdn.intechopen.com/pdfs-wm/40870.pdf>

A bioimpedância é influenciada pela frequência do sinal elétrico, pela intensidade da própria corrente elétrica, por processos eletroquímicos, pela temperatura, pelo potencial de hidrogênio (pH), pelo estado de hidratação, pela viscosidade do fluido ou substrato biológico em questão, entre outros fatores [KUANG e NELSON (1998); MARTINSEN e GRIMNES (2008b)]. Conseqüentemente, como já mencionado, a bioimpedância pode fornecer informações sobre os processos eletroquímicos no substrato biológico, caracterizando-o ou monitorando as mudanças fisiológicas nos mesmos [KUANG e NELSON (1998); MARTINSEN e GRIMNES (2008c)].

2.2.2 Espectroscopia de Bioimpedância – (do Inglês BIS – *Bioelectrical Impedance Spectroscopy*)

As propriedades dielétricas de um material refletem a orientação de cargas elétricas dentro deste na presença de um campo elétrico externo (Figura 2.13). O comportamento dielétrico dos materiais biológicos é sempre dependente da frequência [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998); PETHIG e KELL (1987)]. Uma resposta é considerada linear se as propriedades dielétricas forem independentes da intensidade do campo elétrico; isto é válido se a intensidade deste campo interferir minimamente no meio [KUANG e NELSON (1998); PETHIG e KELL (1987)].

Considerando o modelo elétrico de um capacitor com perdas como o apresentado na Figura 2.13, tem-se que a admitância do circuito paralelo é:

$$Y = G + j\omega C \quad (2.5)$$

onde:

$$C = \varepsilon \cdot \varepsilon_0 \left(\frac{A}{d} \right) \quad (2.6)$$

e

$$G = \sigma \left(\frac{A}{d} \right) \quad (2.7)$$

onde A é a área (m^2), d é a distância entre os eletrodos (m), Y é a admitância (S), ω é a frequência angular (rad/s), ε é a permissividade relativa complexa, ε_0 é a permissividade relativa no vácuo ($8,85 \times 10^{-12} \frac{F}{m}$), C é a capacitância (F), σ é a condutividade do material biológico (S/m) e G é a parte real da condutância (S).

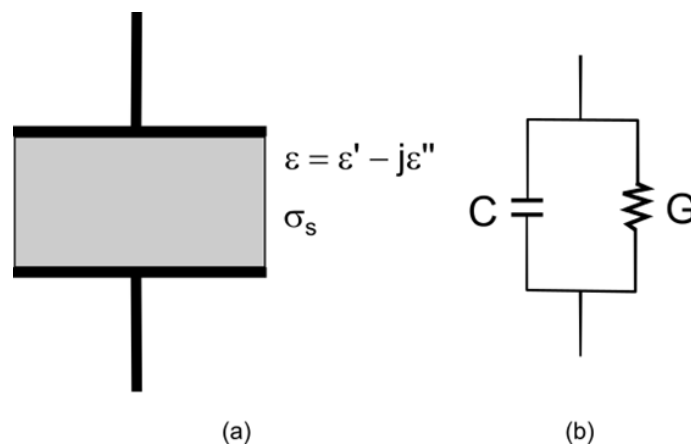


Figura 2.13 – Propriedades dielétricas de um material com eletrodos de placas paralelas, cuja área é A e a distância entre elas é d , **a)** Representação física e **b)** Representação elétrica.

Fonte e adaptado de: KUANG e NELSON (1998).

Assume-se que se um campo elétrico harmônico \mathbf{E} é aplicado ao material, uma

densidade de corrente \mathbf{J} induzida no seu interior pode ser expressa por [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998)]:

$$\mathbf{J} = \sigma_s \mathbf{E} + j\omega \varepsilon_0 \boldsymbol{\varepsilon} \mathbf{E} = \sigma_s \mathbf{E} + j\omega \varepsilon_0 (\varepsilon' - j\varepsilon'') \mathbf{E} \quad (2.8)$$

onde σ_s é condutividade do material em corrente contínua, ω é a frequência angular do campo elétrico aplicado, ε_0 é a permissividade no vácuo ($8,85 \times 10^{-12} \frac{\text{F}}{\text{m}}$), ε é a permissividade relativa complexa, ε' é a constante dielétrica (parte real) e ε'' é o fator de perda (parte imaginária). Para materiais biológicos, onde ε geralmente é dependente da frequência, a Equação 2.8 pode ser reescrita como [KUANG e NELSON (1998)]:

$$\mathbf{J} = (\sigma_s + \omega \varepsilon_0 \varepsilon'') \mathbf{E} + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon' \mathbf{E} = \sigma \mathbf{E} + j\omega \varepsilon_0 \varepsilon' \mathbf{E} \quad (2.9)$$

onde σ é a condutividade do material biológico. As propriedades elétricas de um material podem ser representadas de duas formas, (Equações 2.8 e 2.9), pela constante dielétrica (ε'), pelo fator de perda (ε'') e pela condutividade em corrente contínua (σ_s) ou pela constante dielétrica e pela condutividade (σ). As duas representações se relacionam da seguinte forma [KUANG e NELSON (1998)]:

$$\sigma = \sigma_s + \omega \varepsilon_0 \varepsilon'' \quad (2.10)$$

Note que para materiais biológicos, σ_s é principalmente devida à condução iônica, enquanto que $\omega \varepsilon_0 \varepsilon''$ resulta da relaxação dielétrica.

A constante dielétrica e o fator de perda não são independentes entre si. Para uma resposta dielétrica linear e causal, as relações de Kramers-Kronig permitem a conexão entre eles e podem ser escritas por [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998)]:

$$\varepsilon'(\omega) - \varepsilon_\infty = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty \frac{u \varepsilon''(u)}{u^2 - \omega^2} du \quad (2.11)$$

$$\varepsilon''(\omega) = -\frac{2\omega}{\pi} \int_0^\infty \frac{\varepsilon'(u) - \varepsilon_\infty}{u^2 - \omega^2} du \quad (2.12)$$

onde ε_∞ é a constante dielétrica em uma frequência muito alta e u é uma variável real de integração. Estas relações são úteis na interpretação das medidas das propriedades dielétricas dependentes da frequência.

Como já mencionado, as moléculas polares nos materiais se reorientam sob a influência de um campo elétrico externo. Deste modo, elas contribuem para a polarização e exibição do fenômeno de relaxação dielétrica, o qual é normalmente expresso pelos tempos ou constantes de relaxação (τ). As cargas livres no interior

de um material heterogêneo podem ser bloqueadas pelas interfaces em seu interior. A relaxação dielétrica é sempre um processo dependente da frequência. Um meio dielétrico expresso por uma única constante de tempo de relaxação, conhecida como equação de Debye, pode ser descrito pela sua permissividade como [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998); PETHIG e KELL (1987)]:

$$\varepsilon = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + j\omega\tau} \quad (2.13)$$

onde ε_{∞} é a constante dielétrica em uma frequência maior que $\frac{1}{2\pi\tau}$, ε_s é a constante dielétrica estática (ou em frequência muito baixa) e τ é o tempo de relaxação.

Da equação 2.13, a constante dielétrica (parte real) e o fator de perda (parte imaginária) podem ser reescritos da seguinte forma:

$$\varepsilon' = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + j\omega^2\tau^2} \quad (2.14)$$

$$\varepsilon'' = (\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}) \frac{\omega\tau}{1 + j\omega^2\tau^2} \quad (2.15)$$

Deste modo, a condutividade de um dielétrico com um único tempo de relaxação pode ser expressa de acordo com as Equações 2.10 e 2.13 [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998)] como:

$$\sigma = \sigma_s + (\sigma_{\infty} - \sigma_s) \frac{\omega^2\tau^2}{1 + j\omega^2\tau^2} \quad (2.16)$$

onde

$$\Delta\sigma = (\sigma_{\infty} - \sigma_s) = \frac{\varepsilon_0(\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty})}{\tau} \quad (2.17)$$

Um meio com uma única constante de tempo é raro de acontecer, exceto para compostos polares puros. Estendendo os conceitos anteriores às propriedades dielétricas com diversos tempos de relaxação, a permissividade relativa complexa é [KUANG e NELSON (1998)] expressa como:

$$\varepsilon = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + \omega\tau_1} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + \omega\tau_2} + \dots \quad (2.18)$$

onde ε_{∞} é a constante dielétrica na frequência muito alta, τ_i é o tempo de relaxação da i – ésima dispersão dielétrica e $\Delta\varepsilon_i = \varepsilon_{si} - \varepsilon_{\infty i}$ é o incremento dielétrico para a relaxação do i – ésimo dielétrico. Separando em parte real e imaginária a Equação 2.18, a constante dielétrica e o fator de perda, respectivamente, podem ser escritos como:

$$\varepsilon' = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + \omega^2\tau_1^2} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + \omega^2\tau_2^2} + \dots \quad (2.19)$$

$$\varepsilon'' = \Delta\varepsilon_1 \frac{\omega\tau_1}{1 + \omega^2\tau_1^2} + \Delta\varepsilon_2 \frac{\omega\tau_2}{1 + \omega^2\tau_2^2} + \dots \quad (2.20)$$

enquanto que a condutividade pode ser escrita como:

$$\sigma = \sigma_s + \Delta\sigma_1 \frac{\omega^2\tau_1^2}{1 + \omega^2\tau_1^2} + \Delta\sigma_2 \frac{\omega^2\tau_2^2}{1 + \omega^2\tau_2^2} + \dots \quad (2.21)$$

onde

$$\Delta\sigma = \frac{\varepsilon_0\Delta\varepsilon_i}{\tau_i} \quad (2.22)$$

Se a distribuição dos tempos de relaxação exibir tempos razoavelmente próximos, considerando uma faixa de frequências, a Equação 2.18 pode ser reescrita por uma integral [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998)]:

$$\varepsilon = \varepsilon_\infty + (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \int_0^\infty \frac{f(t)}{1 + j\omega\tau} d\tau \quad (2.23)$$

onde $f(\tau)$ é a função de distribuição dos tempos de relaxação.

Uma abordagem geral na interpretação dos dados experimentais é inferir em $f(\tau)$, identificando os mecanismos físicos. Tal tentativa envolve a modelagem de processos físicos e, geralmente, é consideravelmente complexa [KUANG e NELSON (1998)].

Outra abordagem puramente empírica permite, principalmente, parametrizar os dados sem esclarecer o mecanismo físico. Uma equação que descreve esta abordagem empírica, conhecida como *Cole-Cole* α , tem sido amplamente usada na literatura [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998); PETHIG e KELL (1987)] e pode ser descrita como:

$$\varepsilon = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (2.24)$$

onde $0 \leq \alpha \leq 1$ é um parâmetro ajustável que indica a distribuição do tempo de relaxação. Para materiais biológicos, o valor de α deve estar compreendido entre 0,3 e 0,5, permitindo um grande espectro dos tempos de relaxação.

A representação gráfica é muito útil para mostrar a relaxação dielétrica. Considerando um único tempo de relaxação (*Debye* – Equação 2.13), tem-se os gráficos apresentados na Figura 2.14 [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); KUANG e NELSON (1998); PETHIG e KELL (1987)].

Fazendo $j^{(1-\alpha)} = \cos(\frac{1-\alpha}{2}\pi) + j\sin(\frac{1-\alpha}{2}\pi)$, obtém-se a parte real da Equação 2.24 (*Cole-Cole* α) [BARSOUKOV e MACDONALD (2005); DABROS *et al.* (2009);

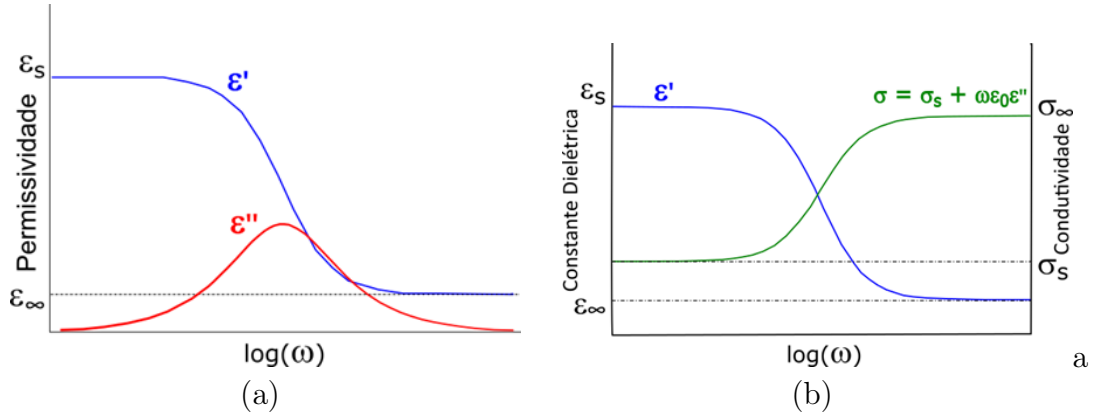


Figura 2.14 – Único tempo de relaxação em função da frequência. **a)** parte real (ε') e imaginária (ε'') da permissividade complexa em função da frequência. **b)** parte real (ε') da permissividade complexa e da condutividade (σ) do dielétrico em função da frequência.

Fonte e adaptado de: <https://naldc.nal.usda.gov/download/34220/PDF>

KUANG e NELSON (1998):

$$\varepsilon'(\omega) = \frac{\Delta\varepsilon \left(1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{1-\alpha} \text{sen}\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right) \right)}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{2-2\alpha} + 2\left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{1-\alpha} \text{sen}\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right)} + \varepsilon_\infty \quad (2.25)$$

Evidenciando ε na Equação 2.6 e substituindo na Equação 2.25, tem-se que a capacitância do material dielétrico para uma determinada faixa de frequência é [DABROS *et al.* (2009)]:

$$C(f) = \frac{\Delta C \left(1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^{1-\alpha} \text{sen}\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right) \right)}{1 + \left(\frac{f}{f_c}\right)^{2-2\alpha} + 2\left(\frac{f}{f_c}\right)^{1-\alpha} \text{sen}\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right)} + C_\infty \quad (2.26)$$

onde ΔC é a variação da capacitância para uma dada faixa de frequência, f_c é a frequência característica e C_∞ é o componente de alta frequência.

Da mesma forma, tem-se que a condutividade pode ser expressa por [DABROS *et al.* (2009)]:

$$\sigma(\omega) = \frac{-\Delta\sigma \left(1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{1-\alpha} \text{sen}\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right) \right)}{1 + \left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{2-2\alpha} + 2\left(\frac{\omega}{\omega_c}\right)^{1-\alpha} \text{sen}\left(\frac{\pi}{2}\alpha\right)} + (\sigma_s + \Delta\sigma) \quad (2.27)$$

As Equações 2.25 ou 2.26 são comumente utilizadas para a espectroscopia dielétrica ou capacitiva (utiliza somente a parte reativa da impedância), pois se observa que a capacitância total é proporcional à quantidade de microrganismos vivos [DABROS *et al.* (2009)]. As particularidades desta técnica serão discutidas mais adiante.

Já a espectroscopia de bioimpedância, além de usar as Equações 2.25 ou 2.26, utiliza também a parte real da impedância expressa pela Equação 2.27. Da mesma

forma, as particularidades desta técnica, também, serão discutidas mais adiante.

Observa-se que as espectroscopias, capacitiva e de bioimpedância, são determinadas em função da frequência, normalmente usando sinais senoidais, cujas amplitudes variam conforme o meio de cultivo e o microrganismo sob estudo. Este método é conhecido como Análise de Bioimpedância Multifrequencial (*MF BIA – MultiFrequency BioImpedance Analyzer*).

Outro método de análise de bioimpedância tem como característica a utilização de um sinal de excitação no domínio do tempo que possua uma ampla banda de frequências. Difere dos métodos que utilizam excitação senoidais, sendo denominado de Espectroscopia de Bioimpedância Elétrica (BIS). Diferente do que ocorre nos dois métodos anteriores, onde a dependência da impedância com a frequência é caracterizada somente em alguns pontos, a BIS permite a obtenção de um espectro “contínuo” mediante, por exemplo, aplicação da transformada de Fourier da resposta do sistema e da excitação. Um exemplo de método de espectroscopia de bioimpedância é aquele baseado na resposta de corrente à aplicação de um degrau de tensão [NEVES e SOUZA (2000)], doravante denominado BIS-STEP, onde um degrau de aproximadamente 500 mV é usado para excitar o sistema biológico.

2.2.3 Eletrodos

A escolha do eletrodo (sensor) depende do princípio de medição mais adequado para se determinar as propriedades físicas e químicas do meio de cultivo (substrato biológico) a estudar [KIM *et al.* (2009); MARTINSEN e GRIMNES (2008c)]. Vários fatores afetam a performance do sensor, como, por exemplo, se sua utilização será por contato ou por imersão no meio de cultivo (Figura 2.15) [MARTINSEN e GRIMNES (2008c)]. A constituição física dos eletrodos definirá as linhas equipotenciais e de densidade de corrente, assim como sua profundidade ou penetração no substrato biológico [MARTINSEN e GRIMNES (2008c)], como por exemplo Figura 2.16 [SCHOLZ e GROSS (2014)].

Nos testes de verificação da viabilidade de uso do método BIS-STEP na monitorização em tempo real de bioprocessos foram utilizados como eletrodos dois cilindros rígidos de aço inoxidável, com 1,54 mm de diâmetro, espaçados de 2 mm, submersos até 1 mm a 2 mm do fundo do frasco, fixados no frasco *erlenmeyer* por meio de uma rolha de espuma isolante para a medida de bioimpedância (Figura 2.17). O referido teste de viabilidade foi realizado monitorando-se um processo de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e da bactéria *Bacillus thuringiensis var. israelensis* (**Bti**) (detalhes no Capítulo 4).

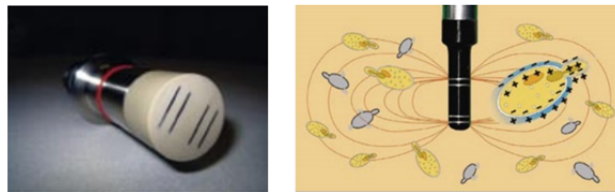


Figura 2.15 – Tipos de constituição física dos sensores: contato e imersão.
 Fonte e adaptado de: *A Sensitive, Compact, In Situ Biomass Measurement System, BioProcess International, 2007*

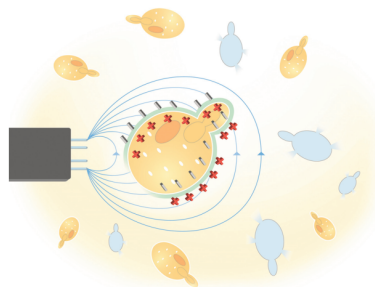


Figura 2.16 – Forma e penetração dos eletrodos no substrato biológico (e.g. meio de cultivo).

Fonte e adaptado de: *SCHOLZ e GROSS (2014)*

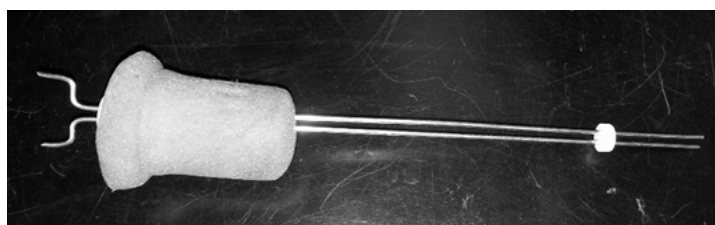


Figura 2.17 – Eletrodos utilizados durante os testes de verificação da viabilidade de utilização o método BIS-STEP na monitorização *online* de bioprocessos, tanto para levedura quanto para bactéria.

2.2.4 Modelo circuito elétrico para o método BIS-STEP

Para a interpretação dos dados de bioimpedância relacionados ao método BIS-STEP, a resposta de corrente observada experimentalmente deve ser associada a um modelo elétrico, de modo que os parâmetros do modelo possam ser obtidos através de um procedimento de minimização multiparamétrico. Para a presente aplicação, o modelo elétrico ilustrado na Figura 2.18 pode ser usado para a interpretação da resposta de corrente de um bioprocessamento, sendo assemelhado ao de trabalhos anteriores que utilizam o método BIS-STEP [FERREIRA e SOUZA (2004); JOTTA *et al.* (2017); NEVES *et al.* (2009)]. No modelo, os comportamentos resistivo e reativo de um meio de cultivo (substrato biológico) e do microrganismo podem ser obtidos por uma combinação de duas resistências, R_{cy} e R_s , e duas capacitâncias, C_m e C_{dl} [DOLADER RETAMAL (2012); GIANNOUKOS e MIN (2015); MOORE *et al.* (2009); NEVES e SOUZA (2000); PLIQUETT (2010)].

O circuito elétrico completo, mostrado na Figura 2.19, inclui a fonte de excitação do degrau de tensão e a capacitância total de eletrodo.

No domínio de Laplace a equação da resposta de corrente pode ser expressa como:

$$I(s) = I_p \left(\frac{s + A}{s^2 + Bs + C} \right) = I_p \left(\frac{K_1}{s - s_1} + \frac{K_2}{s - s_2} \right) \quad (2.28)$$

onde

$$I_p = v_d \left(\frac{R_s + R_{cy}}{R_s \times R_{cy}} \right) \quad (2.29)$$

$$A = \frac{1}{(R_s + R_{cy})C_m} \quad (2.30)$$

$$B = \left(\frac{R_s C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy} \right) \frac{1}{R_s R_{cy} C_{dl}} \quad (2.31)$$

$$C = \frac{1}{R_s R_{cy} C_{dl} C_m} \quad (2.32)$$

A demonstração da Equação 2.28 encontra-se no Apêndice D.

Aplicando a transformada inversa de Laplace à Equação 2.28 obtém-se a equação da resposta de corrente teórica no domínio do tempo $i(t)$ (Equação 2.33), que é utilizada por uma rotina (implementadas em MATLAB[®] – vide Apêndice E) que minimiza o erro médio quadrático entre uma medida experimental da corrente e sua expectativa teórica para determinar os valores dos parâmetros do modelo elétrico. A Figura 2.20 ilustra um exemplo de um dado experimental ajustado pela Equação 2.33.

$$i(t) = I_p (K_1 e^{(s_1 t)} + K_2 e^{(s_2 t)}) \quad (2.33)$$

onde a determinação dos valores de K_1 , K_2 , s_1 , s_2 se encontra no Apêndice D.

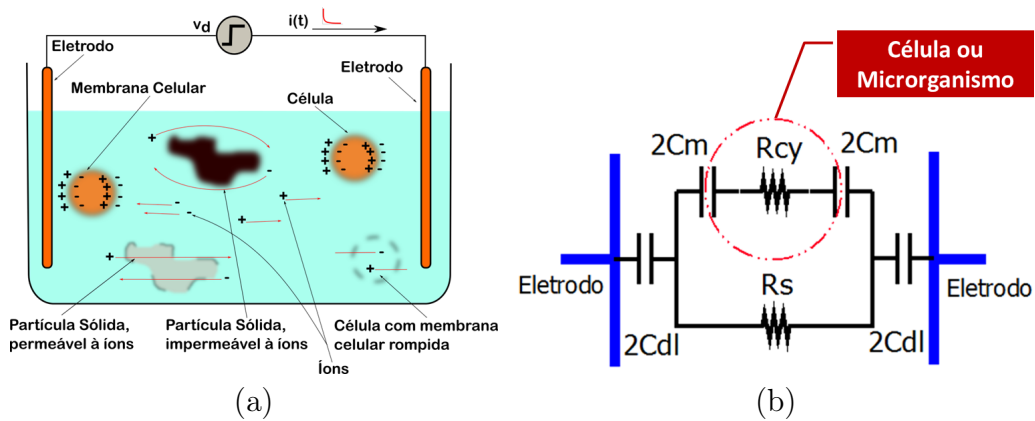


Figura 2.18 – Meio de cultivo (substrato) biológico **(a)** e seu circuito elétrico equivalente **(b)**, onde v_d é o degrau de tensão, $i(t)$ é corrente elétrica no domínio do tempo, C_m é a capacitância da membrana celular, R_{cy} é a resistência intracelular, C_{dl} é a capacitância de eletrodo e R_s é a resistência do meio de cultivo (suspensão).

Fonte e adaptado de: (Figura 2.18a)

<http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/8526/memoria.pdf>

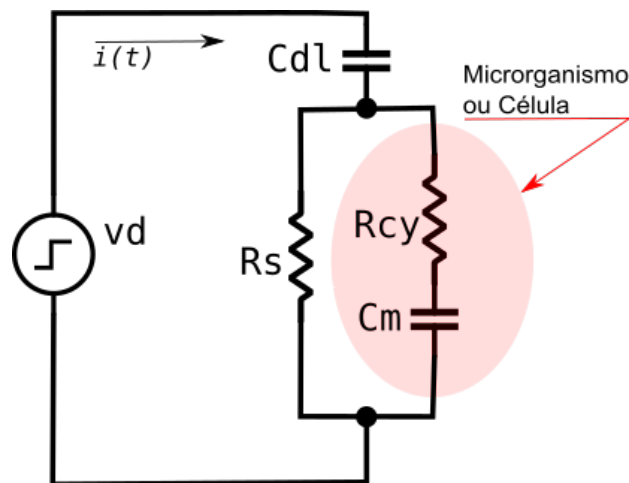


Figura 2.19 – Circuito elétrico equivalente completo simplificado do microorganismo em um meio de cultivo, onde v_d é a magnitude do degrau de tensão, $i(t)$ é corrente elétrica no domínio do tempo, C_m é a capacitância da membrana celular, R_{cy} é a resistência intracelular, C_{dl} é a capacitância de eletrodo e R_s é a resistência do meio de cultivo (suspensão).

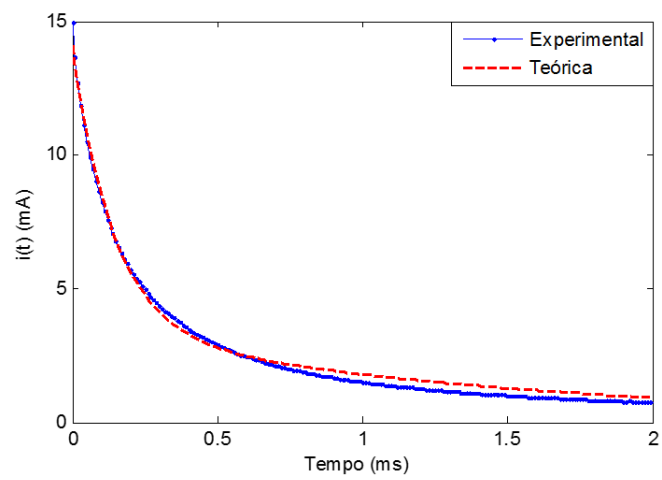


Figura 2.20 – Curva experimental típica da corrente para uma excitação de degrau de tensão (linha contínua em azul) e ajuste da equação teórica (linha tracejada em vermelho).

Capítulo 3

Revisão de Literatura

Neste capítulo, será apresentada a revisão da literatura por ordem de assunto, acompanhando o Capítulo 2.

Espectroscopia de bioimpedância baseia-se no princípio que sob influência de um campo elétrico externo, os microrganismos ou as células em suspensão num meio condutivo agem como um capacitor, armazenando carga elétrica, conforme mostrado na Figura 3.1 [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); MARTINSEN e GRIMNES (2008a); NOLL e BISELLI (1998)]. Ao se aplicar um campo elétrico alternado de baixa frequência entre os eletrodos, os íons no citoplasma, bem como os do meio de cultivo (solução iônica) se movem na direção do eletrodo de carga oposta. Os íons do citoplasma das células viáveis são parados pela própria membrana intacta, acarretando uma polarização da membrana por atração de carga oposta do meio de cultivo. Assim, cada célula se comporta como um pequeno capacitor, onde a capacitância total pode ser associada ao aumento na capacitância do meio de cultivo [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); MARTINSEN e GRIMNES (2008a); NOLL e BISELLI (1998)].

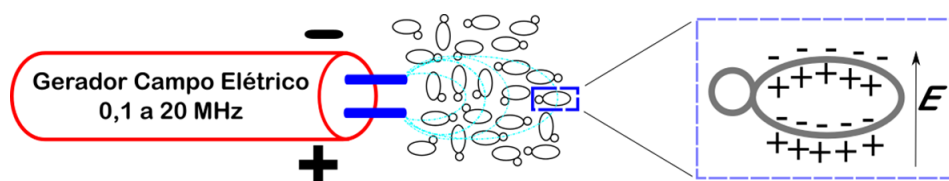


Figura 3.1 – Princípio de medição dielétrica numa suspensão de células.

Fonte e adaptada de: DABROS *et al.* (2009).

Em ambas as espectroscopias, tanto a de bioimpedância quanto a dielétrica ou capacitiva, a capacitância total da suspensão observadas em uma certa faixa de frequências (dezenas de kHz a centenas de MHz, denominadas dispersão β) é diretamente proporcional ao volume total de microrganismos vivos afetados pelo campo elétrico. Uma das principais vantagens desse método é que somente os micror-

ganismos vivos são medidos, enquanto que os mortos, detritos celulares e demais partículas acelulares (sólidas permeáveis ou não) são ignoradas, uma vez que estes não apresentam membranas celulares íntegras que possam ser polarizadas [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); MARTINSEN e GRIMNES (2008a); NOLL e BISELLI (1998)].

Normalmente, a teoria por traz da abordagem da espectroscopia dielétrica considera os microrganismos esféricos e pode ser expressa matematicamente pela equação de Schwan [DABROS *et al.* (2009); NOLL e BISELLI (1998)] (Equação 3.1).

$$\begin{aligned} \varepsilon &= \frac{9rPC_m}{4} \\ P &= \frac{4\pi r^3 N}{3} \\ f_c &= \frac{1}{2\pi r C_m \left(\frac{1}{\sigma_m} + \frac{1}{2\sigma_s} \right)} \end{aligned} \quad (3.1)$$

onde ε é a permissividade ($\frac{F}{m}$); r é o raio da célula (m); P é a fração de volume das células (ou biovolume); N é a densidade celular (m^3); C_m é a capacitância por área de membrana ($\frac{F}{m^2}$); f_c é a frequência de corte da permissividade (Hz); σ_m é a condutividade do citoplasma (intracelular) ($\frac{mS}{cm}$); e σ_s é a condutividade do meio de cultivo (extracelular) ($\frac{mS}{cm}$)

Além disso, observa-se que quando as propriedades físicas dos microrganismos variam, a frequência de corte também varia (Figura 3.2).

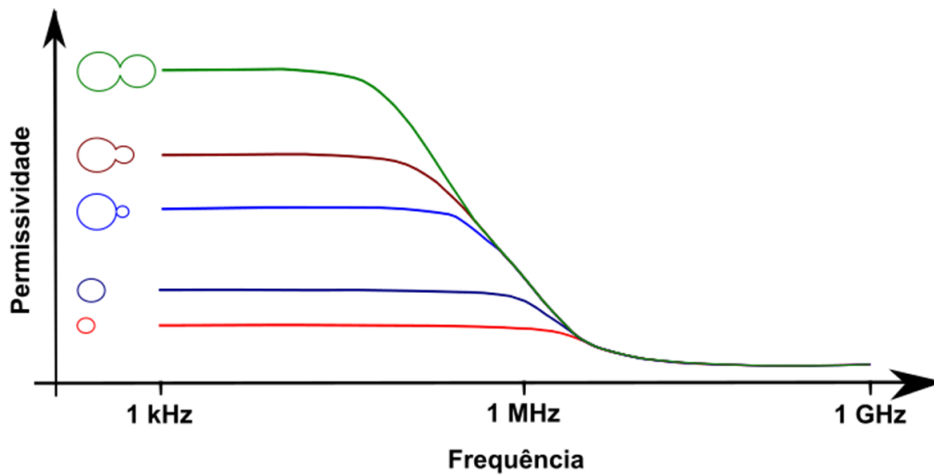


Figura 3.2 – Variação da frequência de corte em função do tamanho da célula.
Fonte e adaptada de: <http://link.springer.com/article/10.1007/s10295-012-1193-y/fulltext.html>

Outro parâmetro utilizado na espectroscopia capacitiva é o parâmetro de Cole-Cole α , pois descreve a redução da permissividade (capacitância) com o aumento da frequência. Tal parâmetro pode assumir valores entre 0 e 1; sendo que 0 representa uma queda abrupta (acentuada) na permissividade, enquanto que 1 representa uma queda infinitamente rasa (suave) na permissividade. Aceita-se que o parâmetro de

Cole-Cole α aumente em virtude do aumento das propriedades dos microrganismos durante a expansão desses. Em um cultivo celular, os valores típicos de Cole-Cole α estão entre 0,1 e 0,5 [DABROS *et al.* (2009); KUANG e NELSON (1998)]. Uma aplicação desse parâmetro, pode ser vista no estudo de KAPOULEA *et al.* (2019), onde foi utilizado o modelo de Cole-Cole α de dispersão única usando um medidor LCR TESTER (Hioki, modelo 3522-50) na faixa de frequência de 1 Hz a 100 kHz perfazendo um total de 100 diferentes frequências. Exemplares de maçãs foram excitados por um sinal triangular, cuja amplitude de corrente foi de 0,1 mA_{PP}.

O estudo de MARTINEZ TERUEL *et al.* (2013) foi realizado no cultivo de células animais, leveduras e bactérias em biorreatores cujos volumes variam de 10 mL a 25 mL, onde duas tecnologias foram combinadas: densidade ótica, pH e pO₂ (pressão parcial do oxigênio) e espectroscopia de impedância eletroquímica. A medição de biomassa foi realizada através da densidade ótica, do pH e da pO₂ enquanto a espectroscopia de impedância eletroquímica, utilizando a configuração de 2 e 4 eletrodos, foi utilizada para discriminar entre a adesão de microrganismos no eletrodo e a densidade celular. O experimento foi conduzido em duas faixas de frequências de 1 kHz à 200 kHz (para células animais) e 100 kHz à 20 MHz (para leveduras e bactérias).

Recentemente, alguns trabalhos têm utilizado equipamentos comerciais para a realizar a espectroscopia de bioimpedância, como é o caso do LCR TESTER (Hioki, modelo 3532-50) usado por LIU *et al.* (2015) e DINORÍN-TÉLLEZ-GIRÓN *et al.* (2015). O primeiro mediu variações de impedância no leite com amostras de *Escherichia coli* com um sinal senoidal de 50 mV de amplitude, cujo modelo elétrico equivalente é mostrado na Figura 3.3, onde R_s é a resistência (impedância) do meio (leite e *Escherichia coli*) e C_{dl} é a capacitância de eletrodo. O segundo [DINORÍN-TÉLLEZ-GIRÓN *et al.* (2015)] mediu as variações de resistência e reatância para identificar o processo de diferenciação celular de uma cultura de *Bacillus thuringiensis* em tempo real. Optou-se por frequências fixas de 0,1; 0,5 e 1,225 MHz, para obtenção de uma melhor relação entre propriedades dielétricas e fases de crescimento (fases latente (*lag*), exponencial, esporulação). Geralmente, a variação de capacitância ou da permissividade é usado como indicador de crescimento de biomassa, na faixa de frequência de 0,5 a 3,0 MHz.

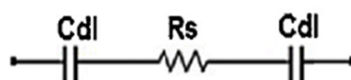


Figura 3.3 – Modelo elétrico equivalente proposto.

Fonte: LIU e colaboradores [LIU *et al.* (2015)].

Há também trabalhos que utilizaram o analisador de impedância comercial HP-

4192A (tetrapolar), como, por exemplo, o de SARRÓ *et al.* (2015), que avaliou a morfologia de alguns microrganismos, células animais e *Escherichia coli*, utilizando um protocolo de desprendimento desses dos eletrodos. Dessa forma, consegue-se determinar o tamanho dos microrganismos através da correlação entre a frequência central de relaxação e a área da seção transversal do microrganismo, além das impedâncias nas frequências 0 (muito baixa) e ∞ (muito alta), além do parâmetro α . Cada medição foi determinada por meio de uma média de 10 varreduras, necessitando de um tempo de aquisição de 100 s (1 min 40 s) aproximadamente. Outro trabalho de SARRÓ *et al.* (2012) utilizou minibioreatores cujo sinal de excitação foi de corrente elétrica senoidal, tendo como resposta a medição de tensão correspondente para determinar a aderência das células nos eletrodos. O experimento utilizou células animais na faixa de frequência de 10 kHz até 10 MHz com uma resolução de frequência de 10 pontos por década, requerendo um tempo total de aquisição de 100 s (1 min 40 s) e sendo repetido a cada 900 s (15 min).

Há uma técnica recente desenvolvida por MANSOR e AHMAD (2015), conhecida como espectroscopia de impedância microelétrica (μ -EIS – *Micro Electrical Impedance Spectroscopy*), que foi aplicada para medir propriedades dielétricas de uma única célula (microrganismo), para caracterizá-la e diferenciá-la dos demais tipos de células. De modo geral, baseia-se na técnica de espectroscopia dielétrica, porém utiliza dois nano-eletrodos, bem como um microscópio eletrônico para orientação e posicionamento deles de forma adequada (sem danificar a célula). Este é processo requer muita experiência, habilidade e longo período de tempo.

Outra técnica similar à anterior, desenvolvida por KARGUPTA *et al.* (2017), denominada espectroscopia de impedância elétrica de microcanal (m-EIS – *micro-channel Electrical Impedance Spectroscopy*), utilizou um analisador de impedância comercial Agilent 4294 na configuração bipolar, onde foram realizadas varreduras em diversas frequências (200) na faixa de 1 kHz a 100 MHz, com uma tensão AC de 500 mV. Este processo pode permitir a redução do tempo em até 75% em relação aos sistemas comerciais existentes, na detecção da *Mycobacteria*. Outro experimento de KARGUPTA *et al.* (2018), nesta mesma técnica e instrumento, demonstrou que a “detecção por morte” para agilizar a detecção da *Mycobacterium smegmatis* e *Mycobacterium bovis*, causadoras da tuberculose. Este protocolo experimental consiste na eliminação dos demais microrganismos (bactérias e fungos) com antibióticos e na medição da permissividade (constante dielétrica) do meio que decai com a morte desses microrganismos, uma vez que as membranas celulares desses não armazenam cargas. Foi realizada uma varredura elétrica a cada hora em que a impedância elétrica é medida em 200 frequências variando de 1 kHz a 100 MHz.

Cabe salientar que a maioria dos trabalhos publicados opera, geralmente, numa única fase de crescimento do microrganismo estudado, a fase exponencial, onde o

crescimento é máximo e a quantidade de microrganismos mortos ou com membrana celular prejudicada é pequena. Além disso, apresentam tempos longos de aquisição e de repetição entre as medidas [KARGUPTA *et al.* (2018); SARRÓ *et al.* (2012, 2015)].

Página intencionalmente em Branco

Capítulo 4

Materiais e Métodos/Resultados

O trabalho desenvolvido no doutorado foi realizado em duas etapas. Para facilitar o entendimento e a compreensão, juntou-se no mesmo capítulo os tópicos *Materiais e Métodos* e *Resultados* para cada etapa. A primeira foi realizada para testar a viabilidade da aplicação do método BIS-STEP à monitorização de bioprocessos e teve como base, experimentos de crescimento da levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae*, resultando em um artigo publicado em congresso nacional (Apêndice A). Nesta etapa inicial do estudo os parâmetros do modelo elétrico de bioimpedância foram utilizados para se realizar uma regressão linear multivariada que pudesse estimar a quantidade total de biomassa, assim como o percentual de células viáveis, também resultando em um artigo publicado em congresso internacional (Apêndice B). A segunda etapa do estudo foi dedicada à extrapolação do método ao crescimento da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelenses* (**Bti**), que possui interesse de Farmanguinhos/Fiocruz (onde trabalha o autor deste trabalho). Tal microorganismo possui um comportamento de crescimento mais complexo (devido às fases vegetativa e esporulante), apresentando maior dificuldade de aplicação direta da regressão linear multivariada comumente utilizadas nas técnicas de espectroscopia dielétrica ou de biompedância. A solução desenvolvida nesta segunda etapa se mostrou mais geral e abrangente, mas ela só pode ser desenvolvida a partir da experiência adquirida na primeira etapa. Deste modo, as duas etapas do desenvolvimento passarão a serem descritas na sua ordem cronológica, embora como já mencionado, a solução da segunda etapa possa ser usada para os experimentos desenvolvidos na primeira, como será descrito.

4.1 Etapa 1: Viabilidade do uso da espectroscopia de bioimpedância BIS-STEP no monitoramento de experimentos de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*

A avaliação da viabilidade do uso do método BIS-STEP, na monitorização em tempo real de bioprocessos foi realizada através de experimentos conduzidos com leveduras, do tipo *Saccharomyces cerevisiae*, por possuir facilidade no processo de cultivo, ser um microrganismo conhecido e estabelecido no mercado. Os experimentos realizados para a avaliação consistiram em se preparar o cultivo aeróbico em escala de bancada ou laboratorial [KATOH *et al.* (2015); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); PETHIG e SMITH (2012)].

4.1.1 Os experimentos

De forma genérica, os experimentos realizados para a avaliação consistiram em se realizar o cultivo aeróbio (fermentação) de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, em escala laboratorial, de modo a se estabelecer a sua curva de crescimento em diversas fases (latente ou lag, exponencial, estacionária). Em tais experimentos foram monitoradas a quantidade de células viáveis e não-viáveis por métodos analíticos em intervalo de uma hora e, paralelamente, obtendo-se os valores da resposta de corrente elétrica através do BIS-STEP para o mesmo intervalo de tempo. A duração dos experimentos variou entre 10 h e 18 h, o critério do término foi condicionado ao decréscimo do número de células viáveis. Os experimentos possuíram as seguintes condições:

- Temperatura da incubadora climatizada com agitação: 30 °C;
- Rotação da incubadora climatizada com agitação: 200 rpm;
- Temperatura ambiente: ≈ 23 °C;
- pH inicial: $\approx 3,5$;
- Temperatura do meio de cultivo: 30 °C (temperatura ótima de crescimento da levedura); e
- *Erlenmeyers* de 500 mL: cada um com volume do meio de 200 mL.

Os experimentos de crescimento da levedura foram realizados em três frascos *erlenmeyers*, um adaptado com eletrodos submersos para medida de bioimpedância

e dois para retirada de alíquotas e análise pelos métodos tradicionais *offline* (vide Item 4.1.3) (Figura 4.1).

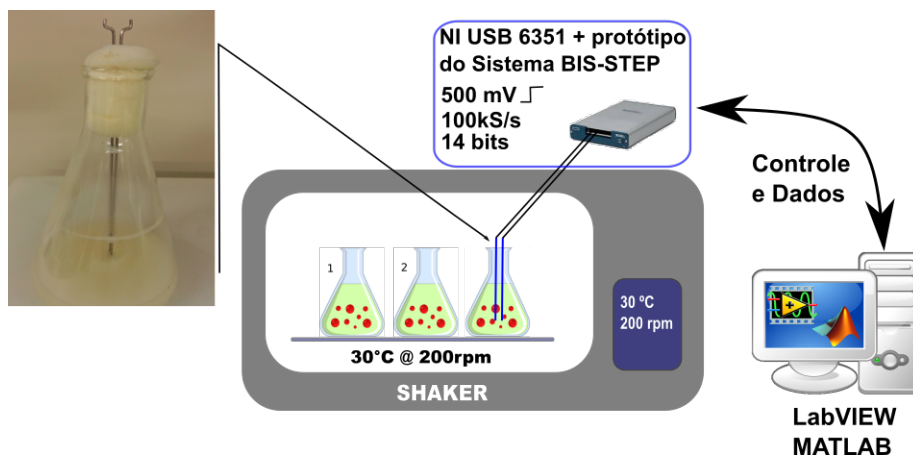


Figura 4.1 – Diagrama esquemático do arranjo experimental, mostrando detalhe dos eletrodos submersos utilizados para a aquisição de bioimpedância no *erlenmeyer* onde se realizou o cultivo da levedura.

4.1.2 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada nos experimentos foi aquela comercializada sob a forma de fermento biológico seco instantâneo fabricado pela AB Brasil Ind. e Com. Ltda, sob a marca Fleischmann[®], embalagem de 10 gramas, como pode ser visto na Figura 4.2.



Figura 4.2 – Forma comercial da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. a) Frente. b) Verso.

4.1.2.1 O meio de cultivo

As fontes nutricionais utilizadas para a preparação do meio de cultivo, adaptadas do meio experimental de OLIVEIRA (2006) foram: glicose anidra ($C_6H_{12}O_6$), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), sulfato de amônia ($(NH_4)_2SO_4$), sulfato de magnésio heptaidratado ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e extrato de levedura.

Os componentes do meio de cultivo foram dividido em três frascos *erlenmeyers* com volume de 200 mL, a fim de evitar alguma formação de calda espessa ou outro problema qualquer. A preparação do meio foi realizada pela mistura destes obtendo volume total de 600 mL. A esterilização foi realizada em autoclave nas condições de 1 atm por 20 min (equivale a 121 °C por 20 min), após a esterilização, calculou-se a quantidade (massa) de levedura para o volume do meio em cada *erlenmeyer* 200 mL.

Preparou-se o meio de cultivo rico em nutrientes (fontes nutricionais), conforme a Tabela 4.1, bem como a concentração do inóculo.

À temperatura ambiente, os frascos foram inoculados com a concentração de levedura de 0,1 g/L ou 0,5 g/L. Dois frascos *erlenmeyers* foram analisados a cada hora pelos métodos tradicionais *offline* descritos a seguir, enquanto o terceiro *erlenmeyer* foi conectado ao sistema de medição de bioimpedância.

Tabela 4.1 – Composição do meio de cultivo (fontes nutricionais) e do inóculo.

	Descrição	Concentração (g/L)
Fonte Nutricional	$C_6H_{12}O_6$	10,0
	KH_2PO_4	1,5
	$(NH_4)_2SO_4$	2,0
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1,0
	Extrato de Levedura	1,0
Inóculo	Levedura	0,1
		0,5

4.1.3 Métodos *offline* utilizados para avaliação do número de células viáveis e não-viáveis (“padrão-ouro”)

A câmara de Neubauer (Figura 4.3) foi utilizada para a contagem de células viáveis e não-viáveis em 5 quadrantes, 4 extremos e 1 central, e a quantidade média total de células por mL é dado por:

$$\frac{Células}{mL} = \frac{N^\circ Células \times Diluição \times 1000}{Área Quadrado \times Profundidade \times N^\circ Quadrados Contados} \quad (4.1)$$

O volume a ser colocado na câmara de Neubauer foi de aproximadamente 10 μ L, após a diluição feita de modo que seja permitida a contagem de células. Caso con-

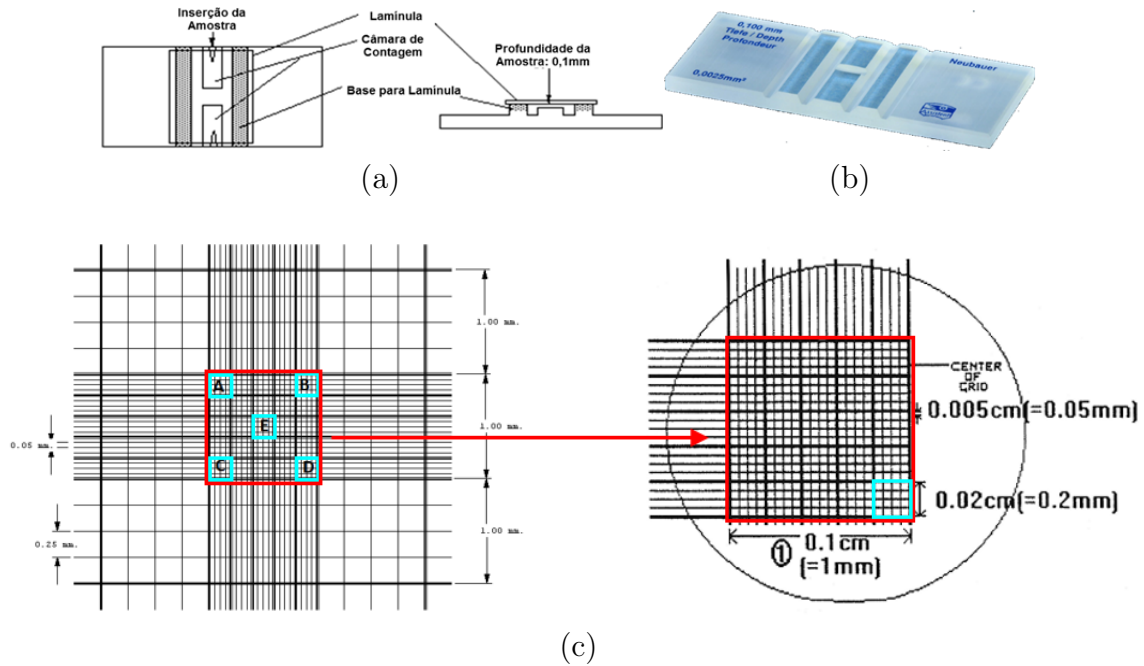


Figura 4.3 – Apresentação e forma da câmara de Neubauer.

Fonte e adaptada de: <http://laboratoryinfo.com/manual-cell-counting-neubauer-chamber/>

trário, realizava-se nova diluição até que a contagem fosse possível com um número médio de 70 células por quadrante. Cabe lembrar que quanto maior o número de diluições realizadas, menor a quantidade de células a serem contadas, conseqüentemente pode acarretar dispersões significativas.

A diferenciação dos microrganismos vivos dos mortos foi realizada com a utilização do azul de metileno, pois colore os microrganismos mortos ou inativos (debris) com a cor azul, como pode ser visto na Figura 4.4.

Dois dos três frascos *erlenmeyers* utilizados para o cultivo da levedura foram usados para retirar alíquotas alternadas, enquanto o terceiro foi monitorado *online* pelo método BIS-STEP. Para retirada da alíquota desligava-se a incubadora climatizada com agitação pelo tempo necessário e, aproveitava-se esta pausa na agitação, para efetuar as leituras pelo BIS-STEP, garantindo uma estabilidade desta medição. O procedimento analítico, tido como referência, na contagem de células foi realizado da seguinte forma:

1. Retirar uma alíquota de 1 mL do *erlenmeyer* correspondente e colocar em um microtubo (*ependorf*) devidamente identificado;
2. Retirar uma subalíquota de 50 μ L para a contagem de células, colocar a alíquota em questão em outro microtubo (*ependorf*);
3. Medir o pH com a fita;

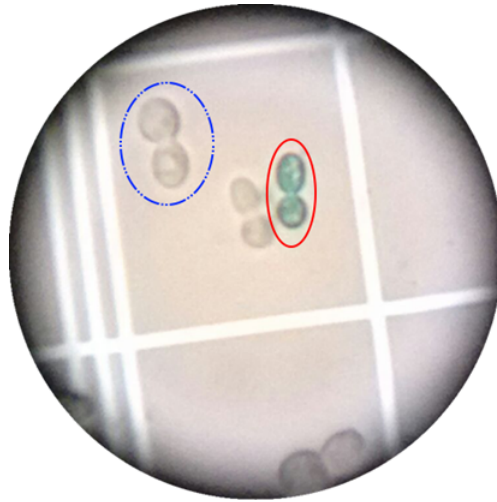


Figura 4.4 – Diferenciação entre microrganismos vivos e mortos com azul de metileno, os circundados em azul (pontilhado) estão vivos e os em vermelhos (contínua) estão mortos.

4. Adicionar $150\ \mu\text{L}$ de azul de metileno no mesmo frasco que contém $50\ \mu\text{L}$ (item 2);
5. Agitar o microtubo (*ependorf*) da contagem de células;
6. Preparar a câmara de Neubauer, retirar duas alíquotas de $10\ \mu\text{L}$ da contagem de células e colocá-las em cada câmara; e
7. Realizar a contagem das células de 5 quadrantes, 4 extremos e 1 central (Figura 4.3c), com auxílio de um microscópio com aumento de $40\times$.

Neste procedimento analítico é permitido utilizar no máximo 10% do volume total do meio de cultivo, pois acima desse valor o experimento ficaria descaracterizado.

4.1.4 Método *online* de bioimpedância utilizado para avaliação do número de células viáveis e não-viáveis

Utilizou-se um protótipo do sistema BIS-STEP montado especificamente para esta aplicação e que emprega a técnica bipolar de espectroscopia de bioimpedância baseada na resposta de corrente à aplicação de um degrau de tensão de aproximadamente 500 mV (Figura 4.1). O hardware do protótipo foi controlado por um programa desenvolvido em LabVIEW[®] 8.2, sendo os sinais da resposta de corrente adquiridos com resolução de 14 bits a uma taxa de 100 kS/s por uma placa de aquisição de dados (National Instruments, EUA – modelo USB 6351). Os eletrodos utilizados para a realização da medida de bioimpedância foram de aço inoxidável com 1,54 mm de diâmetro e espaçados de 2 mm fixados em um dos *erlenmeyer* por

meio de uma rolha de espuma isolante (veja detalhe na Figura 4.1). Cabe lembrar que os eletrodos possuem um papel importante nas medições e experimentos de bioimpedância, pois eles promovem a conversão da corrente eletrônica (circuitos eletrônicos) em corrente iônica (meio biológico) e vice-versa [MARTINSEN e GRIMNES (2008b,c)].

Como mencionado no Item 2.2.4 (Capítulo 2), uma rotina de otimização implementada em MATLAB[®] foi utilizada para se obter os valores dos parâmetros elétricos que minimizassem o erro médio quadrático entre cada medida experimental da resposta de corrente e a expectativa teórica, para facilitar o leitor reproduziu-se a Figura 2.20, como exemplificado na Figura 4.5. Os parâmetros elétricos iniciais do experimento conduzido típico (experimento 3 – os dados dos demais experimentos se encontram no Apêndice F) foram: $C_{dl} = 18,13 \mu\text{F}$; $R_s = 73,30 \Omega$; $R_{cy} = 44,24 \Omega$ e $C_m = 6,53 \mu\text{F}$.

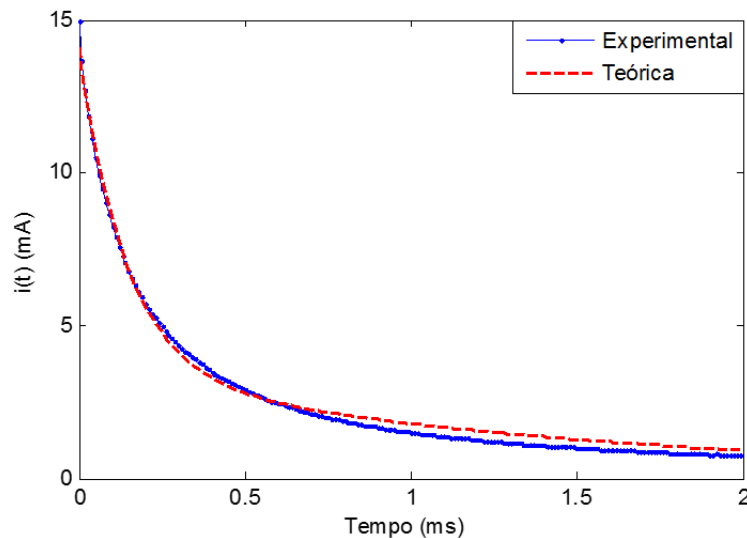


Figura 4.5 – Curva experimental típica da resposta de corrente para uma excitação de degrau de tensão (em azul – linha contínua) e ajuste da equação teórica (em vermelho – linha tracejada).

4.1.5 Análise dos dados

Os parâmetros elétricos estimados (C_{dl} , R_s , R_{cy} e C_m) foram utilizados para derivar um modelo de regressão linear multivariada para estimar o número de células totais e viáveis (Equações 4.2 e 4.3, respectivamente). Cabe ressaltar que as regressões foram realizadas no programa R (A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>), utilizando dados associados ao inóculo de 0,1 g/L

e 0,5 g/L.

$$CT = k_{T0} + k_{T1} \times \%C_m + k_{T2} \times \%C_{dl} + k_{T3} \times \%R_{cy} + k_{T4} \times \%R_s \quad (4.2)$$

$$CV = k_{V0} + k_{V1} \times \%C_m + k_{V2} \times \%C_{dl} + k_{V3} \times \%R_{cy} + k_{V4} \times \%R_s \quad (4.3)$$

onde as variações (valores percentuais) são calculados da seguinte forma: $\%X_i = \frac{X_i - X_0}{X_0} \cdot 100$, X_0 é o valor inicial.

Utilizou-se o método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] para avaliar a concordância entre os métodos analíticos (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP). O nível de significância adotado para a correlação de Pearson entre a regressão linear multivariada e a câmara de Neubauer para células totais e para o método de Bland-Altman foi de 5% ($p < 0,05$).

4.1.6 Resultados

A Figura 4.6 apresenta os resultados típicos obtidos pelo método analítico (câmara de Neubauer) para a contagem de células totais, viáveis e não-viáveis (utilizando o azul de metileno na identificação das não-viáveis). As demais curvas de contagem de células encontram-se no Item G.1 do Apêndice G.

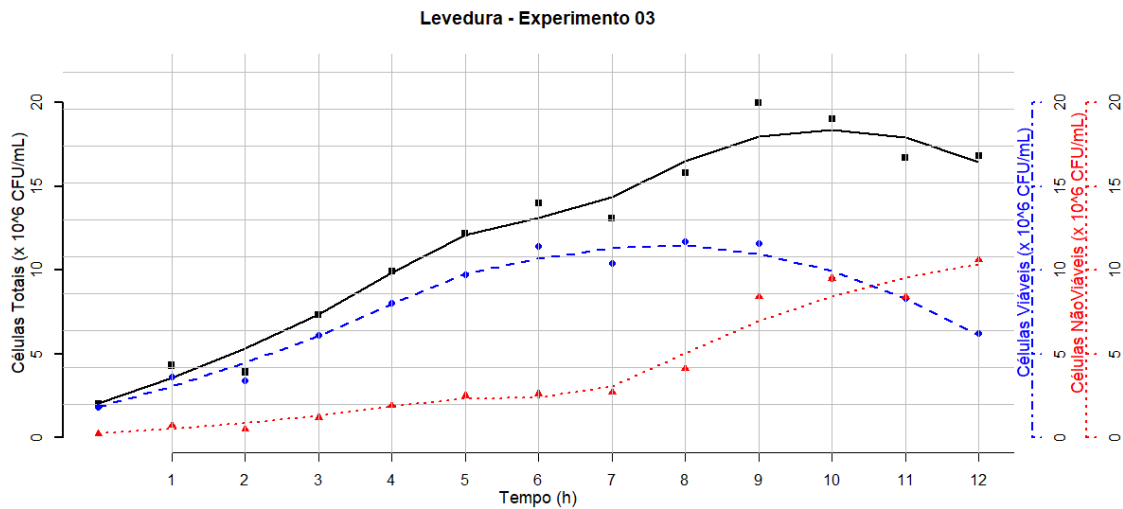


Figura 4.6 – Contagem de células (*Saccharomyces cerevisiae*) na câmara de Neubauer, onde o sinal ■ e a *linha contínua* (em preto) indicam as contagens de células totais e seu ajuste; o sinal ● e a *linha tracejada* (em azul) as contagens de células viáveis e seu ajuste; e o sinal ▲ e a *linha pontilhada* (em vermelho) as contagens de células não-viáveis (utilizando azul de metileno).

No Apêndice F encontram-se os dados obtidos no experimento conduzido com a *Saccharomyces cerevisiae*, bem como a evolução temporal destes. Os valores iniciais

dos parâmetros elétricos da avaliação do método proposto foram estimados, para o experimento 3, como: $R_s = 73,30 \Omega$; $R_{cy} = 44,24 \Omega$; $C_m = 6,53 \mu F$ e $C_{dl} = 18,13 \mu F$ (Tabela 4.2). Em alguns experimentos, como por exemplo os experimentos 3 e 8, a contagem de células totais apresenta um valor abaixo do esperado. Acredita-se que este fato foi devido às imperfeições na homogeneização do meio de cultivo, ao tempo para a retirada da alíquota, que pode ter sido longo suficiente para iniciar a precipitação das células (microrganismos) e à retirada do sobrenadante juntamente com microrganismos/células.

De modo a facilitar a verificação das variáveis em relação dos seus valores iniciais, que pode ser modificado em função da imprecisão do inóculo inicial e a outros fatores experimentais, realizou-se a avaliação da variação relativa de cada parâmetro do modelo elétrico. As curvas das variações relativas das capacitâncias de membrana e de eletrodo para um experimento típico (experimento 3), assim como das resistências intracelular e do meio de cultivo, podem ser vistas nas Figuras 4.7 e 4.8, respectivamente (as curvas dos demais experimentos se encontram no Item G.1 do Apêndice G).

Inicialmente, foram feitos experimentos conduzidos com a levedura comercial *Saccharomyces cerevisiae* cujas concentrações iniciais do inóculo foram 0,1 g/L (total de 03 experimentos) e 0,5 g/L (total de 05 experimentos). Houve uma melhoria no método analítico, na contagem de células com azul de metileno, utilizaram-se as duas câmaras de Neubauer. Assim, através da média dos dados obtidos (duplicatas), minimizam-se as discrepâncias das alíquotas coletadas. A apresentação dos dados se refere às curvas médias do experimento 8 (Figura 4.9).

Tabela 4.2 – Valores iniciais dos parâmetros elétricos (bioimpedância) e de células totais (câmara de Neubauer) para cada experimento conduzido da *Saccharomyces cerevisiae*.

Experimento	Concentração Inóculo (g/L)	$R_s (\Omega)^1$	$R_{cy} (\Omega)^2$	$C_m (\mu F)^3$	$C_{dl} (\mu F)^4$	Células Totais ($\times 10^5$ Células/mL)
1	0,5	63,5	46,2	7,0	17,8	35,0
2	0,5	70,1	46,0	7,0	20,7	31,0
3	0,5	73,3	44,2	6,5	18,1	20,0
4	0,5	69,4	42,5	8,2	22,3	41,0
5	0,5	56,4	36,2	7,0	19,0	52,0
6	0,1	63,5	38,8	7,7	18,3	24,0
7	0,1	52,7	36,4	9,2	22,0	12,0
8	0,1	66,4	39,1	7,8	19,1	8,0

¹Resistência da solução ou meio de cultivo

²Resistência intracelular

³Capacitância da membrana celular

⁴Capacitância de eletrodo

O modelo de regressão linear multivariada empregado (vide artigo publicado

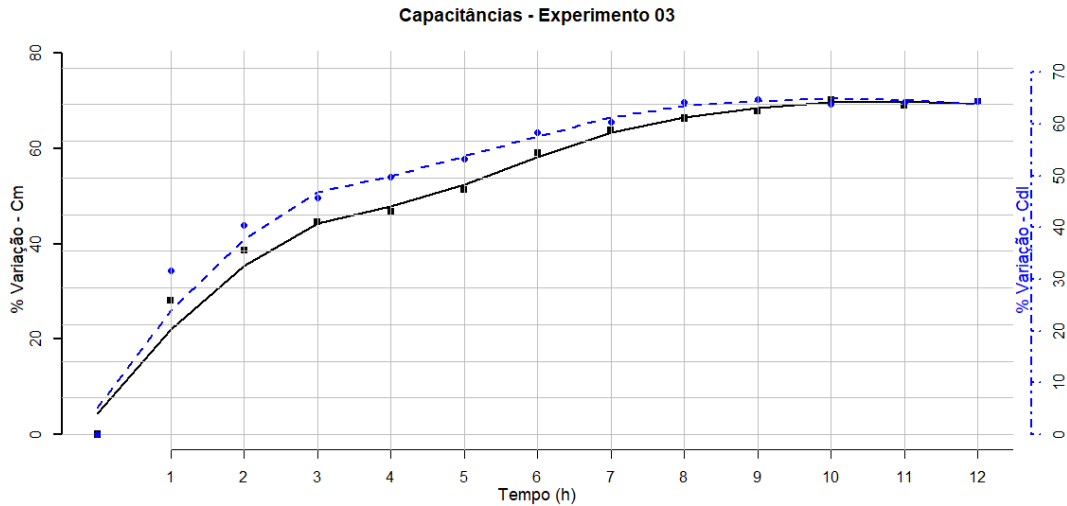


Figura 4.7 – Curvas normalizadas das capacitâncias de membrana e de eletrodo para um experimento típico (experimento 3), onde ■ e *linha contínua* (cor preta) representam a variação da capacitância da membrana celular (C_m) e seu ajuste; e ● e *linha tracejada* (cor azul) representam a capacitância de eletrodo (C_{dl}) e seu ajuste.

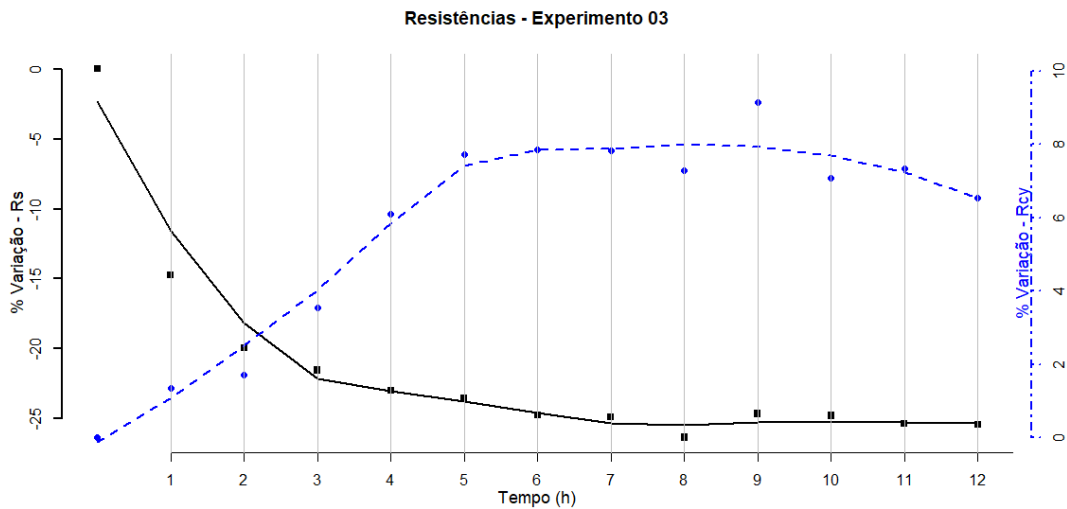


Figura 4.8 – Curvas normalizadas das resistências do meio de cultivo e intracelular para um experimento típico (experimento 3), onde ■ e *linha contínua* (cor preta) representam a variação da resistência do meio de cultivo (R_s) e seu ajuste; e ● e *linha tracejada* (cor azul) representam a resistência intracelular (R_{cy}) e seu ajuste.

– Apêndice B [SALVINO DA SILVA *et al.* (2018)], com a utilização dos valores percentuais dos parâmetros do modelo elétrico (para facilitar o leitor reproduziu-se

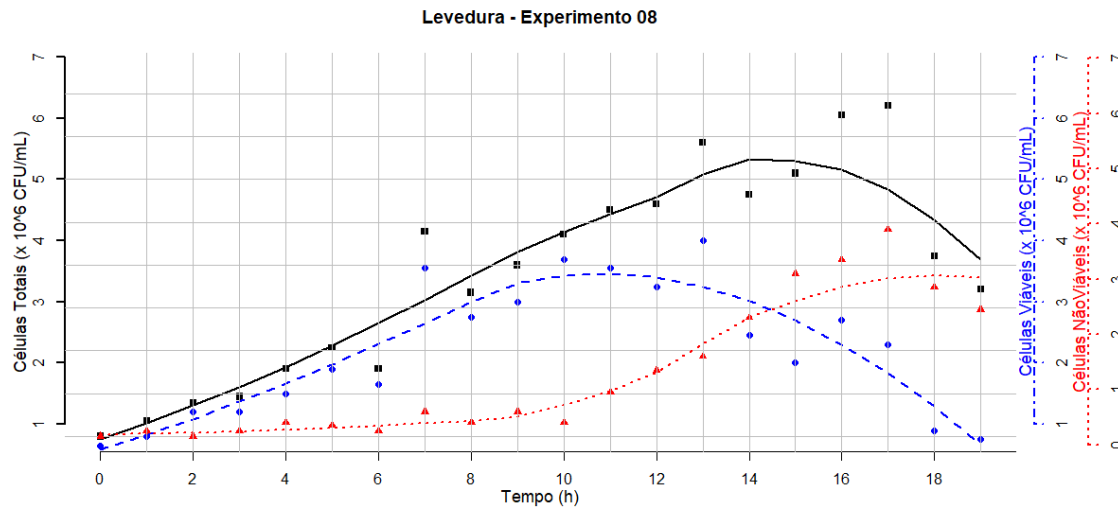


Figura 4.9 – Curvas médias de células totais – CTm e seu ajuste (■ e a *linha contínua* – cor preta), células viáveis – CVm e seu ajuste (● e a *linha tracejada* – cor azul) e células não-viáveis – NVm e seu ajuste (▲ e a *linha pontilhada* – cor vermelha) do experimento 8 com *Saccharomyces cerevisiae* utilizando a câmara de Neubauer, com as suas respectivas curvas ajustadas.

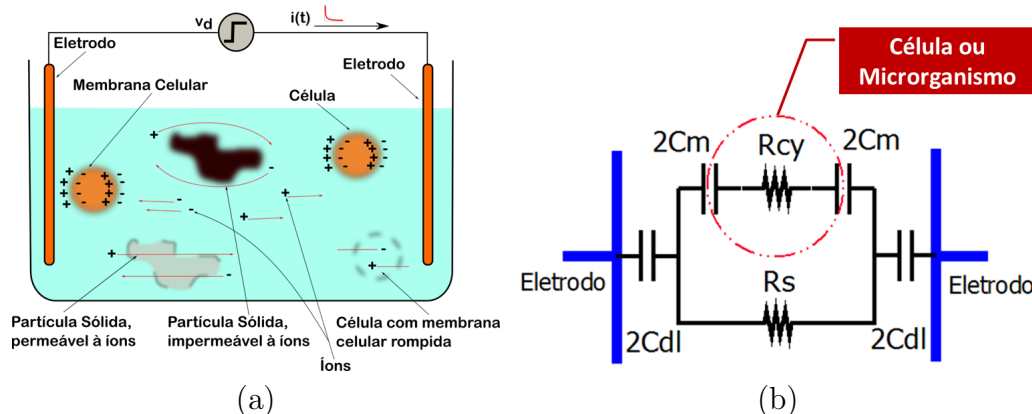


Figura 4.10 – Meio de cultivo (substrato) biológico (a) e seu circuito elétrico equivalente (b), onde v_d é o degrau de tensão, $i(t)$ é corrente elétrica no domínio do tempo, C_m é a capacitância da membrana celular, R_{cy} é a resistência intracelular, C_{dl} é a capacitância de eletrodo e R_s é a resistência do meio de cultivo (suspensão).

Fonte e adaptado de: (Figura 4.10a)

<http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099.1/8526/memoria.pdf>

a Figura 2.18, vide Figura 4.10b), pode ser descrito da seguinte forma:

$$CT = 919055 + 1089499 \times \%C_m - 1208346 \times \%C_{dl} + 888462 \times \%R_{cy} - 512740 \times \%R_s \quad (4.4)$$

$$CV = 1318048 + 670174 \times \%C_m - 769861 \times \%C_{dl} + 492001 \times \%R_{cy} - 370340 \times \%R_s \quad (4.5)$$

A curva de regressão linear multivariada, ou melhor, a reta que representa a quantidade de células totais para o Modelo (Equação 4.4) é mostrada na Figura 4.11a, bem como a que representa a quantidade de células viáveis (Equação 4.5) na Figura 4.11b. Para ambas as Figuras, 4.11a e 4.11b, a reta mais fina (em vermelho) representa a condição ideal ($x = y$ é a reta ou função identidade), enquanto que a reta mais grossa (preta) é a aproximação linear decorrente da regressão. Nestes modelos, observou-se que os pontos estão distribuídos ao longo da reta mais grossa (preta), passando pelo “meio” de todos os pontos.

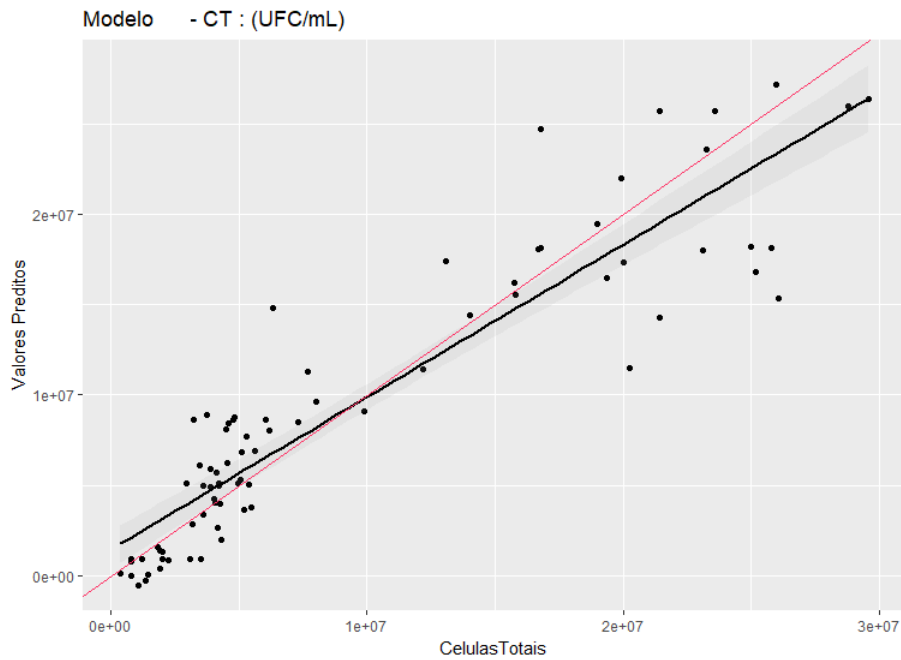
A Tabela 4.3 mostra os resultados da regressão linear multivariada para o número total de células e para as viáveis ($r=0,918$ e $r=0,858$, respectivamente).

A Figura 4.12 apresenta a aplicação do método de Bland-Altman na comparação entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e bioimpedância (BIS-STEP), onde o eixo y corresponde ao percentual da razão da diferença entre os métodos pela média dessa diferença [BLAND e ALTMAN (1986)]. Nesta comparação foram utilizados todos os dados da regressão linear multivariada.

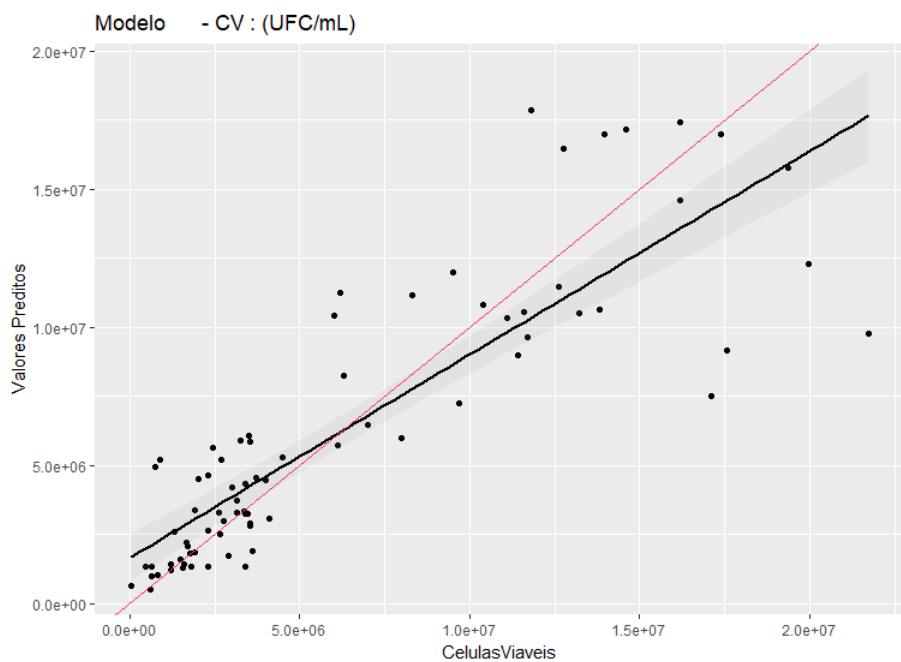
Tabela 4.3 – Regressão linear multiparamétrica do experimento conduzido com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, resultante dos modelos descritos pelas Equações 4.4 e 4.5.

	Variável Dependente	
	Células Totais	Células Viáveis
delta_Cm	1089499*** (99815)	670174*** (86304)
delta_Cdl	-1208346*** (104291)	-769861*** (90173)
delta_Rcy	888462*** (92907)	492001*** (80331)
delta_Rs	-512740*** (67409)	-370340** (58284)
Constante	919055 (757690)	1318048** (655122)
Observations	78	78
r ²	0.842	0.737
r	0.918	0.858
Adjusted r ²	0.834	0.722
Residual Std. Error	3476000 (df=73)	3006000 (df=73)
F Statistic	97.433*** (df=4; 73)	51.075*** (df=4; 73)
Note:	*p<0.1; **p<0.05; ***p<0.01	

Esses resultados foram satisfatórios, uma vez que o valor da regressão (R) é maior do que 0,8.



(a)



(b)

Figura 4.11 – Curvas de regressão linear multivariada para *Saccharomyces cerevisiae*: **a)** Células totais (CT) e **b)** viáveis (CV), respectivamente, onde a linha fina (vermelha) representa da condição ideal (a reta ou função identidade $y = x$), enquanto que a reta mais grossa (preta) é a aproximação linear decorrente da regressão.

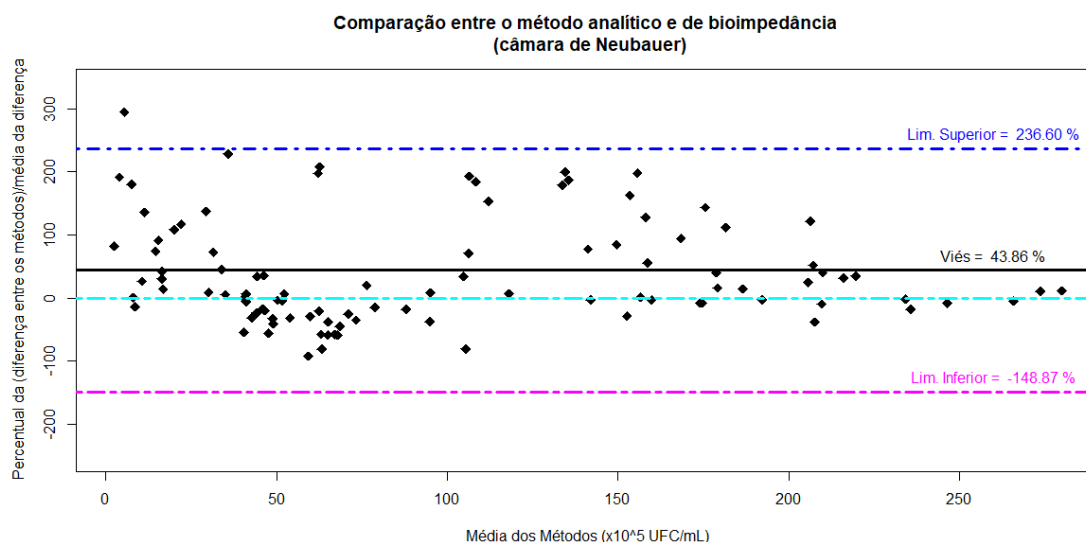


Figura 4.12 – Avaliação de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) utilizando a regressão linear multivariada do experimento com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde a viés em preto (linha contínua) foi de 43,86% sobre a média da diferença e 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

4.2 Etapa 2: Melhoramento e aplicação do método no monitoramento do crescimento *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti)

Como foi mencionado, a etapa 2 surgiu devido às dificuldades na aplicação direta da regressão linear multivariada, na aplicação da correlação cruzada e na aplicação de dados longitudinais (caso especial de série temporal). A solução encontrada se mostrou mais geral e abrangente, de modo que foi possível sua utilização nos dados já obtidos na etapa 1.

4.2.1 Os experimentos

Apesar do sucesso do uso das técnicas de espectroscopia dielétrica ou de bioimpedância para monitorar a quantidade de biomassa em um bioprocessamento, alguns microrganismos, como por exemplo o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (**Bti**), apresentam um crescimento complexo, onde as células podem exibir alterações metabólicas, fisiológicas e cinéticas significativas; o que pode afetar a determinação da quantidade total de biomassa por meio da aplicação direta dos métodos dielétrico e de bioimpedância [FEDERICI *et al.* (2010); RIVERA *et al.* (1999)]. Deste modo, os experimentos da etapa 2 foram relacionados ao crescimento da bactéria **Bti** e

foram realizados em três grupos (triplicata) de dois frascos *erlenmeyers* cada, com diferentes concentrações iniciais (inóculos) (Figura 4.13). Em cada grupo, um *erlenmeyer* foi adaptado com eletrodos metálicos para medições de bioimpedância e o outro foi utilizado para remoção de alíquotas, que foi analisado por um método *offline* tradicional (método McFarland). A duração de cada experimento foi de 18 h, onde a aquisição da resposta de corrente elétrica e a retirada das alíquotas foram realizadas com intervalo de uma hora.

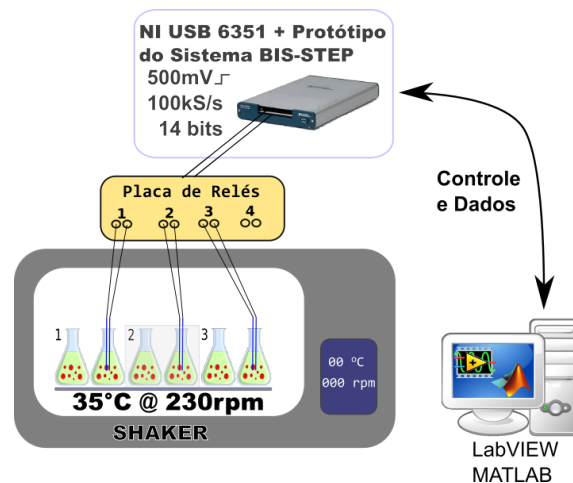


Figura 4.13 – Diagrama esquemático do arranjo experimental.

4.2.2 A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* — Bti

O microorganismo cepa **Bti**, IPS-82 oriundo do Instituto Pasteur – França, cedido por Farmanguinhos/Fiocruz, possui um crescimento complexo pois, ao longo do tempo, suas células mudam da forma vegetativa para a esporulada, passando por significativas mudanças [FEDERICI *et al.* (2010); RIVERA *et al.* (1999)].

4.2.3 O meio de cultivo

Por questões de proteção industrial, não poderão ser fornecidos detalhes sobre a formulação do meio de cultivo otimizado desenvolvido por Farmanguinhos/Fiocruz, podendo-se somente afirmar que o mesmo contém: glicose anidra ($C_6H_{12}O_6$); proteína de soja; cloreto de sódio ($NaCl$); extrato de levedura; e mistura seca de sais (composta de sulfato de magnésio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$); sulfato de manganês ($MnSO_4 \cdot 4H_2O$); sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$); sulfato de ferro ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$); e cloreto de cálcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)).

Foram implementados um total de 12 experimentos de crescimento de **Bti**. Para cada experimento, seis frascos *erlenmeyers* de 500 mL contendo 220 mL de meio

de cultivo, autoclavados a 121 °C por 20 min. Os frascos foram inoculados com pré-inóculo de 5%, 10% e 15% v/v de células em 220 mL de meio de cultivo na temperatura ambiente. Como mencionado anteriormente, em cada grupo de dois *erlenmeyers*, um foi analisado pelo método McFarland (método tradicional *offline* que será melhor explicado adiante) [HARRIGAN (2013); LEBER (2016); PFALLER *et al.* (2015)] e o outro foi conectado ao hardware de medição de bioimpedância através de eletrodos fixados no *erlenmeyer*, sendo todos colocados numa incubadora climatizada com agitação a 230 rpm a 35 °C (Figura 4.13).

4.2.4 Métodos *offline* utilizados para avaliação do número de células (“padrão-ouro”)

Turbidimetria e nefelometria são técnicas clássicas usadas para estimar a concentração de células durante experimentos de crescimento de microrganismos. A turbidimetria quantifica o grau de atenuação (absorbância) de um feixe de luz que atravessa uma amostra do meio de cultura; enquanto a nefelometria mede a mesma turbidez pelo grau de espalhamento de luz produzido pela amostra do meio [BROWN *et al.* (2005)]. Os padrões de turbidez de McFarland foram utilizados para estimar o número de bactérias em suspensão ou por meio de comparação visual com o padrão McFarland ou por meio do uso de um equipamento especial (espectrofotômetro – densiCHEK® - detalhes vide Anexo A). Por exemplo, a absorbância de 0,5 McF (escala McFarland) corresponde a $1,5 \times 10^8$ bacteria/mL ou CFU/mL, 1,0 McF (escala McFarland) corresponde a $3,0 \times 10^8$ bacteria/mL ou CFU/mL até 10,0 McF (escala de McFarland) corresponde a $30,0 \times 10^8$ bacteria/mL ou CFU/mL [HARRIGAN (2013); LEBER (2016); PFALLER *et al.* (2015)].

Como já mencionado, um dos dois *erlenmeyers* de cada triplicata foi usado para retirar alíquotas, enquanto que o segundo foi monitorado pelo método BIS-STEP (placa de relés – Figura 4.13). Para retirada da alíquota desligava-se a incubadora climatizada com agitação pelo tempo necessário e, aproveitava-se esta pausa na agitação, para efetuar as leituras pelo BIS-STEP, garantindo uma estabilidade desta medição. O procedimento analítico para a contagem de células, utilizou-se o espectrofotômetro densiCHEK® (detalhes vide Anexo A), que compara a amostra retirada com a escala de McFarland, sendo realizado da seguinte forma:

1. Preparar o densiCHEK®, com os padrões de McFarland (pré-aquecimento);
2. Retirar uma alíquota de 1 mL do *erlenmeyer* correspondente e colocar em um microtubo (*eppendorf*) devidamente identificado;
3. Retirar uma subalíquota de 300 μ L para a contagem de células, colocar a alíquota em questão em tubo de ensaio;

4. Medir o pH com a fita;
5. Adicionar 2700 μL de água destilada no tubo que continha os 300 μL (item 3);
6. Agitar o tubo da contagem de células;
7. Realizar da contagem das células totais com densiCHEK[®];
8. Verificar se a indicação, na escala de McFaraland, esteja compreendida entre 0 e 4 McF; e
9. Caso a medição indique 4.00 McF, realizar uma nova diluição da amostra do tubo de ensaio com adição do volume de 3000 μL ; agitar e retirar 3000 μL em um novo tubo de ensaio para nova medição, a partir do item 6.

4.2.5 Observação do comportamento da capacitância de membrana (C_m) e sua relação com OUR

Como mencionado no Capítulo 3, quando da aplicação do campo elétrico decorrente do degrau de tensão de excitação da técnica BIS-STEP, as membranas celulares (C_m) das células vivas devem ser polarizadas e a capacitância resultante (C_m) deve ser correlacionada com o número total de células, ou seja, a concentração de biomassa. No entanto, durante a fase esporulada, as alterações observadas na membrana das células de *Bacillus thuringiensis* levam a uma diminuição significativa da sua permissividade [SARRAFZADEH *et al.* (2005)]. Assim, seria razoável esperar que a capacitância C_m resultante estimada pelo método BIS-STEP não siga apenas a concentração total de células. Em vez disso, o comportamento dessa capacitância ao longo do tempo também deve refletir as mudanças dos tipos de células observadas da segunda para a terceira fase do crescimento, com consequente diminuição das células vegetativas e aumento das células esporuladas. De fato, os experimentos realizados na Etapa 2 do presente estudo mostraram um comportamento da evolução da capacitância C_m ao longo do tempo (Figura 4.14a) que se assemelha ao comportamento da taxa de consumo de oxigênio (OUR) (Figura 4.14b) relatada em alguns estudos anteriores [PANAROTTO (2014); ZABRISKIE e HUMPHREY (1978)]. Então, uma vez que OUR está correlacionado com a concentração de células (X) pela Equação 2.2 [PANAROTTO (2014)], levanta-se uma hipótese que a capacitância C_m esteja relacionada à concentração de células totais pela Equação 4.6.

$$C_m = k_0 X + k_1 \left[\frac{dX}{dt} \right] \quad (4.6)$$

onde,

k_0 corresponde a uma constante similar a m_0 ; e

k_1 corresponde a uma constante similar a $\frac{1}{Y_{G0}}$.

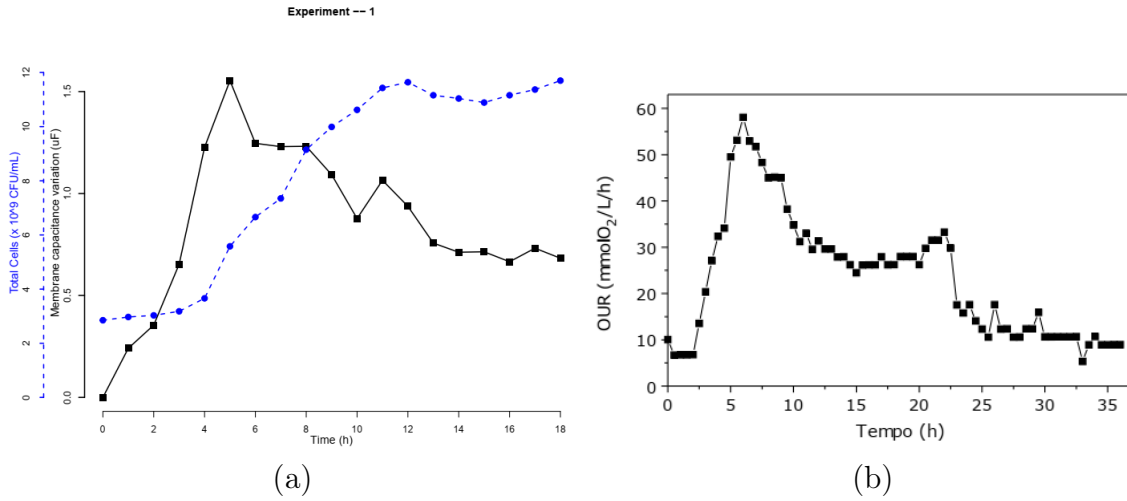


Figura 4.14 – **a)** Comportamento da capacitância de membrana (C_m) (■ - linha contínua) e a contagem de células totais (● - linha pontilhada) ao longo do tempo neste estudo. **b)** Curva da demanda de oxigênio (OUR) em uma cultura **Bti** – PANAROTTO (2014).

No domínio de Laplace, a Equação 4.6 pode ser escrita como:

$$C_m(s) = k_0 X(s) + k_1 S X(s) \quad (4.7)$$

Isso leva a

$$X(s) = C_m(s) \frac{a_0}{[\omega_0 + S]} \quad (4.8)$$

onde, $a_0 = \frac{1}{k_1}$ e $\omega_0 = \frac{k_0}{k_1}$.

A Equação 4.8 indica que as estimativas da concentração de células (X) podem ser obtidas a partir das estimativas da capacitância de membrana (C_m) através de um filtro passa-baixa. Considerando que a dinâmica temporal de OUR e C_m são semelhantes, coloca-se a hipótese que as frequências de corte das duas variáveis sejam similares, de modo que comparando-se as Equações 2.2 e 4.6 pode-se observar que

$$\omega_0 = m_0 \cdot Y_{G0} \quad (4.9)$$

Entretanto, a constante de ganho a_0 deve ser determinada experimentalmente.

4.2.6 Análise dos dados

A série temporal dos valores de C_m estimados pelo BIS-STEP foi filtrada pelo filtro passa-baixas de primeira ordem (Equação 4.8) para a obtenção da série temporal dos valores de concentração das células totais X , utilizando a análise pela

demanda de oxigênio (OUR) [PANAROTTO (2014); ZABRISKIE e HUMPHREY (1978)], considerou-se o uso dos valores dos parâmetros m_0 e Y_{G0} de PANAROTTO (2014) para calcular ω_0 , o que levou a $\omega_0 = 0,0602$ rad/s. O valor de a_0 foi obtido empiricamente a partir de dados experimentais, levando a $a_0 = 11,95$. Posteriormente, a concentração de células totais X foi correlacionada com as estimativas correspondentes avaliadas pelo método *offline* de McFarland.

Utilizou-se o método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] para avaliar a concordância entre os métodos analíticos (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP). O nível de significância adotado para correlação de Pearson de ambos métodos e para o método de Bland-Altman foi de 5% ($p < 0,05$).

4.2.7 Resultados

Os valores iniciais dos parâmetros do modelo elétrico proposto e os valores obtidos pelo método analítico (McFarland) para a bactéria **Bti** podem ser vistos na Tabela 4.4 para cada um dos doze experimentos conduzidos (a evolução temporal dos parâmetros do modelo elétrico de cada experimento encontra-se no Apêndice H). Em alguns experimentos, como por exemplo o experimento 5, a contagem de células totais apresenta um valor abaixo do esperado. Acredita-se que este fato foi devido às imperfeições na homogenização do meio de cultivo e o tempo para a retirada da alíquota, que pode ter sido longo suficiente para iniciar a precipitação das células (microrganismos).

Tabela 4.4 – Valores iniciais dos parâmetros elétricos (bioimpedância) e de células totais (McFarland) para cada experimento conduzido do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (**Bti**).

Experimento	Concentração Inóculo (%)	Rs (Ω) ¹	Rcy (Ω) ²	Cm (μF) ³	Cdl (μF) ⁴	Células Totais ($\times 10^9$ CFU/mL)
1	5	94,0	35,1	7,0	17,4	2,9
2	10	74,6	32,5	8,9	22,6	3,2
3	15	100,7	29,7	10,0	26,2	3,5
4	5	76,4	34,7	9,7	23,3	2,5
5	10	102,4	32,3	7,9	20,1	2,4
6	15	71,6	31,4	10,5	24,5	2,9
7	5	107,5	29,1	8,3	22,4	2,8
8	10	82,6	30,5	10,3	24,0	2,9
9	15	96,1	30,6	6,5	16,5	3,0
10	5	110,6	36,1	7,4	17,8	3,2
11	10	86,4	30,3	8,2	20,2	3,5
12	15	80,2	30,3	8,6	21,0	3,8

¹ Resistência da solução ou meio de cultivo

² Resistência intracelular

³ Capacitância da membrana celular

⁴ Capacitância de eletrodo

Comparando as fontes nutricionais do meio de cultivo entre este trabalho e o de PANAROTTO (2014), apresentada na Tabela 4.5, observa-se que as diferenças impactam somente na produção de cristais entomotóxicos (δ -endotoxina) e esporos (ativador de esporogênese) [SARRAFZADEH *et al.* (2005)]. Assim, considerou-se a utilização dos valores dos parâmetros m_0 e Y_{G0} do trabalho de PANAROTTO (2014) para determinar ω_0 (Equação 4.9), resultando em $\omega_0 = 0,0602$ rad/s. O valor de a_0 foi obtido empiricamente dos dados experimentais, resultando em $a_0 = 11,95$.

Tabela 4.5 – Comparação entre fontes nutricionais do cultivo de **Bti** deste estudo com o de PANAROTTO (2014).

Fonte Nutricional	Este estudo	PANAROTTO (2014)
$C_6H_{12}O_6$	X	X
$NaCl$	X	—
Proteína de Soja	X	—
Extrato de levedura	X	X
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	X	X
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	X	X
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	X	—
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	X	—
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	X	X

A Figura 4.15 mostra a série temporal da capacitância de membrana (C_m) e dos valores do total de células experimentais e estimadas para dois exemplos dos doze experimentos conduzidos com **Bti** (as demais figuras se encontram no Apêndice I).

O coeficiente da correlação de Pearson entre as séries temporais das contagem de células totais avaliadas pelo método de McFarland (considerado “padrão-ouro”) e as estimadas pelo método proposto foi calculado, para cada um dos doze experimentos conduzidos (Tabela 4.7), assim como o coeficiente de correlação médio (\bar{r}), que foi de 0,99.

Os gráficos das variações das capacitâncias de membrana (C_m) e de eletrodo (C_d); e das resistências intracelular (R_{cy}) e do meio de cultivo (R_s) para **Bti**, de um experimento típico (experimento 07), podem ser vistos nas Figuras 4.16 e 4.17, respectivamente.

Na Figura 4.18 apresenta a comparação entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) através do método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)], utilizando os experimentos 01 e 11 para **Bti**. Os demais gráficos se encontram no Item J.2.1 do Apêndice J.2. Na Tabela 4.6, reprodução da Tabela J.1, apresentou os vieses de Bland-Altman dos experimentos com **Bti**. Cabe ressaltar que o experimento 2 não foi considerado nas análises. Este valor de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] alto deve-se a uma falha/pane na rede elétrica durante a aquisição dos dados de bioimpedância (BIS-STEP), indicando que o mesmo é um *outlier*.

Tabela 4.6 – Determinação das médias pelo método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] para **Bti**.

Arquivo	Concentração de inóculo (%)	número do experimento	Bland-Altman Viés (%)
Bti20181219	5	1	-24,40
Bti20181219	10	2	-121,61
Bti20181219	15	3	-35,48
Bti20190111	5	4	20,81
Bti20190111	10	5	79,91
Bti20190111	15	6	28,72
Bti20190119	5	7	18,54
Bti20190119	10	8	15,33
Bti20190119	15	9	-9,03
Bti20190127	05	10	4,57
Bti20190127	10	11	-3,95
Bti20190127	15	12	-29,46

4.2.7.1 Aplicação do melhoramento do método aos dados de *Saccharomyces cerevisiae*

De modo a avaliar se o melhoramento do método de monitorização de bioprocessos por bioimpedância desenvolvido e testado para a bactéria **Bti** (Teoria da Demanda de Oxigênio — OUR (*Oxygen Uptake Rate*)) poderia também ser aplicado a microrganismos com crescimento simples, aplicou-se o mesmo a oito dados de bioimpedância obtidos na primeira etapa do trabalho para crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Tabela 4.2). Alguns experimentos apresentam valores da contagem de células totais bem abaixo do esperado, acredita-se que foi devido à retirada da alíquota do meio de cultivo, que não foi homogeneizada adequadamente e/ou à retirada do sobrenadante, que pode ter absorvido algumas células (microrganismos), como por exemplo os experimentos 7 e 8 (Tabela 4.2).

A composição utilizada para o meio de cultivo, não foi otimizada em função das necessidades metabólicas da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e, sim, adaptada de OLIVEIRA (2006) substituindo o açúcar mascavo por glicose anidra e acrescentando-se o extrato de levedura. Então, considerando os valores dos parâmetros m_0 e Y_{G0} do trabalho de ZABRISKIE e HUMPHREY (1978) na determinação de ω_0 (Equação 4.9), resultando em $\omega_0 = 0,1414$ rad/s. Os valores de a_0 foram obtidos, também, empiricamente dos dados experimentais, resultando em $a_{01} = 56,41 \times 10^5$ para o inóculo de 0,1 g/L e $a_{05} = 161,10 \times 10^5$ para o inóculo de 0,5 g/L.

A Figura 4.19 exemplifica a evolução temporal da capacitância da membrana celular (C_m) e dos valores do número total de células experimentais e estimadas para dois dos oito experimentos conduzidos com *Saccharomyces cerevisiae*, os demais se

Tabela 4.7 – Correlação entre as células totais experimentais e estimadas para cada experimento conduzido do *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (**Bti**).

Experimento	r	p-value
1	0,99	$1,02 \times 10^{-17}$
2	1,00	$1,69 \times 10^{-18}$
3	0,97	$2,27 \times 10^{-11}$
4	1,00	$1,13 \times 10^{-22}$
5	0,99	$4,85 \times 10^{-18}$
6	1,00	$6,92 \times 10^{-24}$
7	0,97	$5,64 \times 10^{-12}$
8	0,98	$4,15 \times 10^{-14}$
9	1,00	$3,03 \times 10^{-22}$
10	0,99	$5,24 \times 10^{-15}$
11	1,00	$1,77 \times 10^{-19}$
12	0,99	$1,50 \times 10^{-15}$
$\bar{r} = 0,99$		

encontram no Item G.2 do Apêndice G.

O coeficiente da correlação de Pearson entre as séries temporais das contagens de células totais avaliadas pelo método da câmara de Neubauer (considerado "padrão-ouro") e as estimadas pelo método proposto foi calculado, para cada um dos oito experimentos conduzidos (Tabela 4.8), assim como o coeficiente de correlação médio (\bar{r}) de 0,91.

Na Figura 4.20 apresenta a comparação entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) através do método de Bland-Altman, optou-se substituir a diferença entre os métodos pelo percentual da razão da diferença entre os métodos pela média dessa diferença [BLAND e ALTMAN (1986)], utilizando os experimentos 2 e 8 para a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, correspondendo aos inóculos de 0,5 g/L e 0,1 g/L, respectivamente. Os demais gráficos se encontram no Item J.2.2 do Apêndice J.2. Na Tabela 4.9, reprodução da Tabela J.2, apresentou as médias de Bland-Altman dos experimentos com *Saccharomyces cerevisiae*.

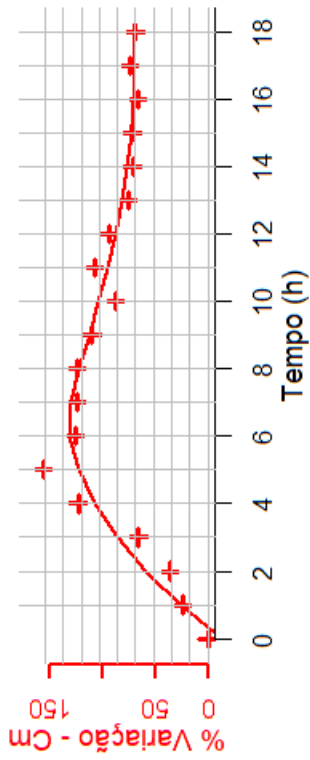
Tabela 4.8 – Correlação entre as células totais experimentais e estimadas para cada experimento conduzido da *Saccharomyces cerevisiae*.

Experimento	r	p-value
1	0,95	$1,98 \times 10^{-6}$
2	0,97	$5,78 \times 10^{-8}$
3	0,98	$1,63 \times 10^{-9}$
4	0,99	$4,59 \times 10^{-9}$
5	0,82	$2,20 \times 10^{-3}$
6	0,97	$2,29 \times 10^{-10}$
7	0,88	$2,58 \times 10^{-7}$
8	0,80	$2,14 \times 10^{-5}$
$\bar{r} = 0,91$		

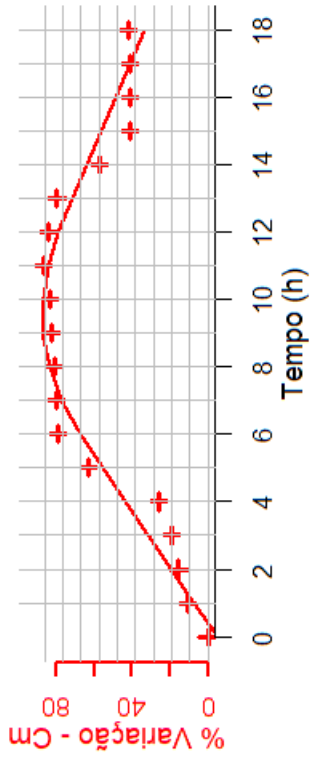
Tabela 4.9 – Determinação das médias pelo método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] para *Saccharomyces cerevisiae*.

Arquivo	Concentração de inóculo (g/L)	número do experimento	Bland-Altman Viés (%)
Sc20170315	0,5	1	15,45
Sc20170328	0,5	2	1,27
Sc20170413	0,5	3	-106,80
Sc20170503	0,5	4	-78,31
Sc20170515	0,5	5	82,20
Sc20170801	0,1	6	-123,85
Sc20170831	0,1	7	81,71
Sc20170921	0,1	8	34,51

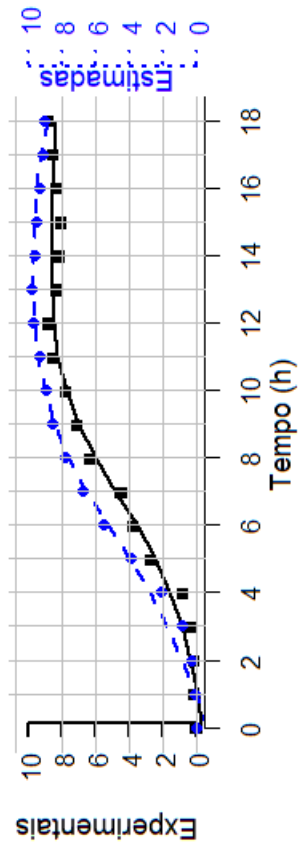
Experimento 01



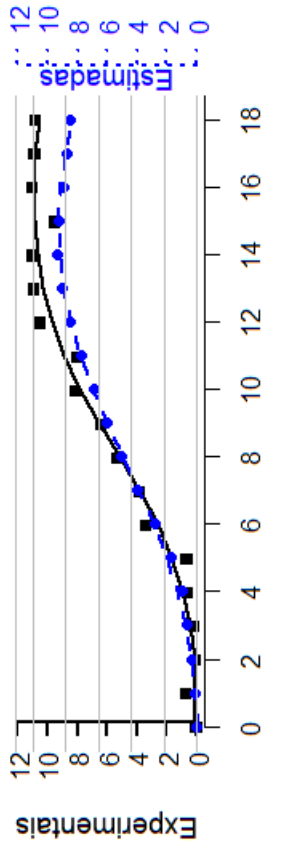
Experimento 11



Células Totais - x10⁹ CFU/mL



Células Totais - x10⁹ CFU/mL



(a)

Figura 4.15 – Séries temporais da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para os experimentos 01 (a) e 11 (b) com **Bti**. No gráfico superior de cada figura, o sinal + e *linha tracejada* indicam as variações de C_m e seu ajuste, respectivamente. No gráfico inferior de cada figura, compara-se o total de células experimentais medido pelo método de McFarland e seu ajuste (sinal ■ e *linha contínua*) com o total de células estimadas pelo método proposto (Equação 4.8) e seu ajuste (● e *linha tracejada*, respectivamente).

(b)

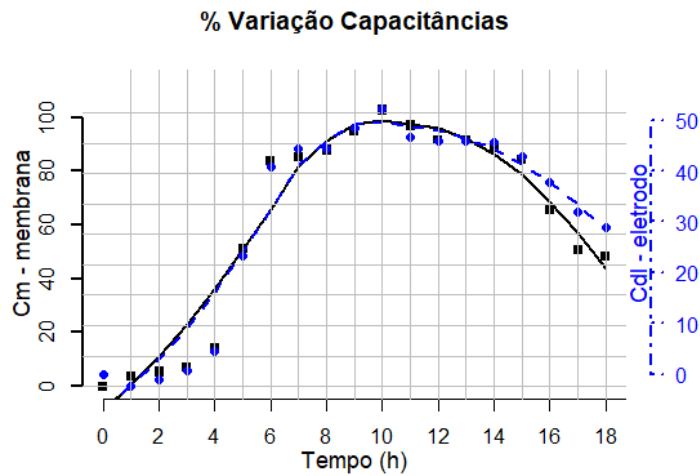


Figura 4.16 – Curvas normalizadas das capacitâncias de membrana e de eletrodo para um experimento típico para **Bti** (experimento 07), onde ■ e *linha contínua* (cor preta) representam a variação da capacitância da membrana celular (C_m) e seu ajuste; e ● e *linha tracejada* (cor azul) representam a de eletrodo (C_{dl}) e seu ajuste.

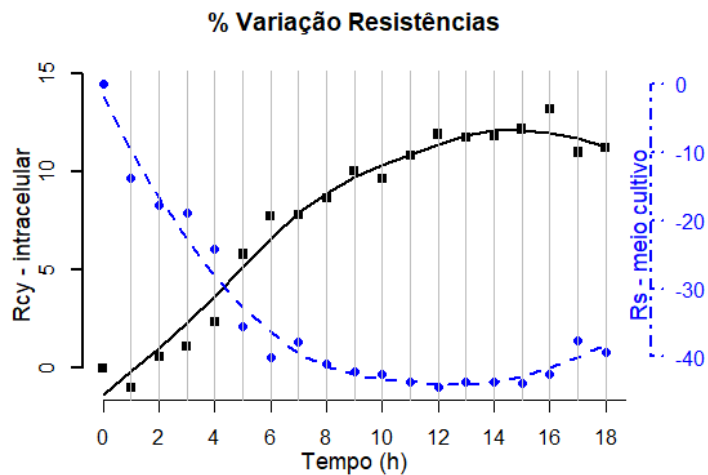


Figura 4.17 – Curvas normalizadas das resistências do meio de cultivo e intracelular para um experimento típico para **Bti** (experimento 07), onde ■ e *linha contínua* (cor preta) representam a variação da resistência intracelular (R_{cy}) e seu ajuste; e ● e *linha tracejada* (cor azul) representam a do meio de cultivo (R_s) e seu ajuste.

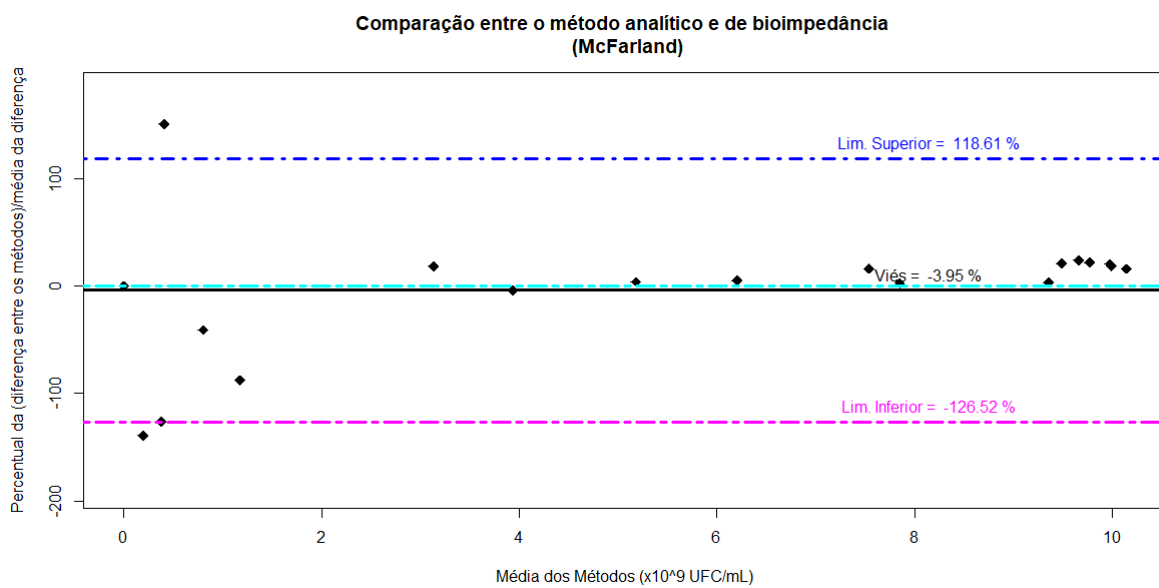
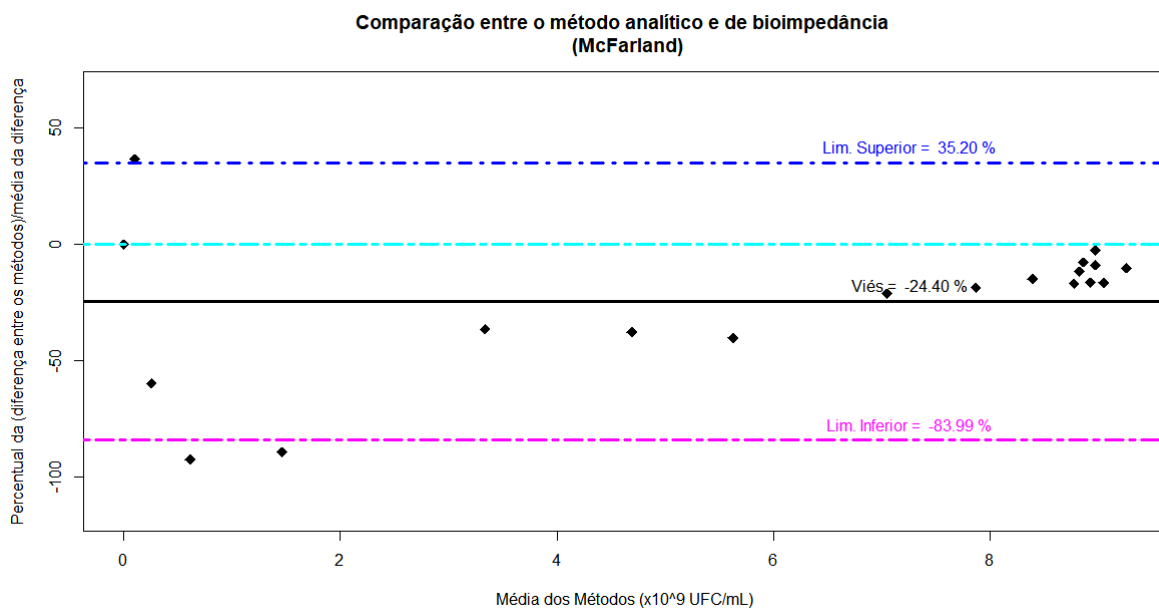
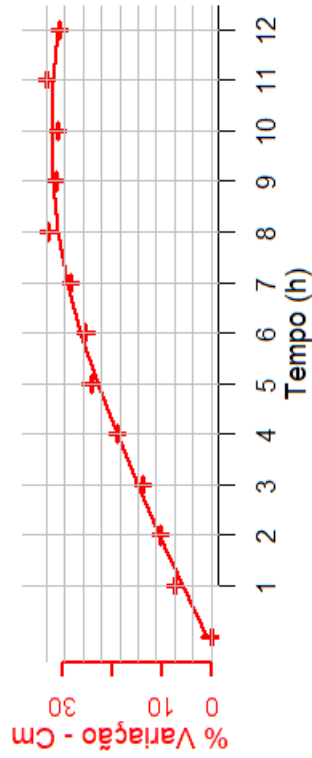
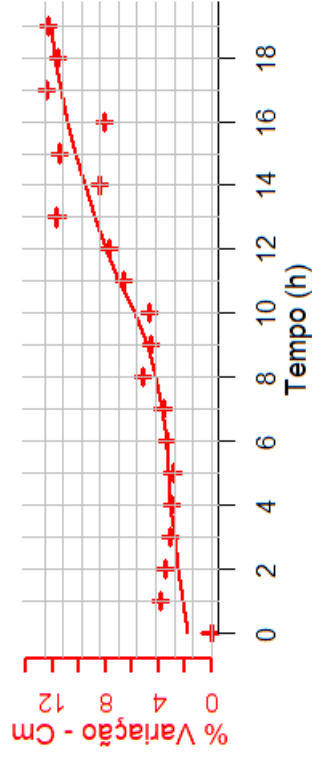


Figura 4.18 – Método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] para os experimentos 01 (a) e 11 (b) com **Bti**, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -24,40% para o experimento 01 e -3,95% para o experimento 11, para ambos experimentos, sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

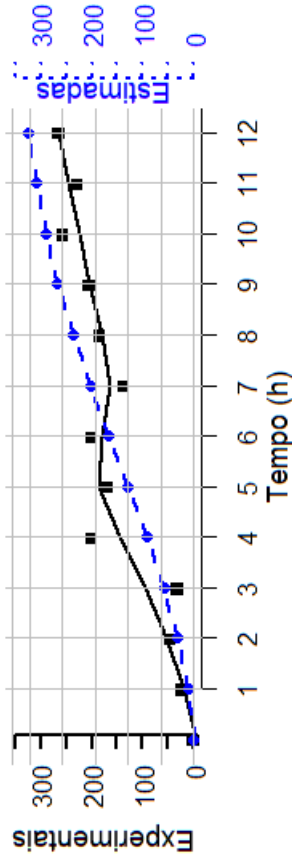
Experimento 02



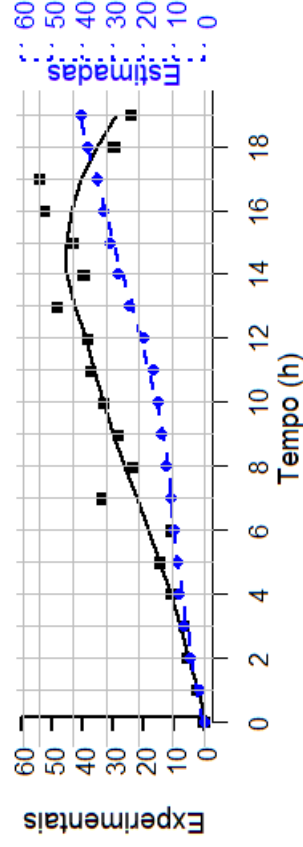
Experimento 08



Células Totais - $\times 10^5$ CFU/mL



Células Totais - $\times 10^5$ CFU/mL



(a)

Figura 4.19 – Séries temporais da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para os experimentos 02 (a) e 08 (b) com *Saccharomyces cerevisiae*, onde o sinal + e linha pontilhada (em vermelho) indicam as variações de C_m e seu ajuste; ■ e linha contínua (em preto) indicam as células totais experimentais e seu ajuste; e sinal ● e linha tracejada (em azul) indicam as células totais estimadas e seu ajuste pelo método proposto (Equação 4.8).

(b)

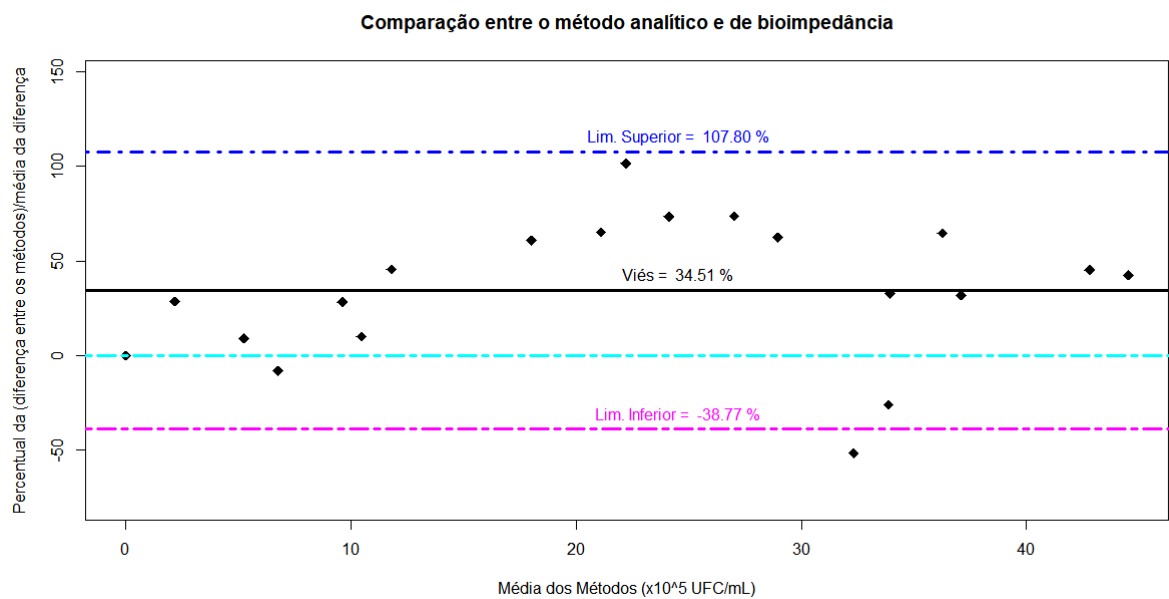
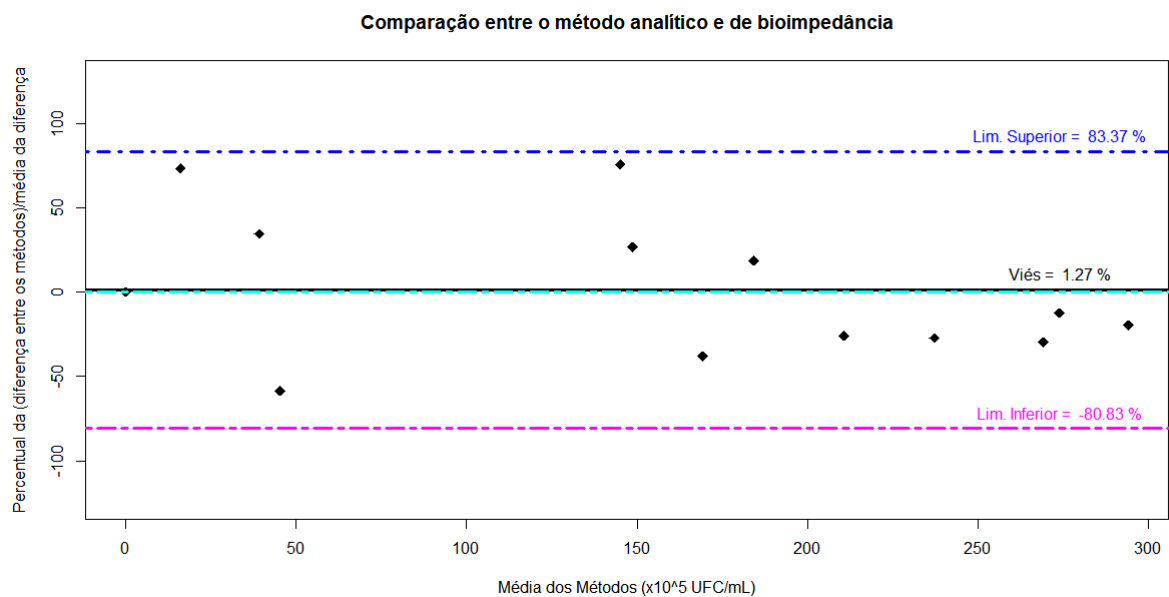


Figura 4.20 – Método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] para os experimentos 2 (a) e 8 (b) com *Saccharomyces cerevisiae*, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 1,27% para o experimento 2 e 34,51% para o experimento 8, para ambos experimentos, sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

Capítulo 5

Discussão

De modo análogo ao Capítulo 4, a discussão referente aos resultados obtidos no trabalho será dividida na etapa inicial do estudo, que avaliou a viabilidade do método BIS-STEP e, na segunda etapa, onde o método foi aprimorado para aplicação da monitorização de microrganismos que apresentam crescimento complexo, como por exemplo o *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (**Bti**). Ao final será também mostrado que o aprimoramento feito na segunda etapa também pode ser aplicado a microrganismo que apresenta crescimento simples, como é o caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, estudada na etapa inicial.

5.1 Etapa 1: Viabilidade do uso da espectroscopia de bio-impedância BIS-STEP

O estudo inicialmente desenvolvido procurou avaliar a viabilidade do uso do método BIS-STEP na monitorização em tempo real de bioprocessos por meio de um experimento de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae* [SALVINO DA SILVA *et al.* (2016)]. Apesar dos valores dos parâmetros de bioimpedância do modelo elétrico estarem sujeitos à escolha do mesmo e também aos procedimentos de ajuste da curva teórica à curva experimental, os resultados relativos aos parâmetros elétricos corroboram as pesquisas que afirmam ser possível monitorar o crescimento de microrganismos (biomassa) por meio de parâmetros elétricos [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); KUANG e NELSON (1998); PETHIG e KELL (1987); PLIQUETT (2010)].

Observou-se que o aumento da capacitância (C_m) acompanha o crescimento celular, corroborando achados anteriores da literatura [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); KUANG e NELSON (1998); PETHIG e KELL (1987); PLIQUETT (2010)]. Tal comportamento pode ser considerado esperado, tendo em vista que os microrganismos em suspensão em um meio de cultivo agem como pequenos capaci-

tores, devido à presença da membrana celular.

A capacitância de eletrodo é derivada da dupla camada de cargas formada pelos íons do meio de cultivo, mas também sofre influência da camada de microrganismos aderidos no eletrodo. O primeiro fator é decorrente do fato do aumento do número de microrganismos e de seu metabolismo modificar a composição iônica do meio de cultivo, que além de afetar a resistência deste meio, afeta também a capacitância de eletrodo [KARGUPTA *et al.* (2017); LIU *et al.* (2015)]. O segundo fator pode ser explicado pelo fato de que havendo o aumento de células no meio de cultivo é esperado um aumento das células aderidas [DABROS *et al.* (2009); KARGUPTA *et al.* (2017); KUANG e NELSON (1998); LIU *et al.* (2015)]

As variações das resistências R_s e R_{cy} (Figura 4.8) observadas no presente estudo apresentaram comportamento da evolução temporal similar ao observado por YANG e BASHIR (2008) e HAUSE *et al.* (1981) e não possuem correlação tão evidente com a quantidade de biomassa. Nestes trabalhos, os autores afirmam que a redução da impedância durante o crescimento da biomassa se deve a quebra de grandes moléculas e a troca de íons que ocorre na membrana celular (permeabilidade seletiva), garantindo a diferença osmótica entre o meio de cultivo (suspensão) e a região intracelular. Fica claro que este processo de troca de íons causa mudanças na composição do meio de cultivo (suspensão) e, conseqüentemente, variações no pH e na condutividade deste. Observa-se que estas variações das resistências (figuras no Item G.1 do Apêndice G) possuem características interessantes. A diminuição da resistência do meio de cultivo (R_s) implica no aumento de íons deste meio, aumentando sua condutividade. Entretanto, a resistência intracelular (R_{cy}) apresenta um comportamento oposto de R_s . Em um dado momento, ela atinge um patamar que pode ser interpretado que a permeabilidade da membrana mantenha a troca de íons constante, em virtude da taxa de crescimento ser nula ($\mu = 0$), ou seja para cada célula gerada outra perde sua viabilidade [HAUSE *et al.* (1981); KUANG e NELSON (1998); YANG e BASHIR (2008)]. A célula que se encontra em processo de morte (denominado apoptose) tem suas proteínas carreadoras de íons desativadas bloqueando a troca de íons com o meio de cultivo [POLLARD *et al.* (2016); RATLEDGE e KRISTIENSEN (2006); SPERELAKIS (2012)].

A tabela da regressão linear multivariada (Tabela 4.3) e a Figura 4.11, apresenta resultados que foram considerados satisfatórios, uma vez que o valor da regressão (r) é maior do que 0,8. Tal valor aponta para uma capacidade de monitoramento do cultivo da levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 4.12 mostra que o método Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] apresentou um viés de 43,86% sobre a média da diferença para a Etapa 01 (regressão linear multivariada). Lembrando que a câmara de Neubauer possui uma variação na contagem de células de $\pm 52\%$ [FREUND e CAROL (1964)]. Observou-se que

para valores de média acima de 100×10^5 UFC/mL ou para concentração de inóculo alta (neste estudo, 0,5 g/L de levedura) indica que houve mais de uma diluição das alíquotas retiradas, o que normalmente aumenta a dispersão. Entretanto, tem-se que 95% dos dados obtidos encontram-se dentro do intervalo de 2 desvios-padrão, somente 1 ponto estava fora deste intervalo.

5.2 Etapa 2: Melhoramento e aplicação do método utilizando a teoria da Demanda de Oxigênio — OUR

5.2.1 A bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* — Bti

Sob a ação de um campo elétrico externo, os microrganismos agem como pequenos capacitores no meio de cultivo, constatando que seu crescimento está relacionado com o aumento da capacitância (ou permissividade) deste meio [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009); KUANG e NELSON (1998); PLIQUETT (2010)], cujo comportamento temporal foi observado e que era assemelhado com o da demanda de oxigênio (OUR) (Figura 4.14) A hipótese levantada de que a concentração celular poderia ser obtida a partir da capacitância de membrana C_m , parâmetro do modelo elétrico, está descrita no Item 4.2.5, uma vez que a concentração celular também pode ser obtida analiticamente da Equação 2.2, através da demanda de oxigênio [PANAROTTO (2014)].

Quando foi observada a necessidade do parâmetro OUR, e uma vez que os experimentos já tinham sido realizados, utilizaram-se os dados experimentais de m_0 e Y_{G0} do estudo de PANAROTTO (2014) por possuir a mesma cepa e meio de cultivo similar ao deste estudo. Apesar de similar, a ausência de alguns sais e proteínas pode acarretar pequenas variações no crescimento de células vegetativas e, bem como, na formação de esporos e cristais.

No gráfico inferior da Figura 4.15, observa-se que há um comportamento temporal similar entre as células totais experimentais (obtidas pelo método de McFarland – Item 4.2.4) com aquelas estimadas por meio da série de valores de C_m (utilizando os parâmetro m_0 e Y_{G0} de PANAROTTO (2014) – Item 4.2.5). A diferença entre elas pode ser atribuída à determinação empírica de a_0 , sendo uma consequência esperada do que foi dito no parágrafo anterior. Estas curvas apresentaram um coeficiente de correlação médio (\bar{r}) de 0,99 (vide Tabela 4.7), tal valor aponta para uma capacidade de monitoramento do cultivo da bactéria **Bti**. PANAROTTO (2014) obteve uma correlação de $r = 0,9947$ comparando a curva de crescimento com a

obtida por gravimetria (método analítico – *offline*) até o início da fase estacionária, enquanto que os experimentos deste estudo foram além desta fase. Apesar de possuir uma correlação análoga à observada no estudo de PANAROTTO (2014), que usou o método *offline*, deve ser ressaltado que o método utilizado no presente estudo para o monitoramento de microrganismos com crescimento complexo é um método em tempo real (*online*), o que lhe confere maior potencial de utilização.

Um fato curioso observado com a bactéria **Bti**, comparando com a *Saccharomyces cerevisiae*, no inóculo de 5% e usando o experimento 10 (figuras no Apêndice I), a resistência intracelular (R_{cy}) apresenta um decaimento, em seguida, volta a aumentar e depois decai novamente. O primeiro decaimento pode ser explicado por uma inibição pelo substrato quando o volume do inóculo é considerado pequeno em relação ao do meio de cultivo e as células buscam manutenção de sua integridade (viabilidade) [PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); POLLARD *et al.* (2016); RATLEDGE e KRISTIANSEN (2006); SPERELAKIS (2012)]. O aumento gradual de R_s inicia na fase exponencial, onde ocorre a multiplicação de células vegetativas, indicando a diminuição gradual do substrato. O segundo decaimento pode significar que as células estão iniciando a esporulação [BORZANI *et al.* (2001); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); POLLARD *et al.* (2016); RATLEDGE e KRISTIANSEN (2006); SANCHES (2006); SPERELAKIS (2012)]. Isto pode ser observado e comparado com a curva de células totais deste experimento, a fase exponencial se inicia por volta das quatro horas e finaliza por volta das quatorze horas, onde se inicia a fase estacionária indicando que uma ou mais fontes nutricionais se esgotaram.

O comportamento de R_s , para o inóculo de 5%, apresenta um valor mínimo é alcançado por volta das doze horas e, em seguida, tende a aumentar, corroborando que o número de íons do meio diminuiu, conseqüentemente há um aumento em sua resistência.

Nos demais inóculos, 10% e 15% (usando por exemplo o comportamento do experimento 11 - figuras no Apêndice I), o comportamento típico é assemelhado ao da levedura, onde se observa um decaimento da resistência do meio de cultivo (aumento de íons) e um aumento da resistência intracelular R_{cy} (permeabilidade da membrana), isto se deve ao fato da quantidade dos inóculos possuírem volumes maiores do que 5% em relação ao meio de cultivo reduzindo a inibição por substrato [BORZANI *et al.* (2001); PEREIRA JÚNIOR *et al.* (2008); POLLARD *et al.* (2016); RATLEDGE e KRISTIANSEN (2006); SANCHES (2006); SPERELAKIS (2012)]. Observando a curva de células totais deste experimento, a fase exponencial se inicia em torno das três horas e finaliza em torno das treze horas. Indicando que a partir deste ponto (fase estacionária), que uma ou mais fontes nutricionais se findaram e onde a resistência do meio R_s atinge o valor mínimo e, em seguida, tende a aumentar.

Da Figura 4.18, o método Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] apresenta

um viés de -24,40% e -3,95% sobre a média da diferença para os experimentos 01 e 11 para **Bti** da Etapa 02, respectivamente. Observou-se que, o método de McFarland (vide a tabela inserida no procedimento de operação do DensiCHEK® – Figura A.4), apresenta uma variação nas leituras de $\pm 12,0\%$ até 0,5 McF, outra de $\pm 7,5\%$ até 2,0 McF e a última de $\pm 7,0\%$ até 3,0 McF. Cabe lembrar que o bioprocesso deste estudo e de PANAROTTO (2014) são similares, onde o processo e a cepa são idênticos, mas os meios de cultivo são diferentes. Os parâmetros utilizados para estimar as células totais, m_0 e Y_{G0} obtidos de PANAROTTO (2014), afetaram o resultado final. Isto pode ser visto através dos vieses obtidos do método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] para o experimento 01. Enquanto que o experimento 11 encontra-se dentro da faixa de variação do método de McFarland.

5.2.2 A levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Para a extrapolação da melhoria do método aos dados da levedura *Saccharomyces cerevisiae* coletados na primeira etapa, aproveitou-se os dados de m_0 e Y_{G0} do estudo de ZABRISKIE e HUMPHREY (1978) para o cálculo de ω_0 e a_0 . Cabe aqui novamente ressaltar que a composição do meio de cultivo, cepas e processos diferentes são fatores que influenciam na produção e produtividade celular, o que pode refletir em consequências na adoção dos parâmetros para os nossos experimentos. Contudo, como já mencionado anteriormente, os experimentos já haviam sido realizados. De modo a minimizar as discrepâncias entre as células totais experimentais e estimadas, optou-se por escolher dois valores empíricos para a_0 , resultando em $a_{01} = 56,41 \times 10^5$ para o inóculo de 0,1 g/L e $a_{05} = 161,10 \times 10^5$ para o inóculo de 0,5 g/L. Mesmo assim, em alguns casos houve diferenças notáveis entre a estimativa de células totais e as estimadas (figuras do Item G.2 do Apêndice G), onde a ordem de grandeza das células estimadas é quase o quádruplo das experimentais. Apesar disso, a correlação média, considerando-se todos os experimentos, foi de 0,91, tal valor indica que o melhoramento do método de monitorização de bioprocessos por bioimpedância desenvolvido e testado para a bactéria **Bti** (crescimento complexo) também pode ser aplicado a microrganismos com crescimento simples, como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 4.20, o método Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] apresenta um viés de 1,27% e 34,51% sobre a média da diferença para os experimentos 2 e 8 para *Saccharomyces cerevisiae* utilizando os dados obtidos da Etapa 01, respectivamente. Entretanto, tem-se que 95% dos dados obtidos pelo método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] encontram-se dentro do intervalo de 2 desvios-padrão, somente para o experimento 8 apresentou 1 ponto fora deste intervalo. Cabe lembrar que o bioprocessos deste estudo é totalmente distinto do utilizado por ZABRISKIE

e HUMPHREY (1978), cujos parâmetros m_0 e Y_{G0} foram utilizados para a estimação de células totais. Mesmo assim, os experimentos 2 e 8 apresentaram resultados inferiores aos reportados por FREUND e CAROL (1964) ($\pm 52\%$).

A técnica de espectroscopia de bioimpedância BIS-STEP apresenta como principal vantagem à aquisição de um número menor de sinais, onde uma única excitação por degrau de tensão com arranjo de eletrodos bipolares, permitindo varrer uma ampla faixa de frequência se comparada à aquisição sistemática dos equipamentos comerciais (espectroscopia capacitiva) que utilizam excitação por varredura senoidal. Além de possuir tempos de aquisição menores que os reportados na literatura [KARGUPTA *et al.* (2018); SARRÓ *et al.* (2012, 2015)].

Capítulo 6

Conclusão

Considera-se que o objetivo proposto para o estudo foi alcançado, ou seja, desenvolveu-se um método de monitorização em tempo real (*online*) para avaliação do número total de células em um bioprocesso (biomassa produzida), utilizando a técnica de espectroscopia de impedância baseada na resposta de corrente a um degrau de tensão (BIS-STEP), com uma correlação acima de $r = 0,9$, para microrganismos tanto com crescimento complexo (bactéria **Bti**) quanto com crescimento simples (levedura *Saccharomyces cerevisiae*). O método apresentou um tempo de aquisição de 2s e de repetição da aquisição de 4s, tendo sido o referido método suficiente para a determinação da concentração celular durante todo o bioprocessamento.

Dos parâmetros elétricos associados ao método de bioimpedância utilizado, a capacitância de membrana (C_m) foi aquela que melhor se correlacionou com o crescimento celular dos dois tipos de microrganismos estudados. A partir de tais parâmetros, o método desenvolvido foi capaz de estimar de forma satisfatória a quantidade de biomassa tanto em microrganismos que possuam comportamento simples de crescimento, como em microrganismos que apresentam um crescimento complexo, exibindo alterações metabólicas, morfológicas e cinéticas significativas, que podem influenciar na determinação da quantidade total de biomassa através da aplicação direta dos métodos dielétricos e outros métodos de bioimpedância, sendo que o tempo requerido para aquisição dos dados de corrente e para repetição são menores que de trabalhos previamente publicados na literatura [KARGUPTA *et al.* (2018); SARRÓ *et al.* (2012, 2015)]. Como os valores de ω_0 e a_0 são dependentes do microrganismo, pode-se dizer que o método necessita de uma certa calibração prévia (determinação de m_0 e Y_{G0}), sem ser *in situ*, para o tipo de microrganismo a ser monitorado. Contudo, não há necessidade de pré-aquecimento do sistema de medição, como em outros casos [DABROS *et al.* (2009); KIM *et al.* (2009)]. Em virtude disso, esta ferramenta pode ser uma boa alternativa em relação aos métodos tradicionais utilizados comercialmente.

A utilização do método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN (1986)] permitiu

a comparação de métodos analíticos (câmara de Neubauer e método de McFarland) com a espectroscopia de bioimpedância (BIS-STEP), onde os vieses podem ser considerados satisfatórios, levando-se em conta os parâmetros m_0 e Y_{G0} utilizados são de outros bioprocessos similares (bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – **Bti** [PANAROTTO (2014)]) e distintos (levedura *Saccharomyces cerevisiae* [ZABRISKIE e HUMPHREY (1978)]) do deste estudo.

A facilidade de aplicação da espectroscopia de bioimpedância baseada na resposta da corrente a excitação por um degrau de tensão (BIS-STEP) na monitorização de bioprocessos torna esta nova técnica preferível na avaliação da biomassa microbiana, pois requer menos tempo para ser aplicado, se comparado aos métodos analíticos, elimina os erros inter e intra-examinador e não necessita de pessoal treinados para sua execução.

Capítulo 7

Proposta de Continuidade

Embora o presente estudo tenha mostrado bons resultados no uso da técnica de bioimpedância para estimar a biomassa microbiana, para o seu aprimoramento e generalização, sugere-se:

7.1 Expansão do Experimento

Haveria necessidade de se realizar mais experimentos em escala laboratorial ou de bancada com microrganismos diferentes dos utilizados neste trabalho, por exemplo fungos, usando, inicialmente, o mesmo modelo elétrico.

Em tais estudos seria importante monitorar variáveis como: percentual de CO_2 , oxigênio dissolvido e porcentagem de saturação de oxigênio, para investigar a produtividade celular, a produção de metabólitos secundários e o consumo de substratos.

7.2 Utilização em biorreator

7.2.1 Construção de um Sistema de Eletrodos para Biorreator

Seria também desejável que os trabalhos futuros se dedicassem a construir eletrodos que pudessem possibilitar a aplicação do presente método a biorreatores. Infelizmente, não foi possível realizar-se esta continuidade do estudo. Nesse sentido, sugere-se um *design* assemelhado ao da Figura 7.1, que ilustra um conjunto de eletrodos de aço inoxidável (diâmetro de 1,54 mm e distanciados de 2 mm) inseridos em uma base de teflon[®] ou material similar, que foram dimensionados para serem utilizados em biorreator TEC-BIO-FLEX[®] (Figura 7.2) da TECNAL. O sensor construído seria utilizado em conjunto com uma futura versão do sistema que incluirá a exibição final da biomassa estimada a partir dos parâmetros de bioimpedância.

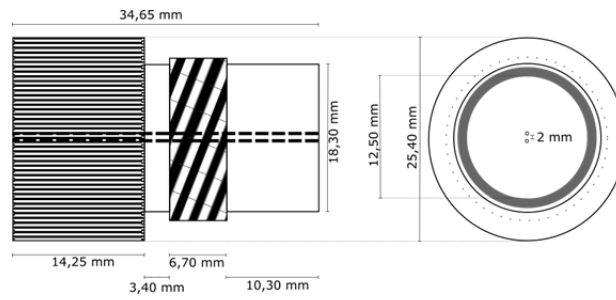


Figura 7.1 – Formato para o suporte dos eletrodos em uma base de Teflon[®].



Figura 7.2 – Biorreator TEC-BIO-FLEX da TECNAL[®].

7.2.2 Aplicação em biorreator

Com os eletrodos adaptados ao biorreator, seria desejável replicar os experimentos de bancada no biorreator, com as concentrações definidas e seguindo o procedimento descrito de maneira otimizada, utilizando concentrações distintas para o microrganismo em questão, sob as seguintes condições de aeração, agitação e pH específicas para ele. O objetivo de tais experimentos seria verificar se o sistema desenvolvido monitora adequadamente bioprocessos realizados em biorreator, onde as condições experimentais são um pouco diferentes daquelas observadas nos experimentos conduzidos no presente estudo.

Referências Bibliográficas

- BARSOUKOV, E., MACDONALD, J. R., 2005, *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*. John Wiley & Sons. Citado 4 vezes, nas páginas 17, 18, 19 e 20.
- BIOMINAS, F., 2007, *Estudo de Empresas de Biotecnologia do Brasil*. Relatório técnico, Fundação Biominas – Brasil, . . . Citado 2 vezes, nas páginas 6 e 7.
- BLAND, J. M., ALTMAN, D., 1986, “Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement”, *The lancet*, v. 327, n. 8476, pp. 307–310. Citado 19 vezes, nas páginas 39, 43, 45, 50, 51, 52, 53, 54, 57, 59, 61, 63, 64, 66, 159, 160, 161, 167 e 168.
- BORZANI, W., SCHMIDELL, W., LIMA, U. D. A., et al., 2001, *Biotecnologia industrial*, v. 1. Edgard Blücher Ltda. Citado 7 vezes, nas páginas 1, 5, 6, 7, 8, 9 e 63.
- BROGER, T., ODERMATT, R. P., HUBER, P., et al., 2011, “Real-time on-line flow cytometry for bioprocess monitoring”, *Journal of Biotechnology*, v. 154, n. 4 (jul.), pp. 240–247. doi: 10.1016/j.jbiotec.2011.05.003. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.05.003>>. Citado na página 2.
- BROWN, C., VEGA-MONTOTO, L., WENTZELL, P., 2005, “Turbidimetry and Nephelometry”. In: *Proceedings of SPIE*, v. 3535, pp. 204–214. Citado na página 47.
- DABROS, M., DENNEWALD, D., CURRIE, D. J., et al., 2009, “Cole–Cole, linear and multivariate modeling of capacitance data for on-line monitoring of biomass”, *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 32, n. 2, pp. 161. Citado 11 vezes, nas páginas 1, 2, 20, 21, 27, 28, 29, 60, 61, 62 e 66.
- DÍAZ, M., HERRERO, M., GARCÍA, L. A., et al., 2010, “Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 48, n. 3 (fev.), pp. 385–407. doi: 10.1016/j.bej.2009.

07.013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bej.2009.07.013>>. Nenhuma citação no texto.

DINORÍN-TÉLLEZ-GIRÓN, J., DELGADO-MACUIL, R. J., CORONA, C. P. L., et al., 2015, “Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time”, *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, n. 13, pp. 5439–5450. Citado 2 vezes, nas páginas 2 e 29.

DOLADER RETAMAL, C., 2012, “Simulation Tool in Mathematica Environment for EBIS measurements modelling”, . Citado na página 24.

EHGARTNER, D., FRICKE, J., SCHRÖDER, A., et al., 2016, “At-line determining spore germination of *Penicillium chrysogenum* bioprocesses in complex media”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 100, n. 20 (ago.), pp. 8923–8930. doi: 10.1007/s00253-016-7787-y. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7787-y>>. Citado na página 2.

FEDERICI, B. A., PARK, H.-W., BIDESHI, D. K., 2010, “Overview of the basic biology of *Bacillus thuringiensis* with emphasis on genetic engineering of bacterial larvicides for mosquito control”, *Open Toxinology Journal*, v. 3, n. 2, pp. 83–100. Citado 3 vezes, nas páginas 13, 45 e 46.

FERREIRA, D., SOUZA, M., 2004, “Bioelectrical impedance spectroscopy for the assessment of body fluid volumes of term neonates”, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 11 (nov.), pp. 1595–1606. doi: 10.1590/s0100-879x2004001100002. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s0100-879x2004001100002>>. Citado na página 24.

FREUND, M., CAROL, B., 1964, “Factors affecting haemocytometer counts of sperm concentration in human semen”, *J. Reprod. Fertil*, pp. 149–155. Citado 2 vezes, nas páginas 61 e 65.

GIANNOUKOS, G., MIN, M., 2015, “Mathematical modelling of the dynamic electrical impedance of a parallel RC circuit using a Wien bridge oscillator”, *Journal of Computational Methods in Sciences and Engineering*, v. 15, n. 2, pp. 287–293. Citado na página 24.

GOMES, T., 2010, *Produção de hidromel: efeito das condições de fermentação*. Tese de Doutorado, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária. Citado na página 9.

- HARRIGAN, W., 2013, *Laboratory Methods in Food Microbiology*. Academic Press. ISBN: 9789351070061. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=MGVNAQAACAAJ>>. Citado na página 47.
- HAUSE, L. L., KOMOROWSKI, R. A., GAYON, F., 1981, “Electrode and Electrolyte Impedance in the Detection of Bacterial Growth”, *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. BME-28, n. 5 (maio), pp. 403–410. doi: 10.1109/tbme.1981.324723. Disponível em: <<https://doi.org/10.1109/tbme.1981.324723>>. Citado na página 61.
- JOTTA, B., COUTINHO, A. B. B., PINO, A. V., et al., 2017, “Lactate threshold by muscle electrical impedance in professional rowers”, *Review of Scientific Instruments*, v. 88, n. 4 (abr.), pp. 045105. doi: 10.1063/1.4979072. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/1.4979072>>. Citado na página 24.
- KAPOULEA, S., ABDELATY, A., ELWAKIL, A., et al., 2019, “Cole-Cole Bio-Impedance Parameters Extraction From a Single Time-Domain Measurement”. In: *2019 8th International Conference on Modern Circuits and Systems Technologies (MOCASST)*, pp. 1–4. IEEE. Citado na página 29.
- KARGUPTA, R., PUTTASWAMY, S., LEE, A. J., et al., 2017, “Rapid culture-based detection of living mycobacteria using microchannel electrical impedance spectroscopy (m-EIS)”, *Biological Research*, v. 50, n. 1 (jun.). doi: 10.1186/s40659-017-0126-7. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s40659-017-0126-7>>. Citado 2 vezes, nas páginas 30 e 61.
- KARGUPTA, R., YANG, Y., PUTTASWAMY, S., et al., 2018, “Detection by death: A rapid way to detect viable slow-growing microorganisms achieved using microchannel Electrical Impedance Spectroscopy (m-EIS)”, *TECHNOLOGY*, v. 06, n. 01 (mar.), pp. 24–35. doi: 10.1142/s2339547818500012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1142/s2339547818500012>>. Citado 5 vezes, nas páginas 3, 30, 31, 65 e 66.
- KATOH, S., HORIUCHI, J.-I., YOSHIDA, F., 2015, *Biochemical engineering: a textbook for engineers, chemists and biologists*. John Wiley & Sons. Citado na página 33.
- KIM, Y.-H., PARK, J.-S., JUNG, H.-I., 2009, “An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growth in a microbial fermentor”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 138, n. 1, pp. 270–277. Citado 8 vezes, nas páginas 1, 2, 22, 27, 28, 60, 62 e 66.

- KLÖSGEN, B., RÜMENAPP, C., GLEICH, B., 2011, “Bioimpedance spectroscopy”. In: *Betasys*, Springer, pp. 241–271. Citado na página 3.
- KUANG, W., NELSON, S., 1998, “Low-frequency dielectric properties of biological tissues: a review with some new insights”, *Transactions of the ASAE-American Society of Agricultural Engineers*, v. 41, n. 1, pp. 173–184. Citado 10 vezes, nas páginas 16, 17, 18, 19, 20, 21, 29, 60, 61 e 62.
- Leber, A. L. (Ed.), 2016, *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Fourth Edition*. American Society of Microbiology. doi: 10.1128/9781555818814. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/9781555818814>>. Citado na página 47.
- LEI, K. F., 2014, “Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment”, *Micromachines*, v. 5, n. 1, pp. 1–12. Citado na página 1.
- LIU, J.-T., SETTU, K., TSAI, J.-Z., et al., 2015, “Impedance sensor for rapid enumeration of E. coli in milk samples”, *Electrochimica Acta*, v. 182, pp. 89–95. Citado 2 vezes, nas páginas 29 e 61.
- MANSOR, M. A., AHMAD, M. R., 2015, “Single cell electrical characterization techniques”, *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 6, pp. 12686–12712. Citado na página 30.
- MARTINEZ TERUEL, J., GARCÍA SÁNCHEZ, T., FONTOVA, A., et al., 2013, “Electrical Impedance Spectroscopy cell monitoring in a miniaturized bioreactor”. In: *19th IMEKO TC 4 Symposium Measurements of Electrical Quantities, 17th TC 4 Workshop IWADC on ADC and DAC Modeling and Testing*, pp. 446–450. Citado 2 vezes, nas páginas 2 e 29.
- MARTINSEN, O. G., GRIMNES, S., 2008a, “Bioimpedance and Bioelectricity Basics”. 2 ed., cap. 3, pp. 57–92, , Academic press, a. Dielectrics. Citado 4 vezes, nas páginas 2, 15, 27 e 28.
- MARTINSEN, O. G., GRIMNES, S., 2008b, “Bioimpedance and Bioelectricity Basics”. 2 ed., cap. 4, pp. 93–137, , Academic press, b. Passive Tissue Electrical Properties. Citado 3 vezes, nas páginas 15, 16 e 38.
- MARTINSEN, O. G., GRIMNES, S., 2008c, “Bioimpedance and Bioelectricity Basics”. 2 ed., cap. 7, pp. 205–281, , Academic press, c. Instrumentation and Measurement. Citado 3 vezes, nas páginas 16, 22 e 38.

- MOORE, E., RAWLEY, O., WOOD, T., et al., 2009, “Monitoring of cell growth in vitro using biochips packaged with indium tin oxide sensors”, *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 139, n. 1, pp. 187–193. Citado na página 24.
- NEVES, C., SOUZA, M., 2000, “A method for bio-electrical impedance analysis based on a step-voltage response”, *Physiological Measurement*, v. 21, n. 3, pp. 395. Citado 3 vezes, nas páginas 3, 22 e 24.
- NEVES, E. B., PINO, A. V., DE ALMEIDA, R. M. V. R., et al., 2009, “Knee bioelectric impedance assessment in healthy/with osteoarthritis subjects”, *Physiological Measurement*, v. 31, n. 2 (dez.), pp. 207–219. doi: 10.1088/0967-3334/31/2/007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1088/0967-3334/31/2/007>>. Citado na página 24.
- NOLL, T., BISELLI, M., 1998, “Dielectric spectroscopy in the cultivation of suspended and immobilized hybridoma cells”, *Journal of biotechnology*, v. 63, n. 3, pp. 187–198. Citado 2 vezes, nas páginas 27 e 28.
- OLIVEIRA, C. G. R. D., 2006, *Desenvolvimento de bioprocesso para a produção de biomassa de levedura (Saccharomyces cerevisiae) rica em organoselênio*. Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, . . Citado 2 vezes, nas páginas 35 e 52.
- PANAROTTO, C., 2014, “Influência de parâmetros operacionais, fontes protéicas e substratos energéticos sobre o cultivo de *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*”, . Citado 11 vezes, nas páginas xxi, 13, 14, 48, 49, 50, 51, 62, 63, 64 e 67.
- PEREIRA JÚNIOR, N., BON, E. P. D. S., FERRARA, M. A., 2008, *Tecnologia de Bioprocessos – Séries em Biotecnologia*, v. 1. Escola de Química – UFRJ. Citado 7 vezes, nas páginas 1, 7, 8, 9, 10, 33 e 63.
- PETHIG, R., KELL, D. B., 1987, “The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology”, *Physics in Medicine & Biology*, v. 32, n. 8, pp. 933. Citado 4 vezes, nas páginas 17, 19, 20 e 60.
- PETHIG, R. R., SMITH, S., 2012, *Introductory Bioelectronics: For Engineers and Physical Scientists*. John Wiley & Sons. Citado na página 33.
- Pfaller, M. A., Richter, S. S., Funke, G., et al. (Eds.), 2015, *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition*. American Society of Microbiology. doi: 10.1128/9781555817381. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/9781555817381>>. Citado na página 47.

- PLIQUETT, U., 2010, “Bioimpedance: a review for food processing”, *Food Engineering Reviews*, v. 2, n. 2, pp. 74–94. Citado 3 vezes, nas páginas 24, 60 e 62.
- POLLARD, T. D., EARNSHAW, W. C., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J., et al., 2016, *Cell Biology E-Book*. Elsevier Health Sciences. Citado 2 vezes, nas páginas 61 e 63.
- RATLEDGE, C., KRISTIANSEN, B., 2006, *Basic biotechnology*. Cambridge University Press. Citado 2 vezes, nas páginas 61 e 63.
- RIVERA, D., MARGARITIS, A., DE LASA, H., 1999, “A sporulation kinetic model for batch growth of *Bacillus thuringiensis*”, *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, v. 77, n. 5, pp. 903–910. Citado 3 vezes, nas páginas 13, 45 e 46.
- ROCHA, O., 2009, *Desenvolvimento de ferramentas computacionais para a otimização de processos de fermentação em Biotecnologia*. Tese de Doutorado. Citado 2 vezes, nas páginas 9 e 10.
- SALVINO DA SILVA, M. A., SANCHES, E. G., PINO, A. V., et al., 2016, “Monitoramento em Tempo Real de Bioprocessos Baseado em Espectroscopia de Bioimpedância”, *XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica – CBEB*, v. , n. , pp. . Citado na página 60.
- SALVINO DA SILVA, M. A., SANCHES, E. G., PINO, A. V., et al., 2018, “Real-Time Monitoring of Yeasts Growth Based on Bioimpedance Spectroscopy”. In: *IFMBE Proceedings*, Springer Singapore, pp. 525–529, maio. doi: 10.1007/978-981-10-9035-6_97. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-9035-6_97>. Citado na página 41.
- SANCHES, E. G., 2006, *Desenvolvimento e Produção de Bioinseticidas Bacterianos: Dengue e Malária*. Tese de Doutorado, INCQS – FIOCRUZ, . . Citado 6 vezes, nas páginas 5, 6, 7, 8, 9 e 63.
- SARRAFZADEH, M., BELLOY, L., ESTEBAN, G., et al., 2005, “Dielectric monitoring of growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis*”, *Biotechnology Letters*, v. 27, n. 7, pp. 511–517. Citado 5 vezes, nas páginas 12, 13, 14, 48 e 51.
- SARRÓ, E., LECINA, M., FONTOVA, A., et al., 2012, “Electrical impedance spectroscopy measurements using a four-electrode configuration improve on-line monitoring of cell concentration in adherent animal cell cultures”,

- Biosensors and Bioelectronics*, v. 31, n. 1, pp. 257–263. Citado 5 vezes, nas páginas 3, 30, 31, 65 e 66.
- SARRÓ, E., LECINA, M., FONTOVA, A., et al., 2015, “Real-time and on-line monitoring of morphological cell parameters using electrical impedance spectroscopy measurements”, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Citado 6 vezes, nas páginas 2, 3, 30, 31, 65 e 66.
- SCHOLZ, J., GROSS, S., 2014, “Process Analytical Technology: Real time biomass monitoring moves to single-use”, *European Pharmaceutical Review*, v. 19 (01), pp. 24–25. Citado 2 vezes, nas páginas 22 e 23.
- SPERELAKIS, N., 2012, *Cell physiology source book: essentials of membrane biophysics*. Elsevier. Citado 2 vezes, nas páginas 61 e 63.
- STRAGIER, P., LOSICK, R., 1996, “Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*”, *Annual review of genetics*, v. 30, n. 1, pp. 297–341. Citado na página 13.
- WALSH, R., MARTIN, P., 1977, “Growth of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces uvarum* in a temperature gradient incubator”, *Journal of the Institute of Brewing*, v. 83, n. 3, pp. 169–172. Citado na página 12.
- YANG, L., BASHIR, R., 2008, “Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria”, *Biotechnology advances*, v. 26, n. 2, pp. 135–150. Citado 2 vezes, nas páginas 2 e 61.
- ZABRISKIE, D. W., HUMPHREY, A. E., 1978, “Real-time estimation of aerobic batch fermentation biomass concentration by component balancing”, *AIChE Journal*, v. 24, n. 1, pp. 138–146. Citado 6 vezes, nas páginas 14, 48, 50, 52, 64 e 67.

Página intencionalmente em Branco

Apêndice A

Artigo em Congresso Nacional

Título: Monitoramento em Tempo Real de Bioprocessos Baseado em Espectroscopia de Bioimpedância

**XXV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica —
CBEB 2016**

Foz do Iguaçu – Paraná – Brasil

Resumo:

Um bioprocesso industrial ocorre normalmente em um biorreator, onde as várias fases de crescimento dos microrganismos devem ser monitoradas para maximização do processo. Os métodos analíticos *offline* são considerados padrão-ouro para tal monitoração; porém, demandam normalmente longos períodos de tempo para serem realizados, podendo limitar o rendimento de todo o processo por retardar tomadas de decisões. Conseqüentemente há demanda para o desenvolvimento de métodos de monitoramento em tempo real. Este estudo propõe um método *on-line* de avaliação da biomassa total e do percentual de microrganismos vivos por meio de espectroscopia de bioimpedância. Os resultados obtidos durante a monitorização de um processo de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* mostraram correlações de $r = 0,9234$ e de $r = 0,8122$ com um método padrão-ouro, indicando que a técnica proposta pode ser usada para a monitorização de bioprocessos.

Palavras-chave: bioprocesso, espectroscopia de bioimpedância, monitorização.

Download: <https://drive.google.com/drive/folders/0B543adcG1FC1Q21ZaFhCUmdwMlk>

MONITORAMENTO EM TEMPO REAL DE BIOPROCESSOS BASEADO EM ESPECTROSCOPIA DE BIOIMPEDÂNCIA

M. A. Salvino da Silva^{1,2}, E. G. Sanches¹, A. V. Pino² e M. N. Souza^{2,3}

¹ Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ/Farmanguinhos, CEP 22775-903, Rio de Janeiro, Brasil

² Programa de Engenharia Biomédica – COPPE/UF RJ, PO Box 68510, CEP 21945-970, Rio de Janeiro, Brasil

³ Departamento de Engenharia Eletrônica e de Computação – EE/UF RJ, CEP 21945-970, Rio de Janeiro, Brasil

e-mail: marcosilva@far.fiocruz.br; marcosalvino@peb.ufrj.br

Resumo: Um bioprocessamento industrial ocorre normalmente em um biorreator, onde as várias fases de crescimento dos microrganismos devem ser monitoradas para maximização do processo. Os métodos analíticos *off-line* são considerados padrão-ouro para tal monitoração; porém, demandam normalmente longos períodos de tempo para serem realizados, podendo limitar o rendimento de todo o processo por retardar tomadas de decisões. Consequentemente há demanda para o desenvolvimento de métodos de monitoramento em tempo real. Este estudo propõe um método *on-line* de avaliação da biomassa total e do percentual de microrganismos vivos por meio de espectroscopia de bioimpedância. Os resultados obtidos durante a monitorização de um processo de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* mostraram correlações de $r = 0,9234$ e de $r = 0,8122$ com um método padrão-ouro, indicando que a técnica proposta pode ser usada para a monitorização de bioprocessos.

Palavras-chave: bioprocessamento, espectroscopia de bioimpedância, monitorização.

Abstract: An industrial bioprocess usually occurs in a bioreactor, where the various stages of the microorganism growth must be monitored to maximize the process. Off-line analytical methods are considered the gold standard for such monitoring; but require usually much laboratory work and extended periods of time to be performed, which may limit the performance of the whole process by postpone the decision making. Consequently, there is a demand for the development of real time (on-line) monitoring methods. This study proposes an on-line method for the monitoring of total biomass and percentage of viable cells that is based on a step-voltage current response. The results obtained during the monitoring of a process of growth of *Saccharomyces cerevisiae* showed the correlations of $r = 0.9234$ and $r = 0.8122$ with a gold standard, indicating that the proposed technique can be used for monitoring bioprocess.

Keywords: bioprocess, bioimpedance spectroscopy, monitoring

Introdução

Em um bioprocessamento industrial as transformações desejadas e devidamente controladas dos produtos se desenvolvem em biorreatores [1] [5]. Nesta escala, faz-se necessário a utilização de sistemas ou equipamentos que monitorem, preferencialmente em tempo real (*on-line*), as transformações que ocorrem no interior do reator, pois certas decisões devem ser tomadas o mais breve possível [1] para maximização da produção, uma vez que esta depende das condições em cada fase do seu crescimento (latência, exponencial, estacionária) [1].

Apesar de ser desejável o uso de monitoramento *on-line*, muitos bioprocessos ainda são acompanhados por métodos analíticos *off-line*, por serem estes considerados padrão ouro. Exemplos de tais métodos são: a contagem do número total de células por câmara de Neubauer; o crescimento celular através da viabilidade celular (diluições seriadas com plaqueamento); a quantificação de componentes celulares; a coloração de células vivas/mortas; a análise dos metabólitos sintetizados; a determinação da massa de material celular; o espectrofotômetro, entre outros. Adicionalmente, estes métodos analíticos demandam, normalmente, muito trabalho laboratorial e longos períodos de tempo para serem realizados, podendo limitar o rendimento de todo o processo por retardar a tomada de decisões [1] [2] [3] [4].

Apesar da existência de métodos utilizados para a medição da concentração de biomassa em tempo real, tais como, a densidade ótica ou turbidimetria [2] [3] que fornece uma medição proporcional à biomassa total; muitos destes não são capazes de distinguir os microrganismos vivos dos demais materiais (inclusive microrganismos mortos).

As técnicas elétricas também têm sido usadas na tentativa de monitorização em tempo real de bioprocessos. A espectroscopia de capacitância ou dielétrica [2] é uma delas e baseia-se no princípio que somente os microrganismos vivos em suspensão num meio de cultivo (reacional) agem como um capacitor sob influência de um campo elétrico e armazenam carga elétrica. Assim, a capacitância total de uma suspensão é diretamente proporcional ao volume total de

microrganismos vivos afetados pelo campo elétrico usado para realizar a medição.

A literatura também tem mostrado que técnicas de espectroscopia que avaliam as variações no domínio da frequência das partes real [9] [10] e imaginária [7] [8] [9] [10] da bioimpedância, têm sido investigadas para a monitorização de bioprocessos. Apesar disso, não foram encontrados trabalhos de monitoração *on-line* que objetivassem distinguir o percentual de microrganismos vivos, além do resultado total da biomassa.

Este trabalho propõe um método de monitoramento em tempo real de biomassa por espectroscopia de bioimpedância baseada na resposta de corrente ao degrau de tensão [11], buscando-se também fornecer o percentual de microrganismos vivos na quantidade de biomassa indicada.

Materiais e Métodos

Para a avaliação do método proposto foi realizado um experimento de crescimento de levedura em três Erlenmeyer, sendo um adaptado com eletrodos para medida de bioimpedância e dois para retirada de alíquotas e análise pelos métodos tradicionais *off-line* (Figura 1). A impedância elétrica foi obtida com um hardware especialmente desenvolvido para este fim.

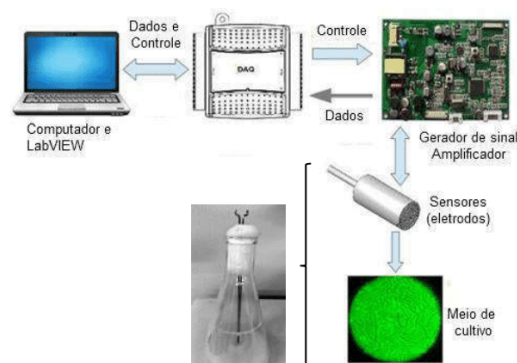


Figura 1 – Diagrama esquemático do sistema de medição.

Levedura – O microrganismo utilizado neste estudo foi uma cepa de levedura, espécie *Saccharomyces cerevisiae*, encontrado na forma de fermento instantâneo seco produzido pela AB Brasil Ind. e Com. Ltda., sob a marca Fleischmann, embalagem de 10 g, lote n.º 242. A concentração inicial do inóculo foi de 0,5 g/L.

Meio de Cultivo (Reacional) – Para a condução do experimento, utilizou-se o meio de cultura adaptado contendo: Glicose (VETEC – lote:1008597 – Brasil) 10 g/L; Sulfato de amônia (J.T.Baker – lote: KO8C47 – México) 2 g/L; fosfato monopotássico (Sigma-Aldrich – lote: SLBL0719V – México) 1,5 g/L; Sulfato de magnésio heptahidratado (J.T.Baker – lote: K15597 – México) 1 g/L e Extrato de levedura (B.D. – lote: 4339796 – EUA) 1 g/L.

Condições de Cultivo – Preparou-se três frascos Erlenmeyer de 500 mL com 200 mL do meio de cultura, esterilizados em autoclave em 121°C por 20 min. À temperatura ambiente, os frascos foram inoculados com a levedura, sendo que de dois retiravam-se alíquotas de 2 mL alternadamente, retiradas a cada hora, e o terceiro ficou conectado ao hardware de medição de bioimpedância e colocados em um agitador com 200 rpm @ 30°C.

Sistema de Espectroscopia de Bioimpedância – Utilizou-se um protótipo montado especificamente para esta aplicação e que emprega a técnica bipolar de espectroscopia de bioimpedância baseada na resposta de corrente à aplicação de um degrau de tensão de aproximadamente 500 mV [11], doravante denominada BIS-STEP. O *hardware* do protótipo foi controlado por um programa desenvolvido em LabVIEW® 8.2. Os sinais da resposta de corrente foram adquiridos com resolução de 14 bits a uma taxa de 100 kS/s, por uma placa de aquisição de dados (*National Instruments*, EUA – modelo USB 6351), cada sinal amostrado é uma média de 20 leituras.

Os eletrodos utilizados para a realização da medida de bioimpedância foram de aço inoxidável com 1,54 mm de diâmetro e espaçados de 2 mm fixados no Erlenmeyer por meio de uma rolnha de espuma isolante (Figura 2).



Figura 2 – Eletrodos fixados no frasco.

Circuito elétrico equivalente – O circuito elétrico equivalente utilizado para se analisar a resposta de corrente ao degrau de tensão observada durante o experimento é apresentado na Figura 3, sendo assemelhado a trabalhos anteriores que utilizam a mesma técnica de bioimpedância [12].

Podem ser demonstrado que para o circuito da Figura 3 a resposta de corrente $I(s)$ no domínio de Laplace é expressa pela seguinte equação (1):

$$I(s) = I_p \cdot \frac{(s+A)}{s^2+Bs+C} \quad (1)$$

onde:

$$I_p = v_d \cdot \left(\frac{R_s + R_{cy}}{R_s \cdot R_{cy}} \right) \quad (2)$$

$$A = \frac{1}{(R_s + R_{cy}) \cdot C_m} \quad (3)$$

$$B = \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy} \right) \cdot \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}} \quad (4)$$

$$C = \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m} \quad (5)$$

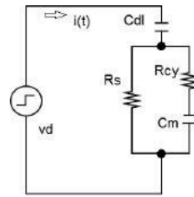


Figura 3 – Modelo elétrico equivalente do microrganismo em um meio de cultivo (suspensão). v_d é a magnitude do degrau de tensão, $i(t)$ é a corrente no domínio do tempo, C_{dl} é a capacitância total dos eletrodos, R_s é a resistência do meio de cultivo (suspensão), R_{cy} é a resistência intracelular e C_m é a capacitância da membrana celular.

A transformada inversa de Laplace da equação (1) fornece a resposta de corrente no domínio do tempo, $i(t)$.

$$i(t) = I_p \cdot (K_1 \cdot e^{s_1 \cdot t} + K_2 \cdot e^{s_2 \cdot t}) \quad (6)$$

cujos parâmetros K_1 , s_1 , K_2 e s_2 são obtidos a partir dos parâmetros elétricos (C_{dl} , R_s , R_{cy} e C_m).

Uma rotina de otimização foi implementada em MATLAB® de modo obter os valores dos parâmetros elétricos que minimizassem o erro médio quadrático entre cada medida experimental da resposta de corrente (Figura 4) e a expectativa teórica descrita pela equação (6). Os parâmetros elétricos iniciais do experimento conduzido foram estimados como: $C_{dl} = 10,40 \mu\text{F}$; $R_s = 84,75 \Omega$; $R_{cy} = 59,31 \Omega$ e $C_m = 2,42 \mu\text{F}$.

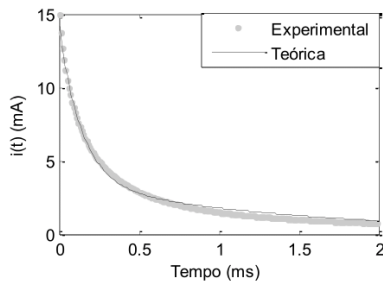


Figura 4 – Curva experimental típica da resposta de corrente para uma excitação de degrau de tensão e ajuste da equação teórica.

Amostragem da curva de crescimento – O experimento da curva de crescimento foi monitorizado a cada hora por métodos *off-line* (considerados padrão ouro) e pelo método *on-line* de bioimpedância proposto. A medição da concentração total de biomassa foi realizada por absorbância, através de um espectrofotômetro. A contagem de células foi realizada por câmara de Neubauer, utilizando azul de metileno para diferenciar os microrganismos vivos e mortos. Foi feita análise de correlação entre os métodos analíticos e os de bioimpedância tanto para biomassa total quanto para o percentual de microrganismos vivos.

Resultados

A Figura 5 ilustra a curva de crescimento do microrganismo medida pelos métodos considerados padrão ouro, mostrando a concentração total de microrganismos e a concentração de vivos e mortos.

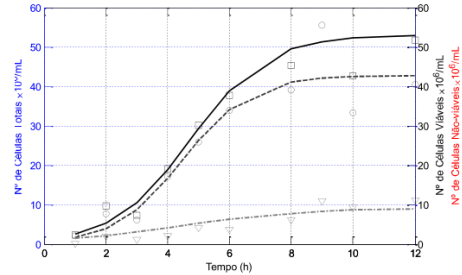


Figura 5 – Resultados da contagem dos microrganismos, onde \square - células totais; \circ - células viáveis e ∇ - células mortas.

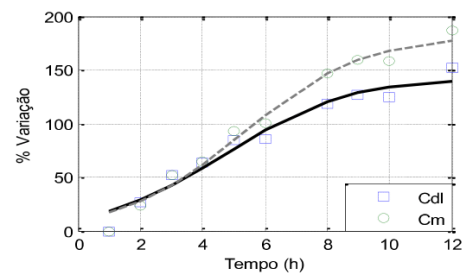


Figura 6 – Variação das capacitâncias do modelo elétrico, C_{dl} – capacitância total de eletrodos e C_m – capacitância da membrana celular.

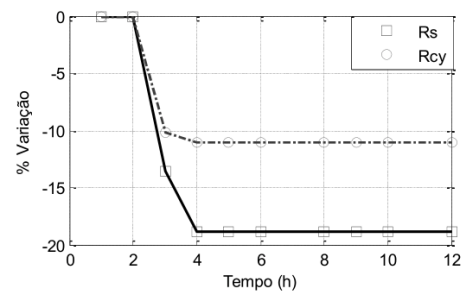


Figura 7 – Variação das resistências do modelo elétrico, R_s – resistência extracelular e R_{cy} – resistência intracelular.

A Figura 6 mostra o comportamento temporal da variação percentual das capacitâncias do modelo elétrico em relação às capacitâncias iniciais. A variação percentual das resistências do modelo elétrico é mostrada na Figura 7.

A razão da concentração de microrganismos viáveis pela concentração total deles é mostrada no gráfico superior da Figura 8, assim como a razão entre as resistências do modelo elétrico (R_{cy}/R_s), no gráfico inferior.

As correlações entre a curva de crescimento da biomassa total e da variação da capacitância de eletrodo é de $r = 0,9234$ e entre as razões de células viáveis/totais e das resistências R_{cy}/R_s é de $r = 0,8122$.

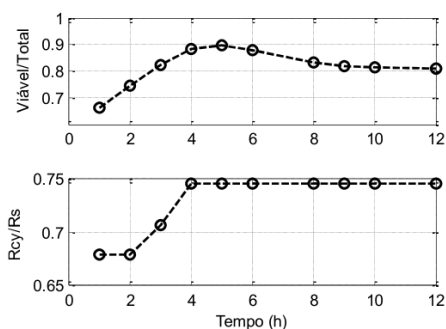


Figura 8 – Comparação entre razões: viável/total e R_{cy}/R_s , R_s – resistência extracelular e R_{cy} – resistência intracelular.

Discussão

Os resultados indicam que as variações de capacitâncias do modelo elétrico (Figura 6) parecem apresentar um comportamento temporal semelhante ao da evolução da quantidade de microrganismos vivos (Figura 5). Tal comportamento é razoável uma vez que células em suspensão num meio condutivo agem como capacitores devido à membrana celular lipídica [2][3]. Assim, cada célula ou microrganismo se comporta como um pequeno capacitor, fazendo com que a capacitância total do sistema seja proporcional à concentração de microrganismos (crescimento celular) [2][3].

As variações das resistências (Figura 7), entretanto, apresentaram comportamento temporal similar ao observado por Yang & Bashir [13] e Hause, Komorowski & Gayon [14] e não apresentam correlação com o crescimento celular. Porém observou-se que a evolução temporal da razão entre as resistências do modelo elétrico (intracelular e extracelular) parece se relacionar com a evolução temporal da razão entre a quantidade de microrganismos vivos e totais (Figura 8), indicando ser possível se obter uma informação a respeito do percentual de microrganismos viáveis.

Embora não se tenha tentado ainda realizar qualquer forma de regressão matemática para se obter os valores da biomassa total ou percentual de microrganismos viáveis, os resultados das correlações sugerem que tal procedimento parece possível.

Conclusão

O trabalho mostrou que modelos mais complexos de bioimpedância (comparando com os modelos utilizados atualmente) apresentam elementos correlacionados não apenas com o total de células num bioprocessamento, mas também com a sua quantidade de células viáveis. Mesmo assim ainda não é possível estimar estas contagens

celulares a partir dos parâmetros de bioimpedância o que requer mais experimentos com diferentes processos.

Agradecimentos

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro; e ao Laboratório de Desenvolvimento de Bioprocessamento (LADEBIO) da Escola de Química da UFRJ pelo suporte na realização dos ensaios analíticos.

Referências

- [1] Borzani, W. et al. *Biotecnologia industrial: fundamentos*. São Paulo: Edgard Blücher, v. 1, p. 254, 2001.
- [2] Dabros, M. et al. Cole-Cole, linear and multivariate modeling of capacitance data for on-line monitoring of biomass. *Bioprocess and biosystems engineering*, v. 32, n. 2, p. 161-173, 2009.
- [3] Kim, Y. H.; Park, J. S.; Jung, H.I. An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growth in a microbial fermentor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 138, n. 1, p. 270-277, 2009.
- [4] Lei, K. F. Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment. *Micromachines*, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2014.
- [5] Pereira Jr, Nei; Bon, EP da S.; Ferrara, M. A. *Tecnologia de bioprocessos. Séries em Biotecnologia*. Nei Pereira Jr., Elba Pinto da Silva Bon, Maria Antonieta Ferrara.–Rio de Janeiro: Escola de Química/UFRJ, 2008.
- [6] Mansor, M. A.; Ahmad, M. R. Single Cell Electrical Characterization Techniques. *International journal of molecular sciences*, v. 16, n. 6, p. 12686-12712, 2015.
- [7] Sarró, E. et al. Real-time and on-line monitoring of morphological cell parameters using electrical impedance spectroscopy measurements. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2015.
- [8] Martínez-Teruel, J. et al. Electrical Impedance Spectroscopy cell monitoring in a miniaturized bioreactor. In: 19th IMEKO TC 4 Symposium Measurements of Electrical Quantities, 17th TC 4 Workshop IWADC on ADC and DAC Modeling and Testing. 2013. p. 446-450.
- [9] Dinorin-Téllez-Girón, J. et al. Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric spectroscopy in real time. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, n. 13, p. 5439-5450, 2015.
- [10] Ruiz, G. A.; Zamora, M. L.; Felice, C. J. Isoconductivity method to study adhesion of yeast cells attached to gold electrodes. *Journal of Electrical Bioimpedance*, v. 5, n. 1, p. 40-47, 2014.
- [11] Neves, C. E. B., Souza, M. N.; A method for bio electrical impedance analysis based on a step-voltage response. *Physiol. Meas.* 21 395, 2000 – <http://iopscience.iop.org/0967-3334/21/3/305>.
- [12] Pliquet, U. Bioimpedance: a review for food processing. *Food engineering reviews*, v. 2, n. 2, p. 74-94, 2010.
- [13] Yang, L.; Bashir, R.; Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria. *Biotechnology Advances.*; 2008 vol: 26 pp: 135-150.
- [14] Hause, L.; Komorowski, R.; Gayon, F.; Electrode and electrolyte impedance in the detection of bacterial growth.; *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*; 1981.

Página intencionalmente em Branco

Apêndice B

Artigo em Congresso Internacional

Title: Real-Time Monitoring of Yeasts Growth Based on Bioimpedance Spectroscopy

**World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2018 — IUPESM 2018
Prague – Czech Republic**

Abstract:

Industrial bioprocesses usually occur in bioreactors, where the stages of a microorganism growth must be monitored to optimize the whole process. *Offline* analytical methods are considered gold standard for such monitoring, but they are time consuming and may postpone important decisions making. Thus, there is always demand for the development of real time (*online*) monitoring methods for bioprocesses. Despite the existence of some real time methods used to measure the concentration of biomass in real time, such as optical density or turbidimetry, many of them are not able to distinguish living microorganisms from other materials, including dead microorganisms. This work proposes an *online* method for monitoring of total biomass, as well as the amount of viable cells, using a bioimpedance spectroscopy based on the current response to a step voltage excitation. To evaluate the proposed method, we performed an experiment of growth with yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* species with initial inoculum of 0.1g/L and 0.5g/L. The total amount of microorganism (using Neubauer chamber), the number of viable ones (using dyeing with methylene blue), and bioimpedance data were collected every hour during a period of 12h. For each initial inoculum, series of data were collected. The results indicate the proposed technique presents good prediction of the total amount of microorganism ($r = 0.918$) and of the number of viable ones ($r = 0.858$).

Keywords: bioprocess, bioimpedance spectroscopy, monitoring yeast growth.



Real-Time Monitoring of Yeasts Growth Based on Bioimpedance Spectroscopy

Marcos Antonio Salvino da Silva, Elizabeth Gomes Sanches, Alexandre Visintainer Pino, and Marcio Nogueira de Souza

Abstract

Industrial bioprocesses usually occur in bioreactors, where the stages of a microorganism growth must be monitored to optimize the whole process. *Off-line* analytical methods are considered gold standard for such monitoring, but they are time consuming and may postpone important decisions making. Thus, there is always demand for the development of real time (*on-line*) monitoring methods for bioprocesses. Despite the existence of some real time methods used to measure the concentration of biomass in real time, such as optical density or turbidimetry, many of them are not able to distinguish living microorganisms from other materials, including dead microorganisms. This work proposes an *on-line* method for monitoring of total biomass, as well as the amount of viable cells, using a bioimpedance spectroscopy based on the current response to a step voltage excitation. To evaluate the proposed method, we performed an experiment of growth with yeast strain *Saccharomyces cerevisiae* species with initial inoculum of 0.1 and 0.5 g/L. The total amount of microorganism (using Neubauer chamber), the number of viable ones (using dyeing with methylene blue), and bioimpedance data were collected every hour during a period of 12 h. For each initial inoculum, series of data were collected. The results indicate the proposed technique presents good prediction of the total amount of microorganism ($r = 0.918$) and of the number of viable ones ($r = 0.858$).

M. A. Salvino da Silva (✉) · E. G. Sanches
Oswaldo Cruz Foundation – FIOCRUZ/Farmanguinhos,
22775-903 Rio de Janeiro, Brazil
e-mail: marcosalvino@peb.ufrj.br
URL: <http://www.peb.ufrj.br>

M. A. Salvino da Silva · A. V. Pino · M. N. de Souza
Biomedical Engineering Program – COPPE/UFRJ, PO Box 68510
21945-970 Rio de Janeiro, Brazil

M. N. de Souza
Electronics and Computer Engineering Department – EE/UFRJ,
21945-970 Rio de Janeiro, Brazil

© Springer Nature Singapore Pte Ltd. 2019
L. Lhotska et al. (eds.), *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering 2018*,
IFMBE Proceedings 68/1, https://doi.org/10.1007/978-981-10-9035-6_97

Keywords

Bioprocess · Bioimpedance spectroscopy · Monitoring yeast growth

1 Introduction

Industrial bioprocess are normally developed in bioreactors and must be monitored, preferably in real time (*on-line*). Despite of this, many are still accompanied by *off-line* analytical methods, because they are considered gold standard. Examples of such methods are: counting the total number of cells by Neubauer chamber; the staining of live/dead cells; the spectrophotometry, among others. More over, these analytical methods usually require a lot of laboratory work and are time consuming [1–3].

Electrical techniques, bioimpedance spectroscopy among them, have been proposed to monitor some bioprocesses in real time have also been used in an attempt to monitor bioprocesses in real time [4–7]. Despite this, no *on-line* monitoring work was that aimed to distinguish the percentage of live microorganisms, besides the total result of the biomass, performing the total measurement time in less than 100 s. Thus, this work proposes an alternative monitoring of biomass by bioimpedance spectroscopy based on the current response to the voltage step [8], hereinafter referred to as *BIS-STEP*, which also to provide the percentage of live microorganisms in the indicated amount of biomass.

2 Materials and Methods

For the evaluation of the proposed method, a yeast growth experiments were carried out in three Erlenmeyers, one of which was adapted with electrodes for bioimpedance measurement and two for aliquot removal and to be analyzed by traditional *off-line* methods (Fig. 1a).

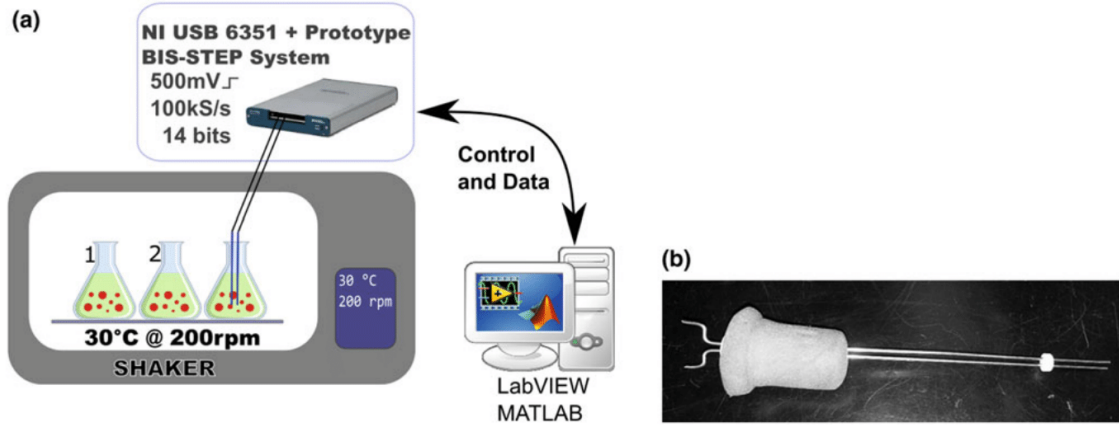


Fig. 1 a Set-up of the experiment. b Electrodes with spacers and insulating foam stopper

2.1 Yeast and Culture Media

The microorganism used in this study was a yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae* species, found in the form of instant dry yeast (Fleischmann, AB Brasil Ind. e Com. Ltda). Two initial inoculum concentrations were used in the experiments, 0.1 and 0.5 g/L. The adapted culture medium containing: Anhydrous glucose ($C_6H_{12}O_6$) – 10 g/L; Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) – 1.5 g/L; Ammonium sulfate ($(NH_4)_2SO_4$) – 2.0 g/L; Magnesium sulfate heptahydrated ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) – 1.0 g/L and Yeast extract – 1.0 g/L.

Culture Conditions: Three 250 mL culture medium were prepared within 500 mL Erlenmeyer flasks, autoclaved at 121 °C for 20 min. At room temperature the flasks were inoculated with the yeast concentration of 0.1 g/L or 0.5 g/L. From the two Erlenmeyer analyzed by traditional *off-line* methods, two aliquots of 2 mL were alternately withdrawn every hour. The third Erlenmeyer was connected to the bioimpedance measurement hardware and placed on a shaker at 200 rpm @ 30 °C (Fig. 1a).

2.2 Bioimpedance Spectroscopy System

A hardware prototype implementing the bipolar bioimpedance spectroscopy based on the current response to a voltage step [8] was specifically designed for this application (Fig. 2a), which was controlled by a program developed in LabVIEW (National Instruments, USA). The current response signals were acquired at 14-bit resolution at a rate of 100 kS/s by a data acquisition board (National Instruments, USA–USB model 6351). Each final current signal

was coherent average of 20 readings, requiring a total time of 20 s.

The electrodes (stainless steel with 1.54 mm diameter, spaced 2 mm each other) used to perform the bioimpedance measurement were fixed in the Erlenmeyer by means of an insulating foam stopper (Fig. 1b).

Analysis of the current response to the voltage step excitation: Experimental conditions (illustrated in Fig. 2a) was modeled by the equivalent electrical circuit presented in Fig. 2c, in what concerns the analysis of the current signal (Fig. 2b) observed during the experiments. Such equivalent circuit has been used elsewhere [9]. In such circuit C_m indicates the capacitance of associated to the cellular membrane; C_{dl} states the electrodes capacitance; R_{cy} represents the resistance modeling the intracellular medium; and R_s the resistance associated to the extracellular or culture solution medium. It can be demonstrated that for the circuit of Fig. 1 the current response $I(s)$ in the Laplace domain is expressed by Eq. (1):

$$I(s) = I_p \frac{s + A}{(s^2 + Bs + C)} = I_p \left\{ \frac{K_1}{(s - s_1)} + \frac{K_2}{(s - s_2)} \right\} \quad (1)$$

where:

$$I_p = v_d \left(\frac{R_s + R_{cy}}{R_s \cdot R_{cy}} \right); \quad A = \frac{1}{(R_s + R_{cy}) C_m} \quad (2)$$

$$B = \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy} \right) \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}}; \quad (3)$$

$$C = \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m}$$

The inverse Laplace transform of Eq. (1) gives the current response in the time domain $i(t)$.

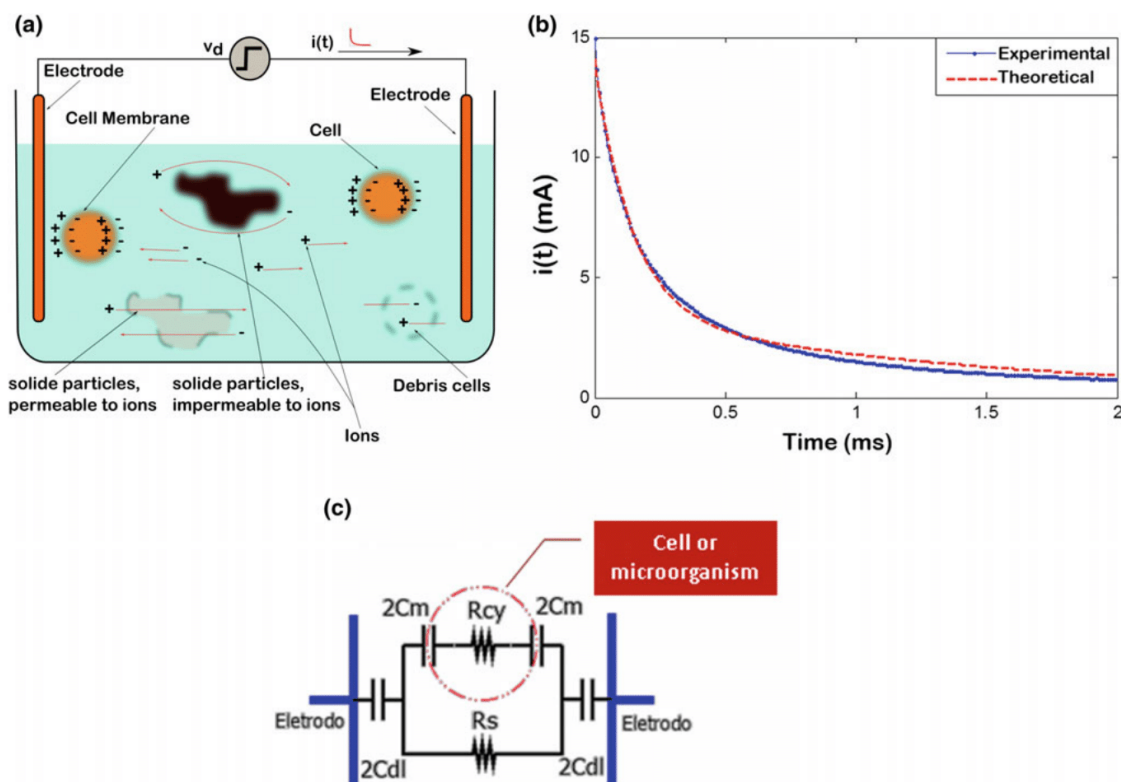


Fig. 2 BIS-STEP: **a** Culture medium (suspension) of the microorganism. **b** Typical experimental curve of the current response for a voltage step excitation and adjustment of the theoretical equation. **c** Its equivalent electrical model, where V_d is the magnitude of the voltage

step, $i(t)$ is the current in the time domain, C_{dl} is the total capacitance of the electrodes, R_s is the resistance of the culture medium (suspension), R_{cy} is the intracellular resistance and C_m is cell membrane capacitance

$$i(t) = I_p(K_1 \cdot e^{s_1 t} + K_2 \cdot e^{s_2 t}) \quad (4)$$

whose parameters K_1 , s_1 , K_2 and s_2 are obtained from the electrical parameters (C_{dl} , R_s , R_{cy} and C_m).

An optimization routine was implemented in MATLAB to obtain the values of electrical parameters that minimized the mean square error between each experimental measure (Fig. 2b) and the theoretical (Eq. 4) expectation of the current response.

Multivariate Linear Regression Model: The estimated electrical parameters (C_{dl} , R_s , R_{cy} and C_m) were used to derive a multivariate linear regression model to estimate the number of the total and viable cells. All regressions were made by *R Software* (*R Foundation for Statistical Computing*), using data associated to the inoculum of 0.1 and 0.5 g/L.

Growth Yeast Monitoring: For each inoculum (0.1 g/L or 0.5 g/L) the yeast growth experiment was monitored each hour during a 12 h period by two *off-line* methods, considered gold standard (Neubauer chamber to count the total

cells and dyeing with methylene blue to differentiate living and dead microorganisms) and by the proposed *on-line* bioimpedance method. Two experiments (duplicate) were performed using the inoculum of 0.1 g/L and three experiments (triplicate) using 0.5 g/L.

3 Results and Conclusions

The Fig. 3 shows the results of the multivariate linear regression for the number of total cells and for the viable cells, ($r = 0.918$ and $r = 0.858$, respectively). Graphical representations of experimental and estimated number of total cells, as well as of the viable cells, can be seen in the Fig. 4, where the thin red line represents the identity function and the thick black line represents the regression.

A time of approximately 40 s was elapsed from the beginning of the data acquisition, estimating the electrical parameters, and deriving the number of total cells and of the viable ones.

(a)

```
Call:
lm(formula = CelulasTotais ~ delta_cm + delta_cd1 + delta_rcy +
delta_rs)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-8487092 -1750924 -148196  1490238 10743667

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  919055     757690   1.213   0.229
delta_cm    1089499     99815   10.915 < 2e-16 ***
delta_cd1   -1208346    104291 -11.586 < 2e-16 ***
delta_rcy    888462     92907   9.563 1.65e-14 ***
delta_rs    -512740     67409  -7.606 7.71e-11 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 3476000 on 73 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.8422, Adjusted R-squared:  0.8336
F-statistic: 97.43 on 4 and 73 DF, p-value: < 2.2e-16
```

(b)

```
Call:
lm(formula = Celulasviaveis ~ delta_cm + delta_cd1 + delta_rcy +
delta_rs)

Residuals:
    Min       1Q   Median       3Q      Max
-6063310 -1257440 -156543  926812 11985851

Coefficients:
            Estimate Std. Error t value Pr(>|t|)
(Intercept)  1318048     655122   2.012   0.0479 *
delta_cm    670174     86304   7.765 3.88e-11 ***
delta_cd1   -769861     90173  -8.538 1.37e-12 ***
delta_rcy    492001     80331   6.125 4.17e-08 ***
delta_rs    -370340     58284  -6.354 1.60e-08 ***
---
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 3006000 on 73 degrees of freedom
Multiple R-squared:  0.7367, Adjusted R-squared:  0.7223
F-statistic: 51.07 on 4 and 73 DF, p-value: < 2.2e-16
```

Fig. 3 Results from multivariate linear regression. **a** Total cells. **b** Viable cells

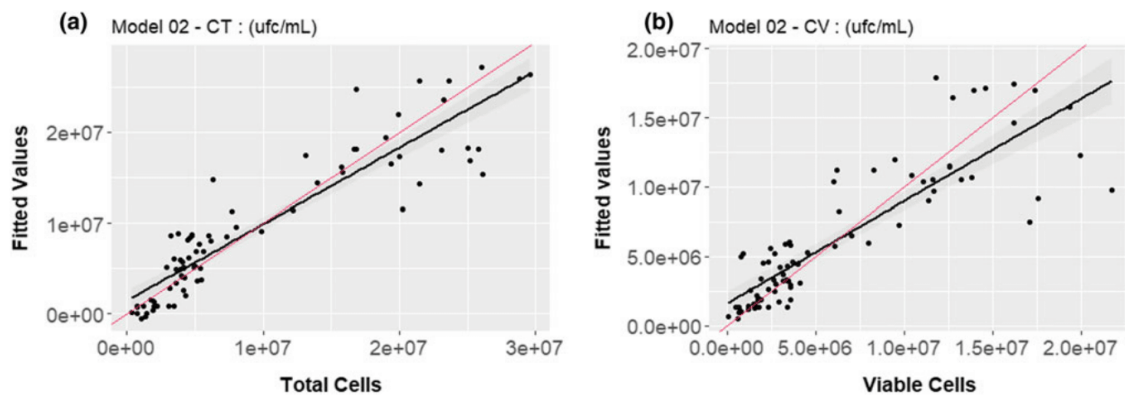


Fig. 4 Graphical representation of the multivariate linear regression. **a** Total cells. **b** Viable cells

In conclusion, despite the present work has shown good results in using bioimpedance technique to estimate the total number of microorganisms and the number of viable ones in a yeast growth experiment, more studies with different microorganisms are necessary to state the method can be applied for monitoring of industrial bioprocesses.

Acknowledgements To the Brazilian governmental agencies CNPq, CAPES and FINEP, for financial support. To the Laboratory of Bioprocess Development (LADEBIO) of School of Chemistry of UFRJ for the support in the accomplishment of the analytical tests.

Conflict of Interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Dabros, M., Dennewald, D., Currie, D. J., Lee, M. H., Todd, Marison, I. W., von Stockar, U.: Cole-Cole, linear and multivariate

modeling of capacitance data for on-line monitoring of biomass. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, Vol. 32, p. 161, Springer (2009)

- Kim, Y. Hu., Park, J. S., Jung, H. I.: An impedimetric biosensor for real-time monitoring of bacterial growth in a microbial fermentor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 138, pp. 270–277, Elsevier (2009)
- Lei, K. F.: Review on impedance detection of cellular responses in micro/nano environment. *Micromachines*, Vol. 5, pp. 1–12, Multidisciplinary Digital Publishing Institute (2014)
- Sarró, E., Lecina, M., Fontova, A., Gódi, F., Bragós, R., Cairó, J. J.: Real-time and on-line monitoring of morphological cell parameters using electrical impedance spectroscopy measurements. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Wiley Online Library (2015)
- Martínez-Teruel, J., García Sánchez, T., Fontova, A., Bragós, R.: Electrical Impedance Spectroscopy cell monitoring in a miniaturized bioreactor. 19th IMEKO TC 4 Symposium Measurements of Electrical Quantities, 17th TC 4 Workshop IWADC on ADC and DAC Modeling and Testing, pp. 446–450, 2013
- Dinorín-Télez-Girón, J., Delgado-Macuil, R. J., Corona, C. P. L., Montes, F. J. M., de la Torre Martínínez, M., López-Y-López, V. E.: Reactance and resistance: main properties to follow the cell differentiation process in *Bacillus thuringiensis* by dielectric

- spectroscopy in real time. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 99, pp. 5439–5450, Springer (2015)
7. Ruiz, G. A., Zamora, M. L., Felice, C. J.: Isoconductivity method to study adhesion of yeast cells to gold electrode. *Journal of Electrical Bioimpedance*, Vol. 5, pp. 40–47, 2014
 8. Neves, C. E. B., Souza, M. N.: A method for bio-electrical impedance analysis based on a step-voltage response. *Physiological Measurement*, Vol. 21, p. 395, IOP Publishing (2000)
 9. Pliquett, U.: Bioimpedance: a review for food processing. *Food Engineering Reviews*, Vol. 2, pp. 74–94, Springer (2010)

Apêndice C

Rotina desenvolvida para adquirir os sinais de corrente elétrica

Um protótipo baseado na técnica bipolar de espectroscopia de bioimpedância baseada na resposta de corrente à aplicação de um degrau de tensão de 500 mV (BIS-STEP). Este protótipo é controlado por um programa, escrito em LabVIEW[®], cujos sinais de resposta de corrente foram adquiridos com uma resolução de 14 bits a uma taxa de 100 kS/s por uma placa de aquisição de dados (modelo USB-6351 da National Instruments[®]), onde cada sinal adquirido é uma média de 20 leituras com intervalo de 10 ms, sob a forma de exponencial dupla (Apêndice D — Equação D.24), bem como o fluxograma do programa na Figura C.3.

O protótipo inicial conseguia ler apenas um canal utilizado para *Saccharomyces cerevisiae* (Figura C.1), onde se lê uma concentração de inóculo por vez. Já na introdução de experimentos com a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – Bti, adaptou-se um conjunto de relés que permite uma leitura sequencial de, no máximo, 03 (três) concentrações de pré-inóculo (5%, 10% e 15%). Manteve-se este único canal de modo a evitar distorções significativas entre os canais da placa de aquisição, qualquer desvio ou distorção é oriundo da placa de relés e da fiação (Figura C.2).

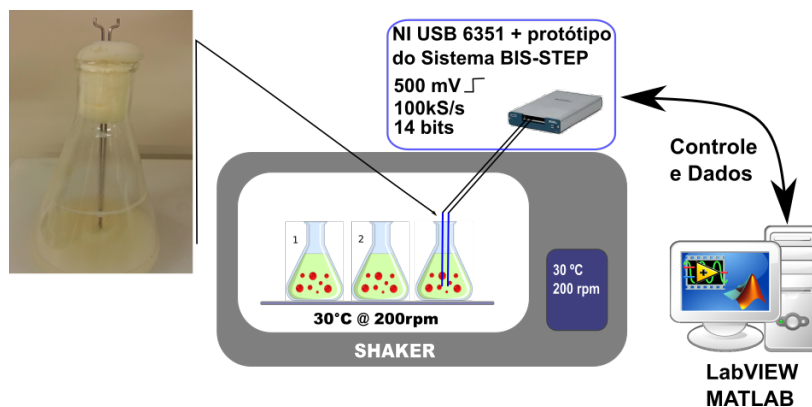


Figura C.1 – Protótipo inicial para *Saccharomyces cerevisiae*.

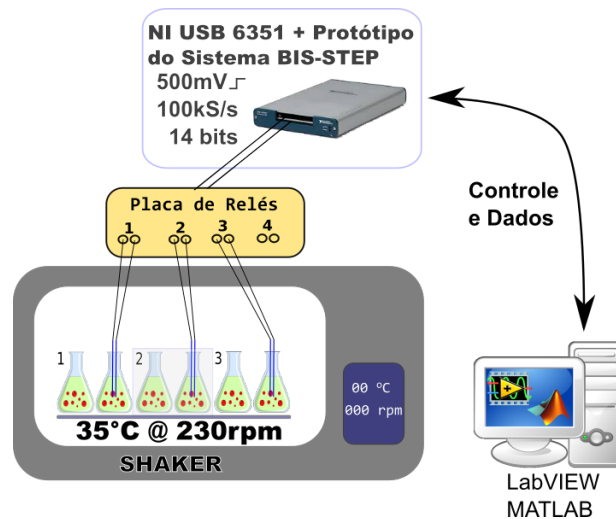


Figura C.2 – Protótipo final para os microorganismos deste estudo.

Na Figura C.4 mostra a interface de usuário, onde se encontra uma área que configura a aquisição dos dados como: frequência de amostragem, intervalo entre aquisições, número de aquisições e a quantidade de dados amostrados por canal (ou eletrodo). Em outra área, tem-se a identificação da placa de aquisição, a partir daí configura-se a porta de corrente, a porta de tensão, o terminal DAQmx e as linhas DAQmx. A quantidade de eletrodos pode ser configurada, sendo limitada a 3 (três). É possível configurar a sequência de eletrodos para aquisição dos dados, tomando-se por referência a sequência de pré-inóculos de 5%, 10% e 15% do **Bti** (vide fluxograma da Figura C.3), respectivamente, tem-se as seguintes sequências:

- 1 — 2 — 3;
- 2 — 3 — 1; e
- 3 — 1 — 2.

De modo a facilitar o entendimento, os dados de corrente adquiridos para **Bti** foram salvos da seguinte forma:

PxxELyEXPaaaammdd_HHhMMminSSs

onde:

xx concentração do pré-inóculo conectado ao eletrodo;

y identificação do eletrodo;

aaaa ano;

mm mês;

dd dia;

HH horas;

MM minutos; e

SS segundos.

Exemplificando: P05EL1_Exp20181219, P10EL2_Exp20181219, P15EL3_Exp20181219, P05EL2_Exp20190111, P10EL3_Exp20190111 e P15EL1_Exp20190111.

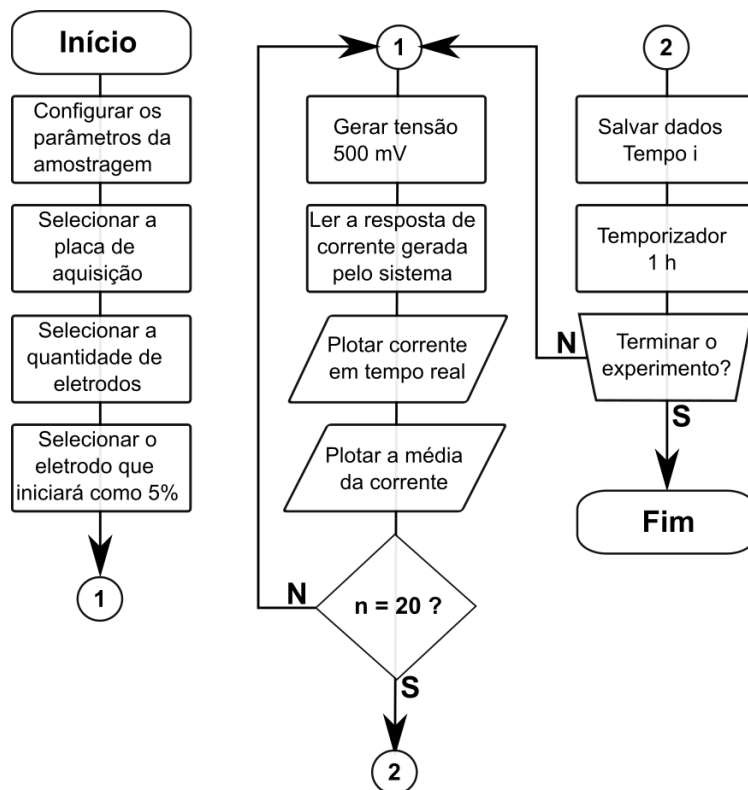


Figura C.3 – Fluxograma do programa LabVIEW®.

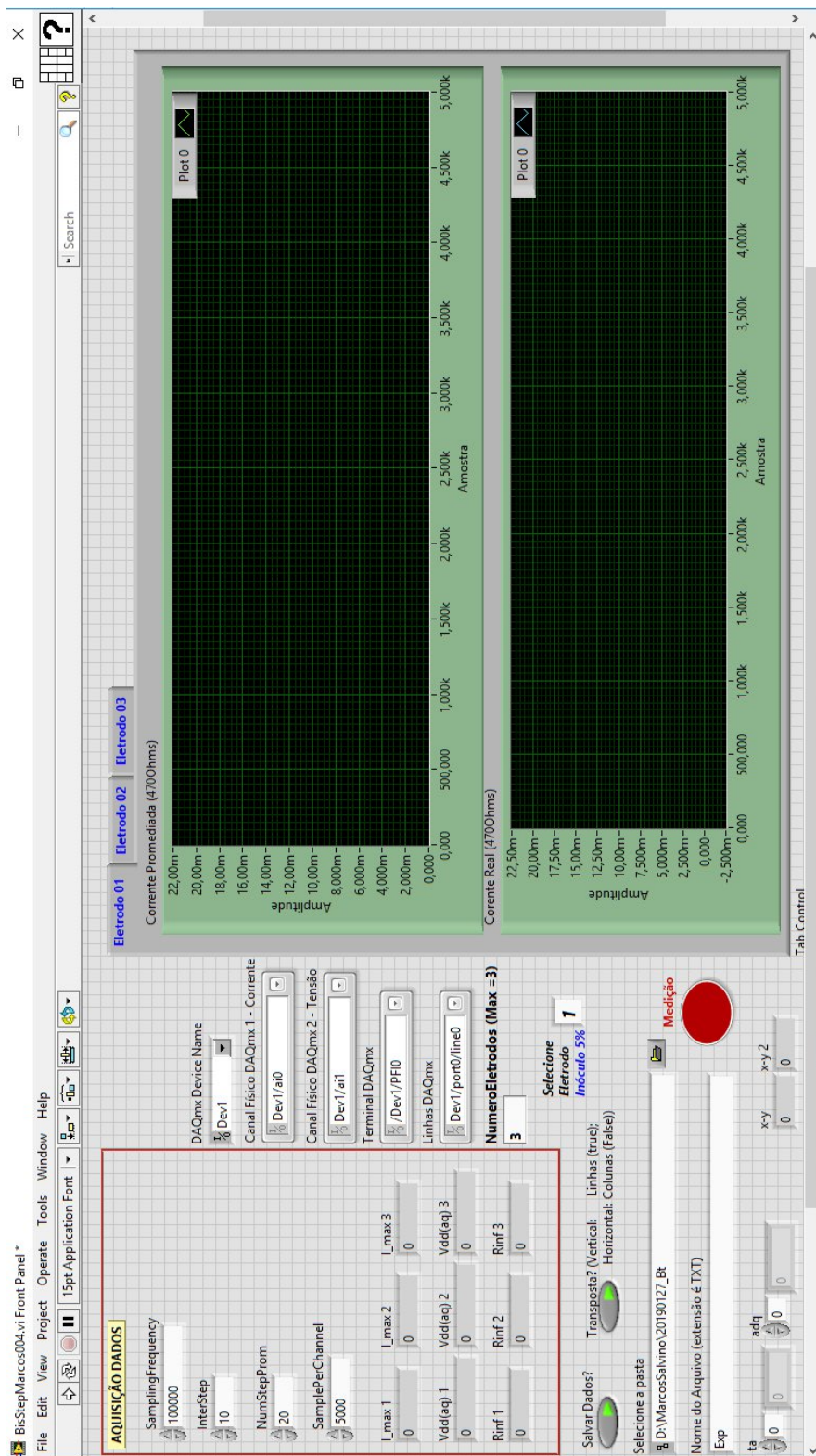


Figura C.4 – Tela do programa de aquisição de dados com LabVIEW®.

Apêndice D

Cálculo da Corrente do Modelo Elétrico Equivalente da Célula

Do modelo apresentado na Figura D.1, a corrente que circula é expressa pela razão da tensão pela impedância total Z_1 , descrita pela Equação D.1 no domínio da frequência.

$$I(s) = \frac{v_d}{Z_1(s)} \quad (D.1)$$

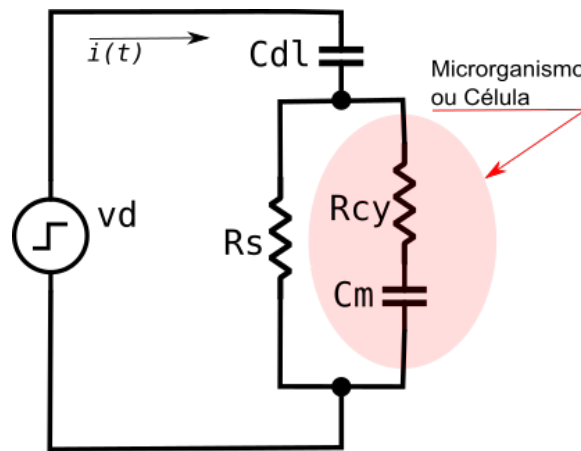


Figura D.1 – Modelo elétrico equivalente simplificado da célula em uma suspensão.

Inicialmente, calcula-se a impedância série Z_3 composta por R_{cy} e C_m , logo:

$$Z_3 = R_{cy} + \frac{1}{s \cdot C_m} = \frac{R_{cy} \cdot s \cdot C_m + 1}{s \cdot C_m} \quad (D.2)$$

$$Z_3 = R_{cy} \cdot \frac{1 + s \cdot \tau_3}{s \cdot \tau_3}; \quad \tau_3 = R_{cy} \cdot C_m \quad (D.3)$$

Tem-se que Z_3 , da Equação D.3, em paralelo com R_s , calcula-se esta impedância paralela Z_2 , logo:

$$Z_2(s) = \frac{R_s \cdot Z_3(s)}{R_s + Z_3(s)} = \frac{R_s \cdot R_{cy} \frac{1+s \cdot \tau_3}{s \cdot \tau_3}}{R_s + R_{cy} \frac{1+s \cdot \tau_3}{s \cdot \tau_3}} = \frac{R_s \cdot R_{cy} \frac{1+s \cdot \tau_3}{s \cdot \tau_3}}{\frac{R_s \cdot s \cdot \tau_3 + R_{cy}(1+s \cdot \tau_3)}{s \cdot \tau_3}} \quad (D.4)$$

$$Z_2(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot (1 + s \cdot \tau_3)}{R_s \cdot s \cdot \tau_3 + R_{cy}(1 + s \cdot \tau_3)} = \frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot \tau_3 \left(\frac{1}{\tau_3} + s \right)}{(R_s + R_{cy}) \cdot \tau_3 \cdot \left(s + \frac{R_{cy}}{(R_s + R_{cy})\tau_3} \right)} \quad (D.5)$$

$$Z_2(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \left(\frac{1}{\tau_3} + s \right)}{(R_s + R_{cy}) \cdot \left(s + \frac{R_{cy}}{(R_s + R_{cy})\tau_3} \right)} = \frac{R_s \cdot R_{cy} \left(\frac{1}{R_{cy} \cdot C_m} + s \right)}{(R_s + R_{cy}) \cdot \left(s + \frac{R_{cy}}{(R_s + R_{cy}) \cdot R_{cy} \cdot C_m} \right)} \quad (D.6)$$

$$Z_2(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \left(\frac{1}{R_{cy} \cdot C_m} + s \right)}{(R_s + R_{cy}) \cdot \left(s + \frac{1}{(R_s + R_{cy}) \cdot C_m} \right)} \quad (D.7)$$

$$Z_2(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \left(s + \frac{1}{R_{cy} \cdot C_m} \right)}{(R_s + R_{cy}) \cdot \left(s + \frac{1}{(R_s + R_{cy}) \cdot C_m} \right)} \quad (D.8)$$

Finlamente determina-se a impedância Z_1 , composta pela capacitância de eletrodo C_{dl} e a impedância Z_2 , logo:

$$Z_1(s) = \frac{1}{s \cdot C_{dl}} + Z_2(s) = \frac{1}{s \cdot C_{dl}} + \frac{R_s \cdot R_{cy} \left(s + \frac{1}{R_{cy} \cdot C_m} \right)}{(R_s + R_{cy}) \cdot \left(s + \frac{1}{(R_s + R_{cy}) \cdot C_m} \right)} \quad (D.9)$$

$$Z_1(s) = \frac{(R_s + R_{cy}) \left(s + \frac{R_{cy}}{(R_s + R_{cy})\tau_3} \right) + R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \left(s^2 + \frac{1}{\tau_3} s \right)}{(R_s + R_{cy}) \cdot C_{dl} \cdot \left(s^2 + \frac{R_{cy}}{(R_s + R_{cy})\tau_3} s \right)} \quad (D.10)$$

$$Z_1(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot s^2 + \left(\frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}}{\tau_3} + R_s + R_{cy} \right) s + \frac{R_{cy}}{\tau_3}}{(R_s + R_{cy}) C_{dl} \cdot s^2 + \frac{R_{cy} \cdot C_{dl}}{\tau_3} s} \quad (D.11)$$

$$Z_1(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot s^2 + \left(\frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}}{R_{cy} \cdot C_m} + R_s + R_{cy} \right) s + \frac{R_{cy}}{R_{cy} \cdot C_m}}{(R_s + R_{cy}) C_{dl} \cdot s^2 + \frac{R_{cy} \cdot C_{dl}}{R_{cy} \cdot C_m} s} \quad (D.12)$$

$$Z_1(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot s^2 + \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy} \right) s + \frac{1}{C_m}}{(R_s + R_{cy}) C_{dl} \cdot s^2 + \frac{C_{dl}}{C_m} s} \quad (D.13)$$

$$Z_1(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \left(s^2 + \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy} \right) \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}} s + \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m} \right)}{(R_s + R_{cy}) C_{dl} \left(s^2 + \frac{1}{(R_s + R_{cy}) C_m} s \right)} \quad (D.14)$$

$$Z_1(s) = \frac{R_s \cdot R_{cy}}{R_s + R_{cy}} \cdot \frac{s^2 + \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy} \right) \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}} s + \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m}}{s^2 + \frac{1}{(R_s + R_{cy}) C_m} s} \quad (D.15)$$

Substituindo a Equação D.15 na Equação D.1, tem-se que:

$$I(s) = \frac{v_d}{s} \frac{1}{Z_1(s)} = \frac{v_d}{s} \cdot \frac{\left(\frac{R_s + R_{cy}}{R_s \cdot R_{cy}}\right) s \left(s + \frac{1}{(R_s + R_{cy})C_m}\right)}{s^2 + \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy}\right) \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}} s + \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m}} \quad (D.16)$$

$$I(s) = v_d \cdot \left(\frac{R_s + R_{cy}}{R_s \cdot R_{cy}}\right) \cdot \frac{\left(s + \frac{1}{(R_s + R_{cy})C_m}\right)}{s^2 + \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy}\right) \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}} s + \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m}} \quad (D.17)$$

De modo a facilitar o entendimento, a Equação D.17 pode ser escrita da seguinte forma:

$$I(s) = I_p \frac{s + A}{(s^2 + Bs + C)} \quad (D.18)$$

onde:

$$I_p = v_d \left(\frac{R_s + R_{cy}}{R_s \cdot R_{cy}}\right) \quad (D.19)$$

$$A = \frac{1}{(R_s + R_{cy})C_m} \quad (D.20)$$

$$B = \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy}\right) \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}} \quad (D.21)$$

$$C = \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m} \quad (D.22)$$

Reescrevendo a Equação D.18 em frações parciais, fica da seguinte forma:

$$I(s) = I_p \left\{ \frac{K_1}{(s - s_1)} + \frac{K_2}{(s - s_2)} \right\} \quad (D.23)$$

Aplicando-se a transformada inversa de Laplace na Equação D.23, obtém-se a corrente no domínio do tempo, sob a forma:

$$i(t) = I_p (K_1 \cdot e^{s_1 t} + K_2 \cdot e^{s_2 t}) \quad (D.24)$$

Tem-se que a Equação D.18 pode ser reescrita da seguinte forma:

$$I(s) = I_p \frac{s + \omega_z}{\left(s^2 + \frac{\omega_p}{Q} s + \omega_p^2\right)} \quad (D.25)$$

Comparando as Equações D.18 e D.25, observa-se que:

$$A = \omega_z \quad \therefore \quad \omega_z = \frac{1}{(R_s + R_{cy})C_m} \quad (D.26)$$

$$C = \omega_p^2 \quad \therefore \quad \omega_p = \sqrt{C} = \sqrt{\frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl} \cdot C_m}} \quad (\text{D.27})$$

As raízes da equação do denominador da Equação D.25 é da forma:

$$s = \frac{-b \pm \sqrt{b^2 - 4ac}}{2a} \quad (\text{D.28})$$

onde

$$\begin{aligned} a &= 1 \\ b &= \frac{\omega_p}{Q} = B \text{ (Equação D.18)} = \left(\frac{R_s \cdot C_{dl}}{C_m} + R_s + R_{cy} \right) \frac{1}{R_s \cdot R_{cy} \cdot C_{dl}} \\ c &= \omega_p^2 \end{aligned} \quad (\text{D.29})$$

As raízes da Equação D.28 são:

$$\begin{aligned} s_1 &= \frac{-\omega_p + \omega_p \sqrt{1 - 4Q^2}}{2Q} \\ s_2 &= \frac{-\omega_p - \omega_p \sqrt{1 - 4Q^2}}{2Q} \end{aligned} \quad (\text{D.30})$$

O valor de Q (fator de qualidade do filtro), obtido da Equação D.29 ($b = B$), resulta em:

$$Q = \frac{1}{\omega_p [R_s C_{dl} + (R_{cy} + R_s) C_m]} \quad (\text{D.31})$$

Os valores de K_1 e K_2 da Equação D.23 são:

$$\begin{aligned} K_1 &= \frac{s_1 + \omega_z}{s_1 - s_2} \\ K_2 &= \frac{s_2 + \omega_z}{s_2 - s_1} \end{aligned} \quad (\text{D.32})$$

Através de rotinas de otimização implementadas em MATLAB[®] (Apêndice E), determina-se os parâmetros K_1 , s_1 , K_2 e s_2 para cada sinal de corrente medido ao longo do experimento.

Apêndice E

Rotina desenvolvida para determinar os coeficientes de Laplace das frações parciais no domínio S

Esta rotina, escrita em MATLAB[®], determina os coeficientes das frações parciais do Anexo D (Equação D.23), tanto da levedura *Saccharomyces cerevisiae* quanto da bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – Bti.

```
0 clear;
  clc;
2
  global t_exp i_exp vd tempo conc;
4
  % Seleciona arquivo/diretorio dos dados para ler os arquivos
6 *.TXT
  % [FileName, DirNome, filtro]=uigetfile('D:\MarcosSalvino\
8 Experimento\Dados','Selecione arquivo *.txt','*.txt');
  % FileName=fullfile(DirNome, FileName);
10 DirNome = uigetdir('D:\MarcosSalvino\Experimento\Dados');
  % ListaArquivo=dir(strcat(DirNome, '\', 'P10*.txt'));
12 ListaArquivo=dir(strcat(DirNome, '\', '*.txt'));

14 % Seleciona a taxa de amostragem e a quantidade de amostras
  Aviso = {'Digite a Taxa de Amostragem (100kS/s):',
16 'Digite a Quantidade de Amostras (max=100,000):'};
  Titulo = 'Informacoes Iniciais: ';
18 NumLines = 1;
  RespostaPadrao = {'100000','2500'};
20 options.Resize = 'on';
  options.WindowStyle = 'normal';
```

```

22 options.Interpreter = 'tex';
   Resposta = inputdlg(Aviso, Titulo, NumLines, RespostaPadrao,
24 options);
   Taxa = str2num(char(Resposta(1)));
26 Final = str2num(char(Resposta(2)));
   drawnow;
28 close;

30 h = waitbar(0, '5', 'Name', 'Aguarde...');

32 for Contador = 1:length(ListaArquivo)
   close;
34 waitbar(Contador/length(ListaArquivo), h, sprintf('Lendo %3d.o
   arquivo de %3d', Contador, length(ListaArquivo)));
36 FileName = ListaArquivo(Contador).name;
   Dados = TrocaVirgulaPorPonto(FileName);
38
   i_exp = Dados(2, 2:Final);
40 vd = mean(Dados(3, 2:Final));
   t_exp = (1/Taxa)*(0:length(i_exp)-1);
42
   Peak = max(i_exp);
44
   % coef_ini = [50 50 4e-6 1e-5 1e-8]; % Dados iniciais
46 coef_ini = [72.638607 53.958381 7.799130e-6 19.833454e-6 1e-8];
   % Create data
48 coef = [];
   OPTIONS = optimset('MaxIter', 1000, 'TolFun', 0.001, 'TolX', 0.01);
50 coef = fminsearch(@funcaoerro3_residuosEQ, coef_ini, OPTIONS);

52 Rs = coef(1);
   Rcy = coef(2);
54 Cm = coef(3);
   Cdl = coef(4);
56 t0 = coef(5);

58 Ip = vd*((Rs+Rcy)/(Rs*Rcy));

60 A = 1/((Rs+Rcy)*Cm);
   B = ((Rs*Cdl/Cm)+Rs+Rcy)*(1/(Rs*Rcy*Cdl));
62 C = 1/(Rs*Rcy*Cdl*Cm);

```

```

64 BB = [1 A];
    AA = [1 B C];
66 [R,P,K] = residue(BB,AA);
    k1 = R(1);
68 k2 = R(2);

70 s1 = P(1);
    s2 = P(2);

72
    i_teo = Ip .*(k1.* exp(s1.*(t_exp-t0)) + k2.* exp(s2.*(t_exp-
74 t0)));

76 % Apresentacao dos Resultados - Valores dos Parametros do
    Modelo Eletrico
78 disp('[k1░░░k2]');
    disp([k1    k2]);
80 disp('[s1░░░s2]');
    disp([s1    s2]);

82
    disp('[Rs░░░Rcy]░-░Ohms');
84 disp(coef(1:2));

86 disp('[Cm░░░Cdl]░-░uF');
    disp(coef(3:4)*1e6);

88
    Vetor_File(Contador) = {char(FileName)};
90 Vetor_Rs(Contador)    = [Rs];
    Vetor_Rcy(Contador)  = [Rcy];
92 Vetor_Cm(Contador)    = [Cm]*1e6;
    Vetor_Cdl(Contador)  = [Cdl]*1e6;
94 Vetor_Impedancia(Contador) = vd/Peak;
    Vetor_Tensao(Contador) = vd;
96 Vetor_PicoCorrente(Contador) = [Peak]*1000;
    VetorConc(Contador) = str2num(FileName(2:3));
98 %      Grafico_Iteo = zeros(length(i_teo),Contador);
    Grafico_Iteo{Contador} = [i_teo]*1000;
100 %      Grafico_Iexp = zeros(length(i_exp),Contador);
    Grafico_Iexp{Contador} = [i_exp]*1000;
102 %% Imprime os valores da Exponencial Dupla
    Z= sprintf('Y=░%0.4g░.exp(%0.4g░t)░+░░%0.4g░.exp(%0.4g░t)',

```

```

104 k1*Ip,s1,k2*Ip,s2);
    disp(Z);
106 Vetor_PicoCorrenteTeo(Contador) = ((k1+k2)*Ip)*1000;

108 %      hold off
    k(Contador) = Contador;
110 end

112 delete(h); % Fecha a janela de espera....

114 %% =====
    % Dados para a tabela
116 VetorRs    = Vetor_Rs';
    VetorRcy_[] = Vetor_Rcy';
118 VetorCm    = Vetor_Cm';
    VetorCdl_[] = Vetor_Cdl';
120 VetorIexp  = Vetor_PicoCorrente';
    VetorIteo_[] = Vetor_PicoCorrenteTeo';
122

    %% Gravacao dos Dados Calculados do Modelo Eletrico e dos
124 Picos de Corrente
    % Extensao dos arquivos *.DAT
126 NewName = [FileName(8:18) '_Bti.csv'];
    T = table(Vetor_File',Vetor_PicoCorrente',Vetor_Tensao',
128 Vetor_Impedancia',VetorRs,VetorRcy,VetorCm,VetorCdl,
    VetorConc','VariableNames',{ 'Arquivo','Corrente_mA',
130 'Tensao_mV','Imp_Ohms','Rs_Ohms','Rcy_Ohms','Cm_uF',
    'Cdl_uF','Concentracao'});
132 writetable(T,NewName,'Delimiter',' ');
    NewName1_[] = [FileName(1:10)_'_PicoCorr.dat'];
134 T_[] = table([Vetor_PicoCorrente'],'VariableNames',{ 'Corrente_mA'});
    writetable(T,NewName1,'Delimiter',' ');

```

Apêndice F

Dados obtidos nos experimentos
conduzidos com a levedura
Saccharomyces cerevisiae

Tabela F.1 – Dados dos experimentos conduzidos com levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dt} (μF)	Tempo	Células Totais (CFU/mL)
Exp20170315_07h51min47s.txt			60,93	46,16	6,97	17,81	1	$35,00 \times 10^5$
Exp20170315_08h51min47s.txt			60,93	46,75	7,25	18,53	2	$52,00 \times 10^5$
Exp20170315_09h51min47s.txt			60,49	47,96	7,54	18,84	3	$48,00 \times 10^5$
Exp20170315_10h51min47s.txt			59,21	48,55	7,84	19,71	4	$80,00 \times 10^5$
Exp20170315_11h51min47s.txt			57,79	49,71	8,00	20,31	5	$202,50 \times 10^5$
Exp20170315_12h51min47s.txt			56,91	50,63	8,26	20,86	6	$214,50 \times 10^5$
Exp20170315_13h51min47s.txt		1	55,69	51,02	8,45	21,41	7	$261,00 \times 10^5$
Exp20170315_14h51min47s.txt	0.5		54,82	51,07	8,60	21,69	8	$193,50 \times 10^5$
Exp20170315_15h51min47s.txt			54,00	51,41	8,56	21,82	9	$157,50 \times 10^5$
Exp20170315_16h51min47s.txt			53,80	51,75	8,63	22,03	10	$252,00 \times 10^5$
Exp20170315_17h51min47s.txt			54,04	51,92	8,64	21,89	11	$258,00 \times 10^5$
Exp20170315_18h51min47s.txt			53,79	52,16	8,62	21,92	12	$250,00 \times 10^5$
Exp20170328_08h27min19s.txt			70,08	45,98	7,01	20,74	1	$31,00 \times 10^5$
Exp20170328_09h27min19s.txt			71,42	46,61	7,52	20,96	2	$53,00 \times 10^5$
Exp20170328_10h27min19s.txt			61,57	45,77	7,73	21,90	3	$77,00 \times 10^5$
Exp20170328_11h27min19s.txt			59,91	46,31	7,97	22,33	4	$63,00 \times 10^5$
Exp20170328_12h27min19s.txt			58,60	47,15	8,34	23,18	5	$231,00 \times 10^5$
Exp20170328_13h27min19s.txt			57,78	48,03	8,72	23,91	6	$199,50 \times 10^5$
Exp20170328_14h27min19s.txt		2	55,16	48,10	8,79	24,17	7	$232,50 \times 10^5$
Exp20170328_15h27min19s.txt	0.5		54,26	48,08	8,99	24,63	8	$168,00 \times 10^5$
Exp20170328_16h27min19s.txt			54,25	48,07	9,31	25,31	9	$214,50 \times 10^5$
Exp20170328_17h27min19s.txt			53,90	48,37	9,21	25,20	10	$236,00 \times 10^5$
Exp20170328_18h27min19s.txt			53,42	48,53	9,18	25,17	11	$288,00 \times 10^5$

Continua na próxima página . . .

Tabela F.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	Células Totais (CFU/mL)
Exp20170328_19h27min19s.txt			54,41	48,20	9,34	25,17	12	$260,00 \times 10^5$
Exp20170328_20h27min19s.txt			53,55	48,60	9,17	25,07	13	$296,00 \times 10^5$
Exp20170413_08h18min37s.txt			73,30	44,24	6,53	18,13	1	$20,00 \times 10^5$
Exp20170413_09h18min37s.txt			62,51	44,83	8,37	23,86	2	$43,00 \times 10^5$
Exp20170413_10h18min37s.txt			58,66	44,99	9,06	25,47	3	$39,00 \times 10^5$
Exp20170413_11h18min37s.txt			57,51	45,81	9,45	26,43	4	$73,00 \times 10^5$
Exp20170413_12h18min37s.txt			56,44	46,93	9,60	27,14	5	$99,00 \times 10^5$
Exp20170413_13h18min37s.txt			56,05	47,65	9,89	27,78	6	$122,00 \times 10^5$
Exp20170413_14h18min37s.txt			55,17	47,71	10,40	28,72	7	$140,00 \times 10^5$
Exp20170413_15h18min37s.txt		3	55,04	47,70	10,71	29,07	8	$131,00 \times 10^5$
Exp20170413_16h18min37s.txt			53,99	47,46	10,87	29,78	9	$158,00 \times 10^5$
Exp20170413_17h18min37s.txt			55,23	48,28	10,96	29,87	10	$200,00 \times 10^5$
Exp20170413_18h18min37s.txt			55,14	47,37	11,13	29,70	11	$190,00 \times 10^5$
Exp20170413_19h18min37s.txt			54,72	47,49	11,05	29,78	12	$167,00 \times 10^5$
Exp20170413_20h18min37s.txt			54,65	47,12	11,10	29,79	13	$168,00 \times 10^5$
Exp20170503_08h07min10s.txt			69,36	42,51	8,18	22,28	1	$41,00 \times 10^5$
Exp20170503_09h07min10s.txt			64,52	38,36	9,67	25,43	2	$50,00 \times 10^5$
Exp20170503_10h07min10s.txt			67,53	39,89	9,79	25,53	3	$44,00 \times 10^5$
Exp20170503_11h07min10s.txt			68,93	42,14	9,47	25,27	4	$55,00 \times 10^5$
Exp20170503_12h07min10s.txt			80,38	48,97	9,57	25,04	5	$96,00 \times 10^5$
Exp20170503_13h07min10s.txt			75,09	46,82	9,49	25,34	6	$130,00 \times 10^5$
Exp20170503_14h07min10s.txt		4	71,05	43,39	10,37	26,38	7	$138,00 \times 10^5$
Exp20170503_15h07min10s.txt	0.5		60,40	43,60	9,66	25,22	8	$127,00 \times 10^5$
Exp20170503_16h07min10s.txt			61,79	45,43	9,77	25,29	9	$130,00 \times 10^5$
Exp20170503_17h07min10s.txt			68,42	51,93	9,78	25,23	10	$135,00 \times 10^5$

Continua na próxima página . . .

Tabela F.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	Células Totais (CFU/mL)
Exp20170503_18h07min10s.txt			68,59	47,48	10,16	25,76	11	$185,00 \times 10^5$
Exp20170503_19h07min10s.txt			62,25	46,22	9,67	25,04	12	$149,00 \times 10^5$
Exp20170515_10h48min39s.txt			56,39	36,21	7,05	18,99	1	$52,00 \times 10^5$
Exp20170515_11h48min39s.txt			54,83	37,15	7,12	19,43	2	$62,00 \times 10^5$
Exp20170515_12h48min39s.txt			54,00	37,91	7,23	19,92	3	$54,00 \times 10^5$
Exp20170515_13h48min39s.txt			53,04	38,78	7,25	20,30	4	$172,50 \times 10^5$
Exp20170515_14h48min39s.txt			52,15	39,65	7,33	20,72	5	$147,00 \times 10^5$
Exp20170515_15h48min39s.txt			50,88	40,51	7,50	21,20	6	$267,00 \times 10^5$
Exp20170515_16h48min39s.txt		5	49,81	40,83	7,80	21,69	7	$217,50 \times 10^5$
Exp20170515_17h48min39s.txt			48,95	41,02	7,98	21,99	8	$328,50 \times 10^5$
Exp20170515_18h48min39s.txt			48,55	41,31	8,00	22,03	9	$236,00 \times 10^5$
Exp20170515_19h48min39s.txt			48,24	41,45	8,02	22,11	10	$238,00 \times 10^5$
Exp20170515_20h48min39s.txt			48,15	41,50	8,08	22,21	11	$256,00 \times 10^5$
Exp20170801_09h25min12s.txt			63,54	38,82	7,70	18,30	1	$24,00 \times 10^5$
Exp20170801_10h25min12s.txt			59,54	33,60	9,58	21,79	2	$6,00 \times 10^5$
Exp20170801_11h25min12s.txt			58,92	33,68	9,67	21,98	3	$17,00 \times 10^5$
Exp20170801_12h25min12s.txt			60,63	33,53	9,82	22,47	4	$5,00 \times 10^5$
Exp20170801_13h25min12s.txt			60,20	33,56	9,99	22,94	5	$19,00 \times 10^5$
Exp20170801_14h25min12s.txt			66,74	32,47	10,86	25,07	6	$20,50 \times 10^5$
Exp20170801_15h25min12s.txt			58,55	32,95	11,02	25,06	7	$32,50 \times 10^5$
Exp20170801_16h25min12s.txt			60,50	33,76	10,84	24,53	8	$24,00 \times 10^5$
Exp20170801_17h25min12s.txt		6	58,01	34,75	10,55	24,16	9	$22,50 \times 10^5$
Exp20170801_18h25min12s.txt			63,45	34,18	11,32	25,67	10	$39,00 \times 10^5$
Exp20170801_22h30min14s.txt			61,87	35,87	11,79	27,20	11	$31,50 \times 10^5$
Exp20170801_23h30min14s.txt			57,61	37,03	11,24	26,29	12	$36,50 \times 10^5$

Continua na próxima página . . .

Tabela F.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	Células Totais (CFU/mL)
Exp20170802_00h30min14s.txt			60,12	36,62	11,68	27,00	13	$25,50 \times 10^5$
Exp20170802_01h30min14s.txt			57,77	37,43	11,30	26,34	14	$35,50 \times 10^5$
Exp20170802_02h30min14s.txt			60,97	36,49	11,98	27,40	15	$29,50 \times 10^5$
Exp20170802_03h30min14s.txt			63,50	36,14	12,35	27,84	16	$49,00 \times 10^5$
Exp20170831_11h17min32s.txt			52,73	36,43	9,20	21,96	1	$12,00 \times 10^5$
Exp20170831_12h17min32s.txt			53,44	37,04	9,16	22,16	2	$3,50 \times 10^5$
Exp20170831_13h17min32s.txt			53,74	37,13	9,20	22,26	3	$8,00 \times 10^5$
Exp20170831_14h17min32s.txt			53,47	37,39	9,19	22,25	4	$8,00 \times 10^5$
Exp20170831_15h17min32s.txt			52,93	37,59	9,20	22,37	5	$20,00 \times 10^5$
Exp20170831_16h17min32s.txt			53,18	37,59	9,39	22,69	6	$18,00 \times 10^5$
Exp20170831_17h17min32s.txt			52,71	38,15	9,42	22,74	7	$36,00 \times 10^5$
Exp20170831_18h17min57s.txt			52,61	38,30	9,73	23,39	8	$40,50 \times 10^5$
Exp20170831_19h17min57s.txt			52,16	38,80	9,70	23,46	9	$39,00 \times 10^5$
Exp20170831_20h17min57s.txt			52,17	39,16	9,74	23,68	10	$42,00 \times 10^5$
Exp20170831_21h17min57s.txt	0.1	7	52,13	39,56	9,71	23,77	11	$29,50 \times 10^5$
Exp20170831_22h17min57s.txt			52,07	39,92	9,65	23,82	12	$42,00 \times 10^5$
Exp20170831_23h17min57s.txt			52,43	40,22	9,67	23,91	13	$50,50 \times 10^5$
Exp20170901_00h17min57s.txt			53,20	40,40	9,83	24,03	14	$45,50 \times 10^5$
Exp20170901_01h17min57s.txt			54,56	40,96	9,87	24,14	15	$34,50 \times 10^5$
Exp20170901_02h17min57s.txt			57,46	40,42	10,16	24,43	16	$54,50 \times 10^5$
Exp20170901_03h17min57s.txt			56,11	40,77	10,00	24,25	17	$49,50 \times 10^5$
Exp20170901_04h17min57s.txt			56,59	40,46	10,09	24,39	18	$40,00 \times 10^5$
Exp20170901_05h17min57s.txt			56,44	40,58	10,10	24,34	19	$54,00 \times 10^5$
Exp20170901_06h17min57s.txt			57,48	40,39	10,24	24,56	20	$42,50 \times 10^5$
Exp20170921_09h23min31s.txt			66,36	39,10	7,78	19,10	1	$8,00 \times 10^5$

Continua na próxima página . . .

Tabela F.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	Células Totais (CFU/mL)
Exp20170921_10h23min31s.txt			60,84	37,29	8,08	20,00	2	$10,50 \times 10^5$
Exp20170921_11h23min31s.txt			60,52	37,43	8,06	20,00	3	$13,50 \times 10^5$
Exp20170921_12h23min31s.txt			60,08	37,65	8,02	20,01	4	$14,50 \times 10^5$
Exp20170921_13h23min31s.txt			59,65	37,86	8,01	20,06	5	$19,00 \times 10^5$
Exp20170921_14h23min31s.txt			59,02	38,17	8,01	20,17	6	$22,50 \times 10^5$
Exp20170921_15h23min31s.txt			58,24	38,52	8,04	20,38	7	$19,00 \times 10^5$
Exp20170921_16h23min31s.txt			57,57	39,11	8,06	20,53	8	$41,50 \times 10^5$
Exp20170921_17h23min31s.txt			56,75	39,51	8,18	20,99	9	$31,50 \times 10^5$
Exp20170921_18h23min31s.txt		8	56,20	40,42	8,14	20,96	10	$36,00 \times 10^5$
Exp20170921_19h23min31s.txt	0.1		55,71	41,08	8,14	21,16	11	$41,00 \times 10^5$
Exp20170921_20h23min31s.txt			56,43	42,03	8,30	21,37	12	$45,00 \times 10^5$
Exp20170921_21h23min31s.txt			56,84	42,56	8,38	21,64	13	$46,00 \times 10^5$
Exp20170921_22h23min31s.txt			61,06	42,87	8,69	22,16	14	$56,00 \times 10^5$
Exp20170921_23h23min31s.txt			59,02	43,94	8,44	21,96	15	$47,50 \times 10^5$
Exp20170922_00h23min31s.txt			59,20	43,38	8,67	22,54	16	$51,00 \times 10^5$
Exp20170922_01h23min31s.txt			62,09	44,88	8,41	21,87	17	$60,50 \times 10^5$
Exp20170922_02h23min31s.txt			64,89	44,47	8,75	22,22	18	$62,00 \times 10^5$
Exp20170922_03h23min31s.txt			64,20	44,70	8,69	22,12	19	$37,50 \times 10^5$
Exp20170922_04h23min31s.txt			64,92	44,88	8,74	22,26	20	$32,00 \times 10^5$

Apêndice G

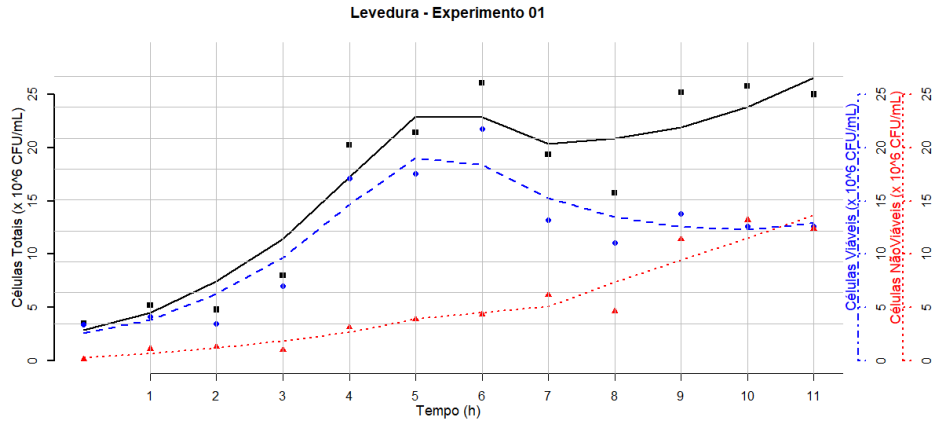
Figuras do experimento conduzido com *Saccharomyces cerevisiae* não inclusas no texto

G.1 Curvas utilizando a câmara de Neubauer

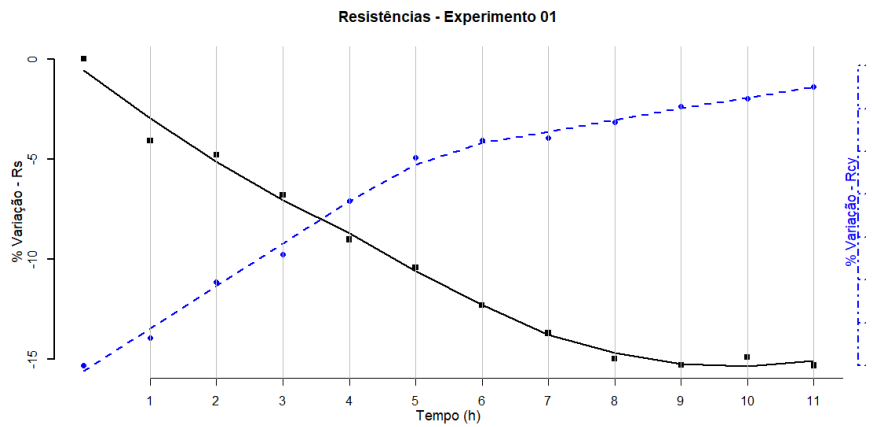
No gráfico superior de cada figura (letra *a*), o sinal ■ e *linha contínua* (em preto) indicam as contagens de células totais e seu ajuste, o sinal ● e *linha tracejada* (em azul) as contagens de células viáveis e o sinal ▲ e *linha pontilhada* (em vermelho) as contagens de células não viáveis (utilizando azul de metileno).

No gráfico central de cada figura (letra *b*), tem-se a curva normalizada da variação das resistências do meio de cultivo (R_s) (■ e *linha contínua*) e intracelular (R_{cy}) (● e *linha tracejada*).

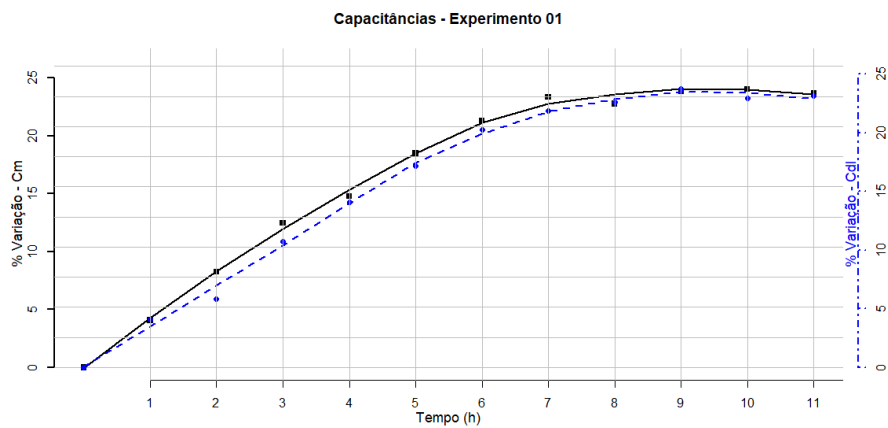
No gráfico inferior de cada figura (letra *c*), tem-se a curva normalizada da variação das capacitâncias da membrana celular (C_m) (■ e *linha contínua*) e de eletrodo (C_{dl}) (● e *linha tracejada*).



(a)

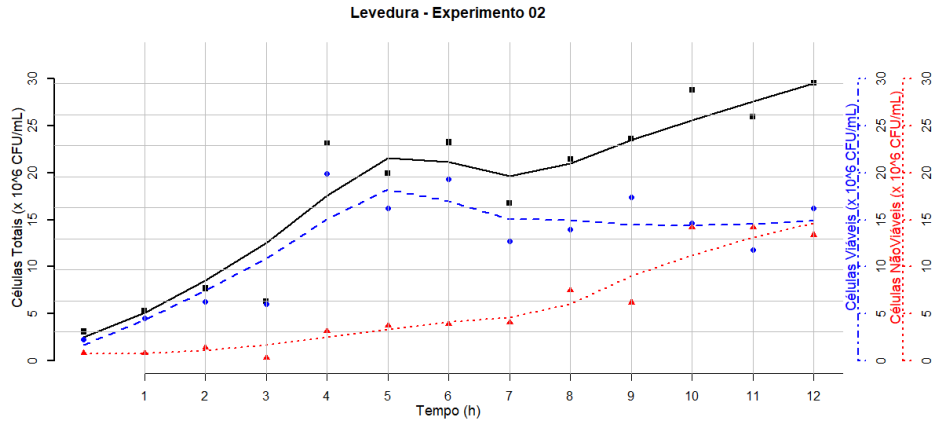


(b)

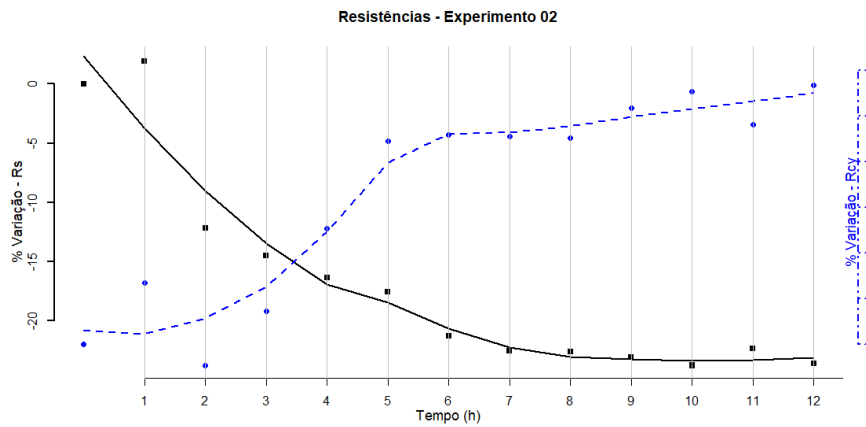


(c)

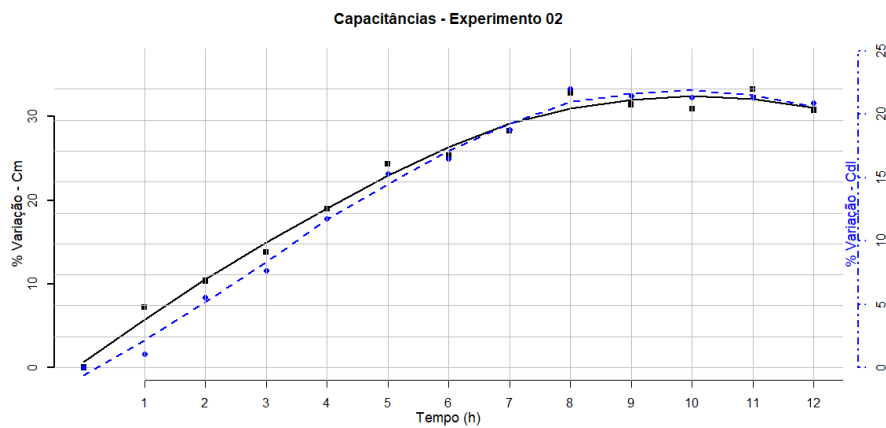
Figura G.1 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 01**.



(a)

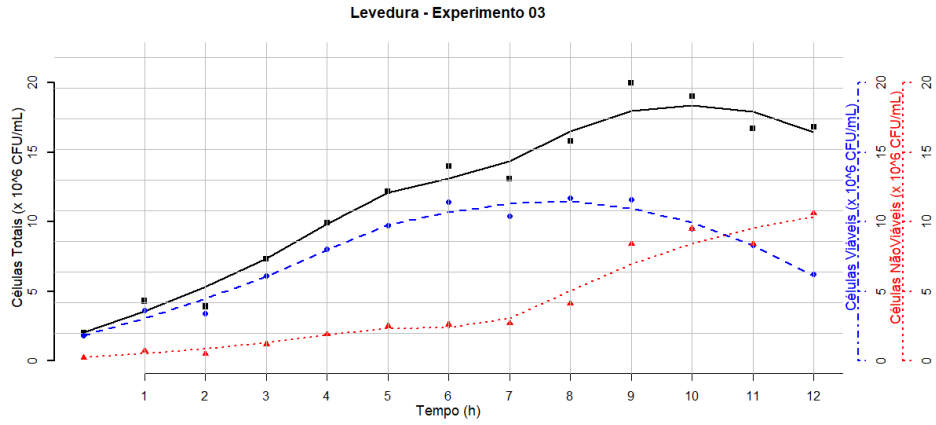


(b)

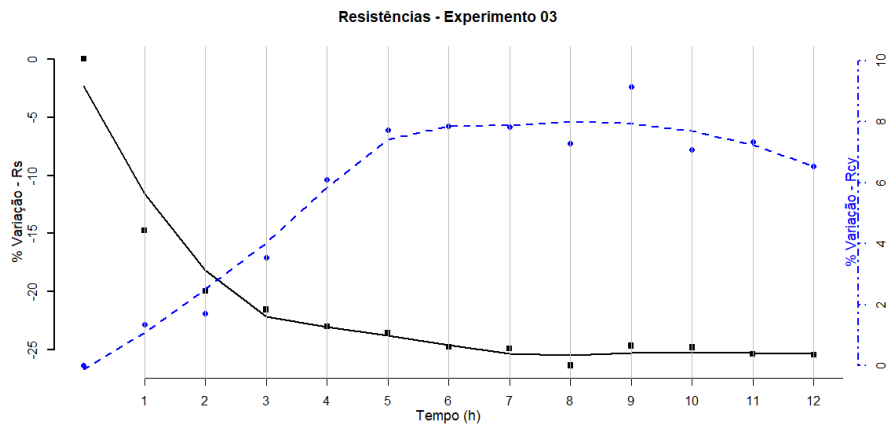


(c)

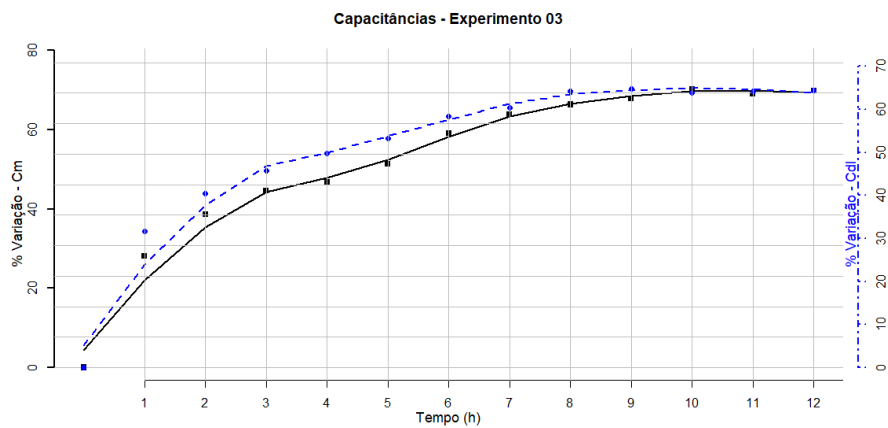
Figura G.2 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 02**.



(a)

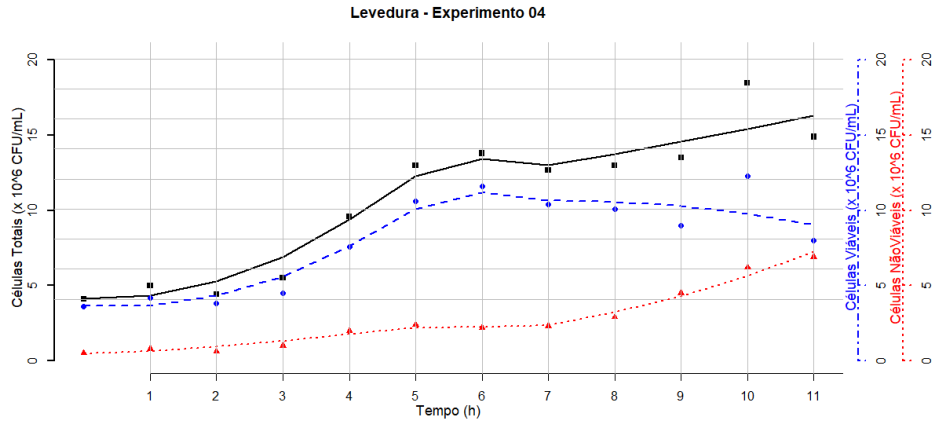


(b)

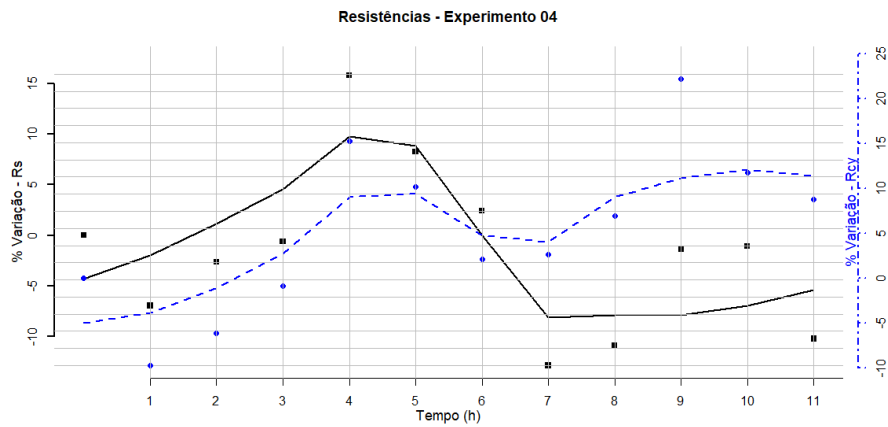


(c)

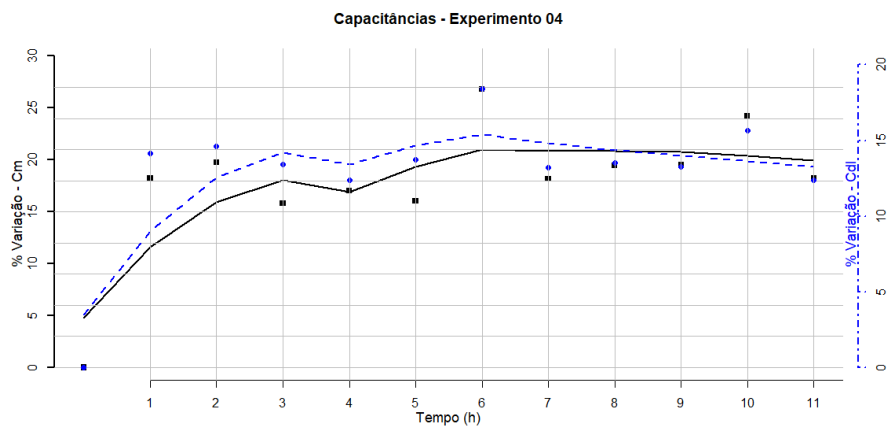
Figura G.3 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 03**.



(a)

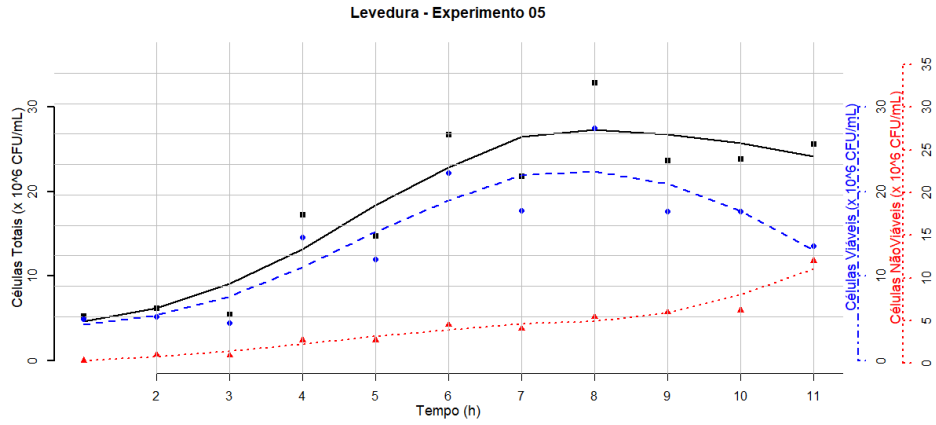


(b)

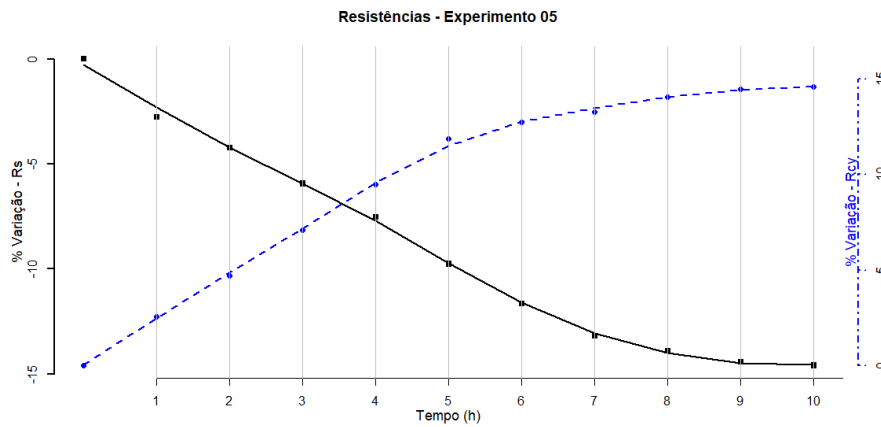


(c)

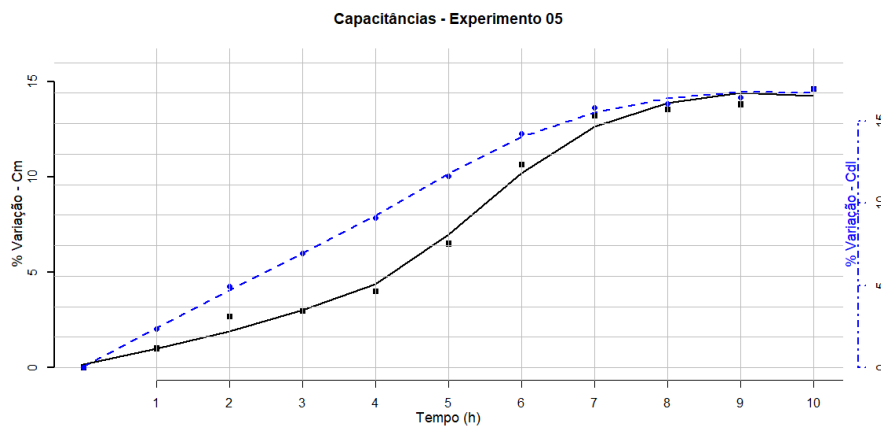
Figura G.4 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 04**.



(a)

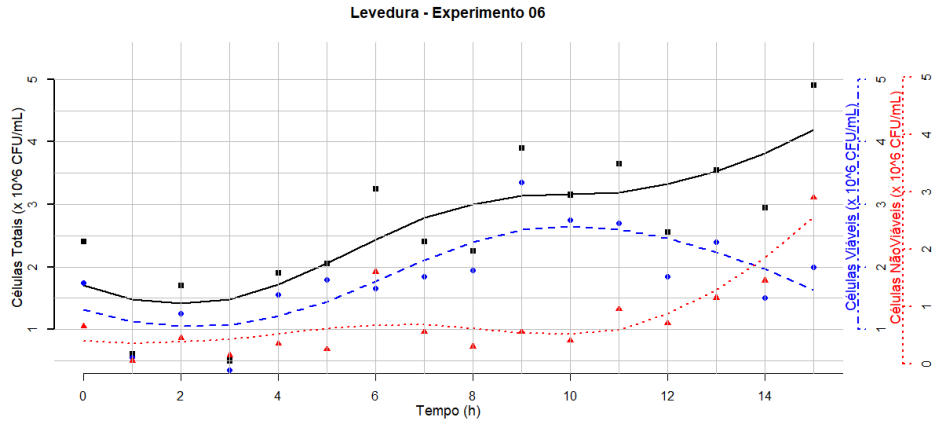


(b)

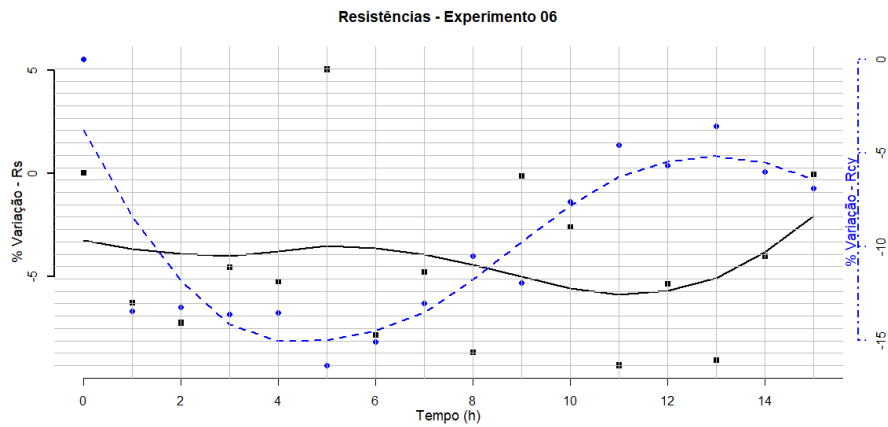


(c)

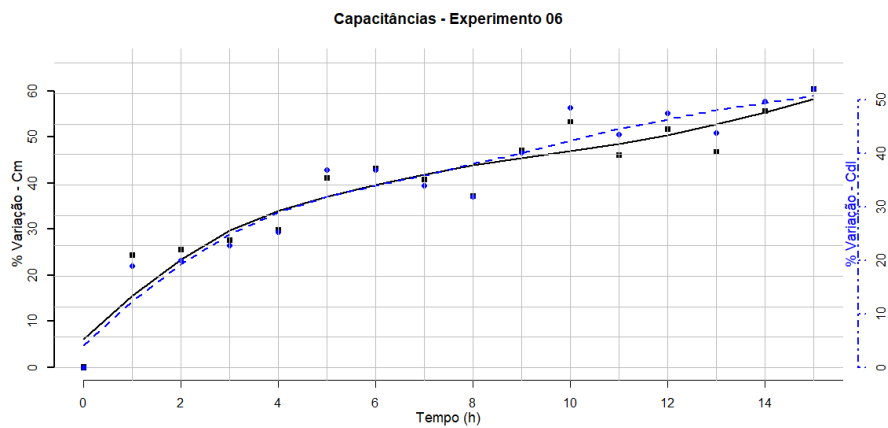
Figura G.5 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 05**.



(a)

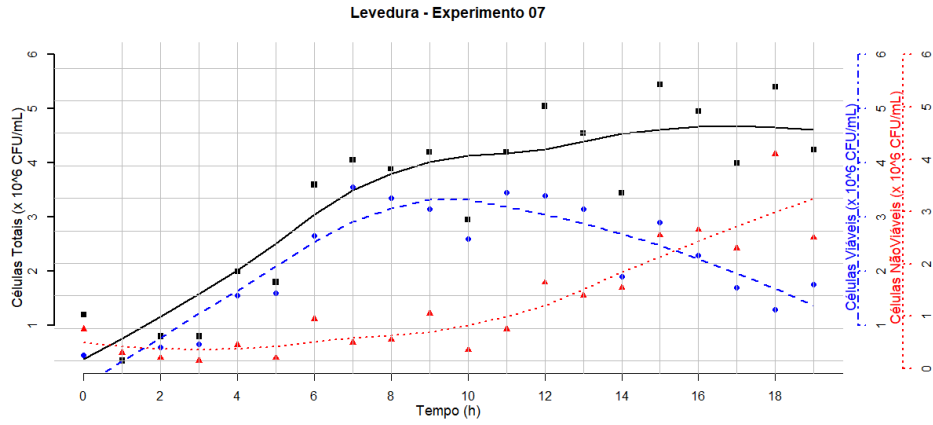


(b)

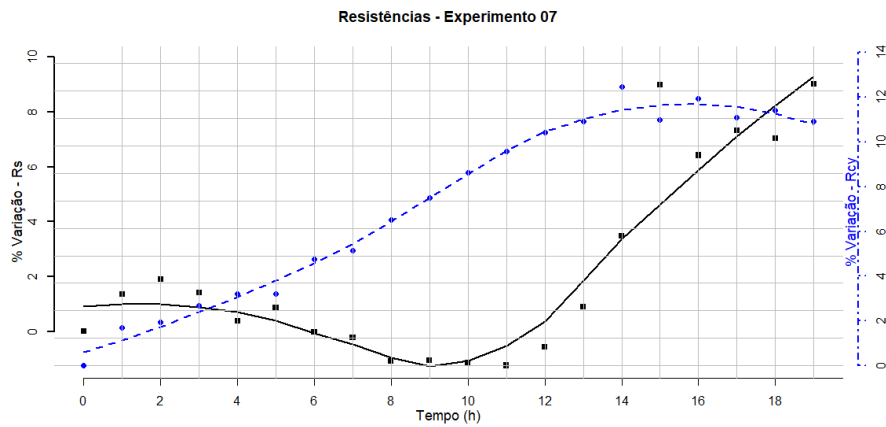


(c)

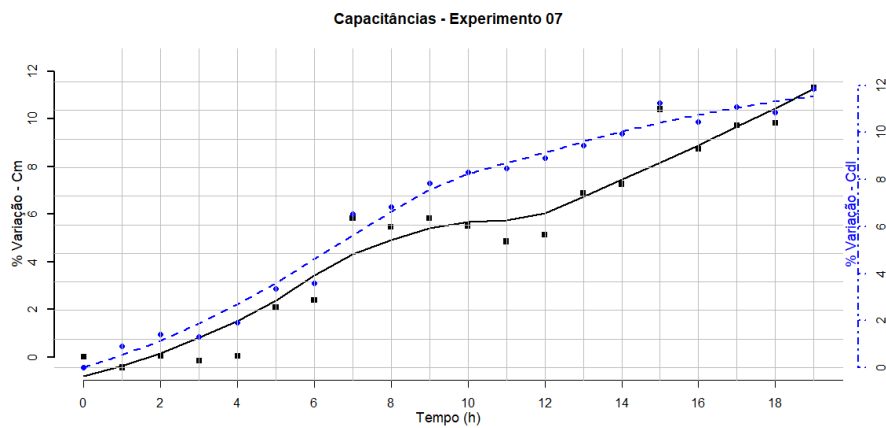
Figura G.6 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 06**.



(a)

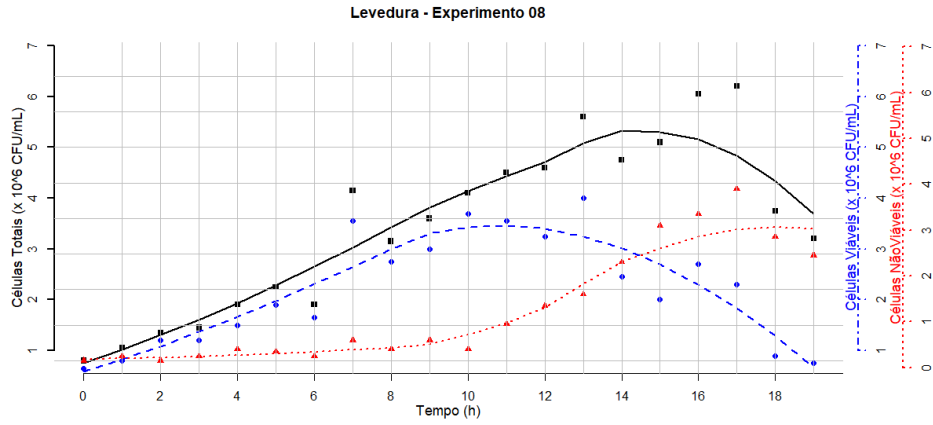


(b)

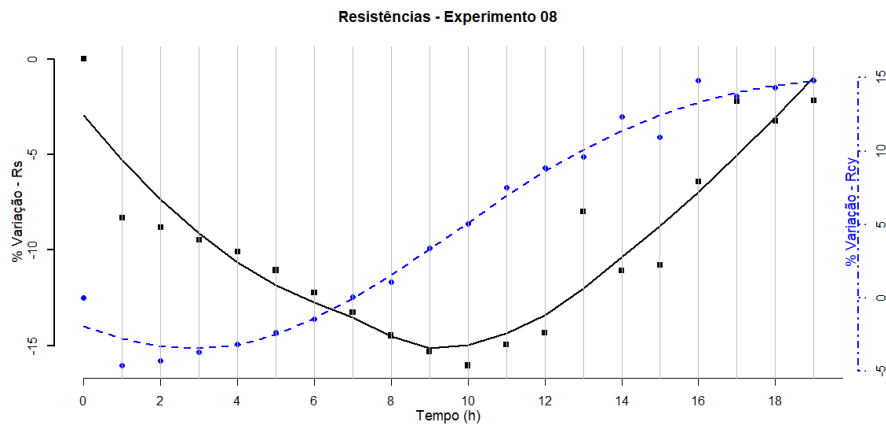


(c)

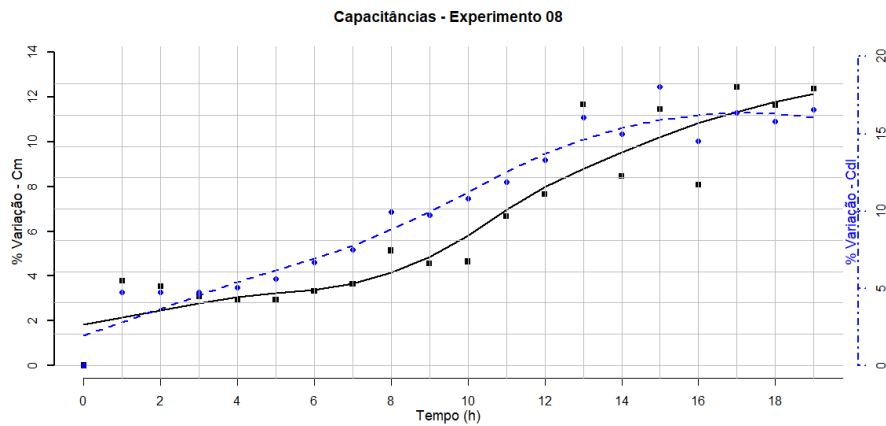
Figura G.7 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 07**.



(a)



(b)



(c)

Figura G.8 – (a) Contagem de células, (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} e (c) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} do **experimento 08**.

G.2 Curvas utilizando a demanda de oxigênio (OUR)

No gráfico superior de cada figura, o sinal + e *linha contínua* (em vermelho) indicam as variações de C_m e seu ajuste, respectivamente. No gráfico inferior de cada figura, compara-se o total de células (CT) experimentais medido na câmara de Neubauer e seu ajuste (sinal ■ e *linha contínua*) em preto, com o total de células estimadas pelo método proposto (Equação 4.8) e seu ajuste (● e *linha tracejada*) em azul, respectivamente.

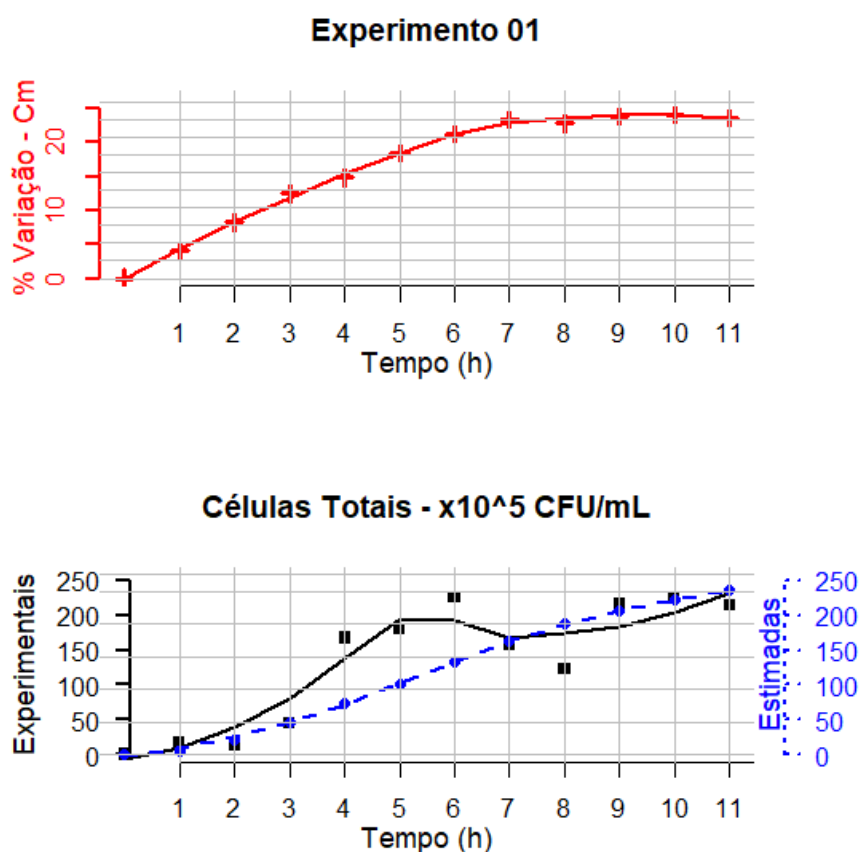


Figura G.9 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 01** com *Saccharomyces cerevisiae*.

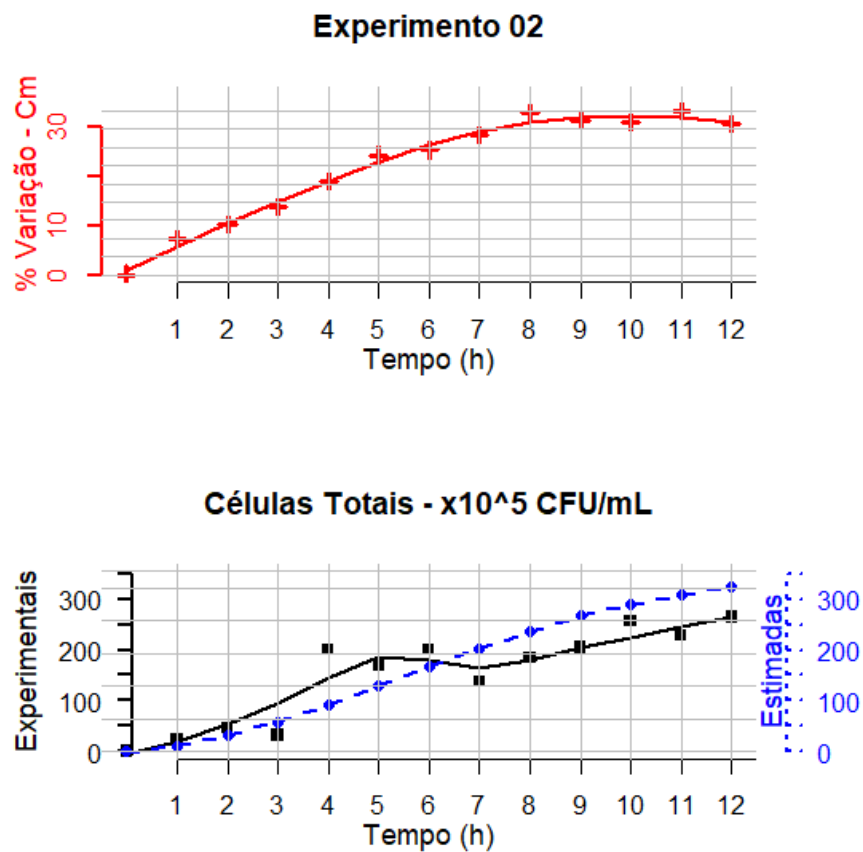


Figura G.10 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 02** com *Saccharomyces cerevisiae*.

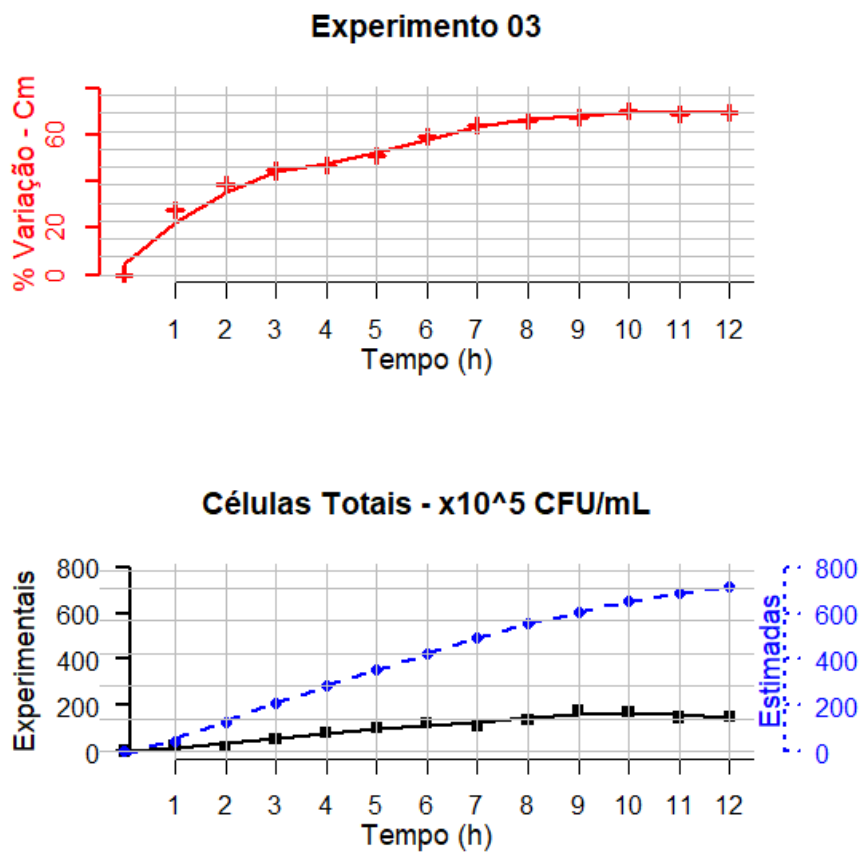


Figura G.11 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 03** com *Saccharomyces cerevisiae*.

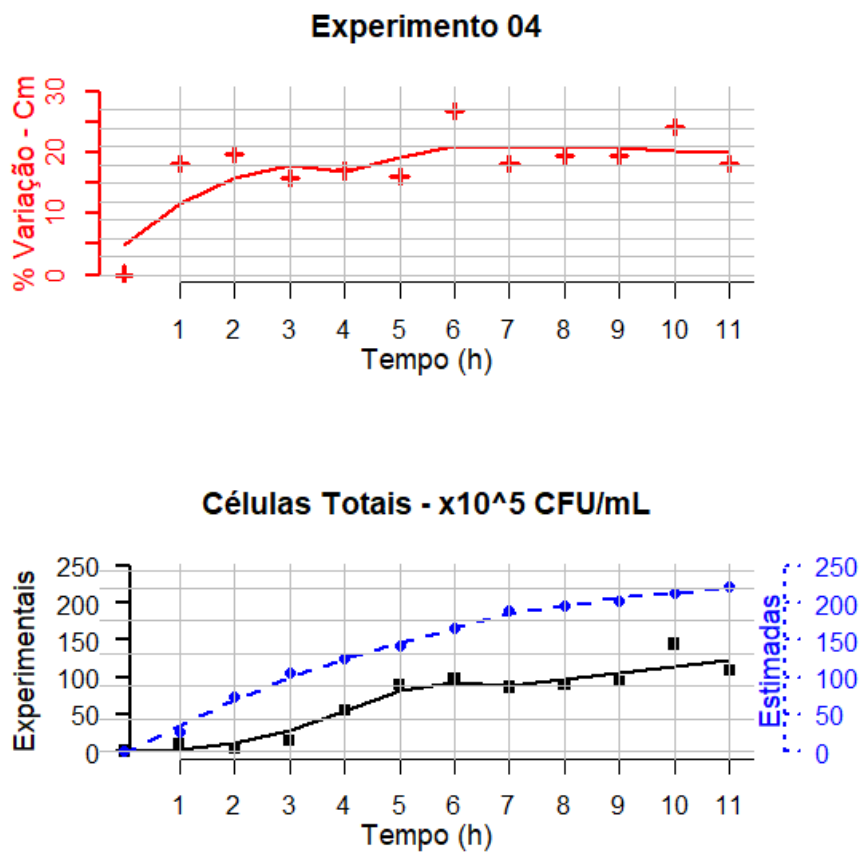


Figura G.12 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 04** com *Saccharomyces cerevisiae*.

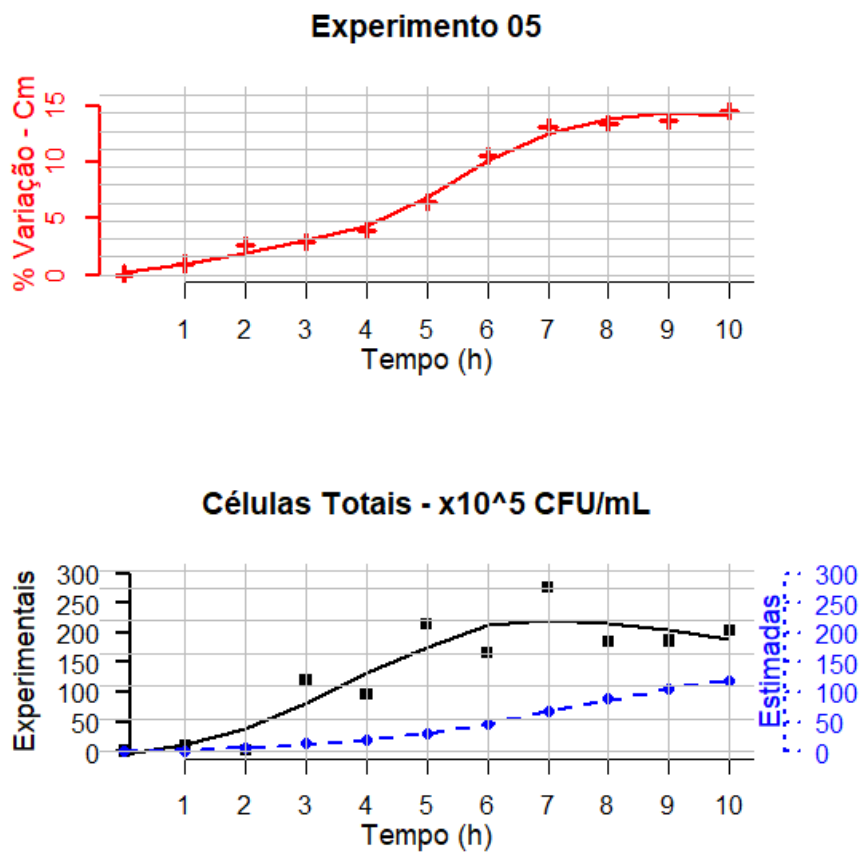


Figura G.13 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 05** com *Saccharomyces cerevisiae*.

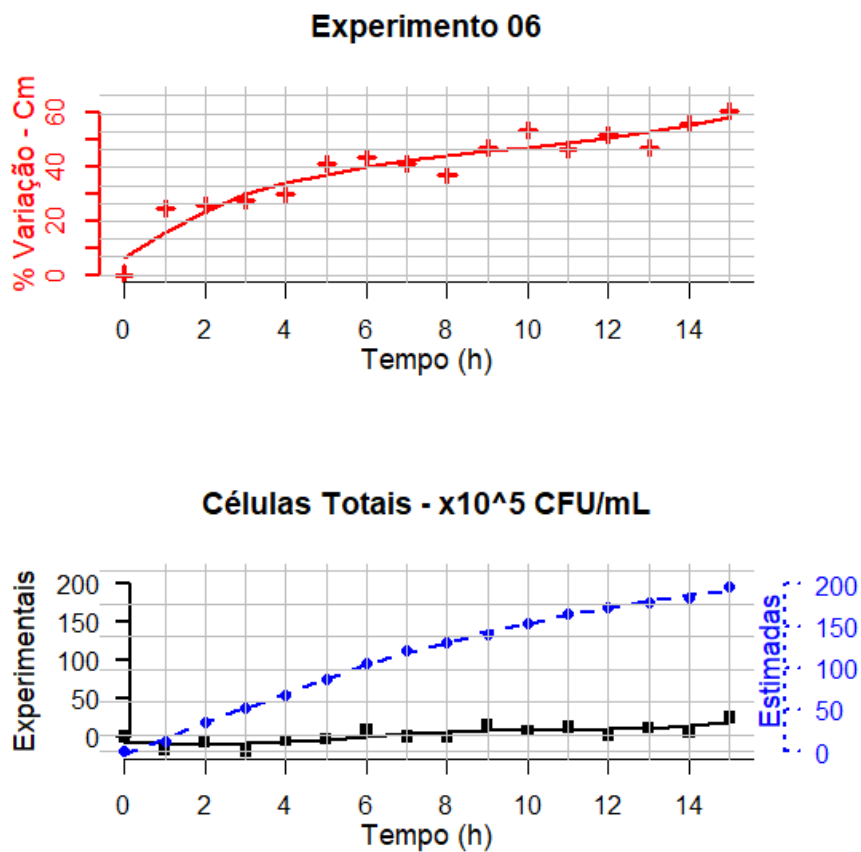


Figura G.14 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 06** com *Saccharomyces cerevisiae*.

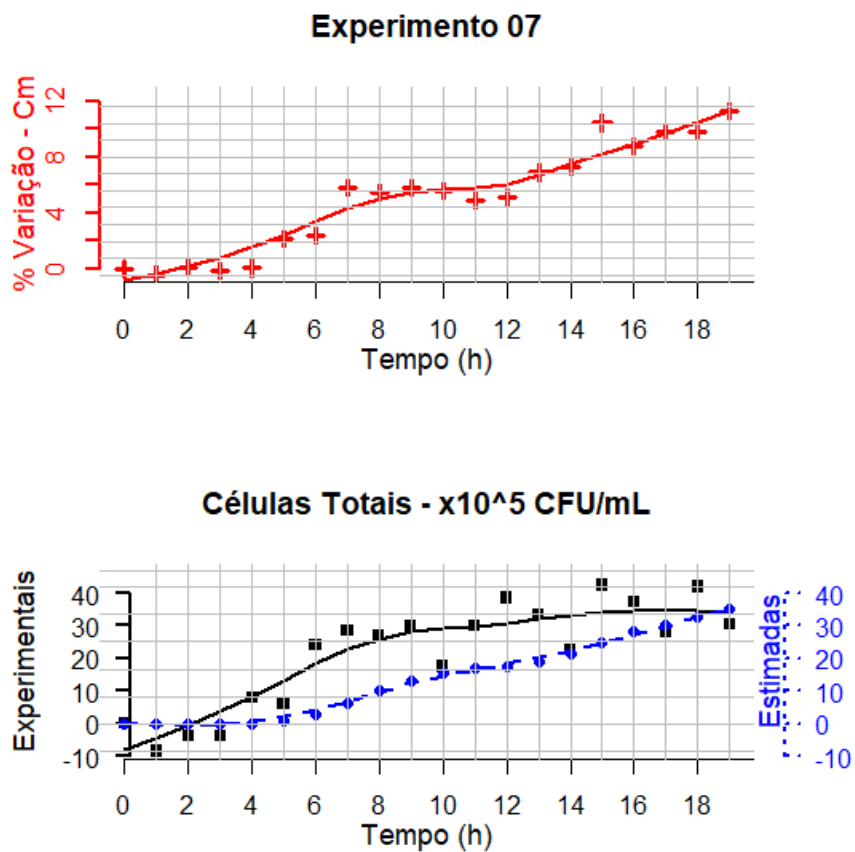


Figura G.15 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 07** com *Saccharomyces cerevisiae*.

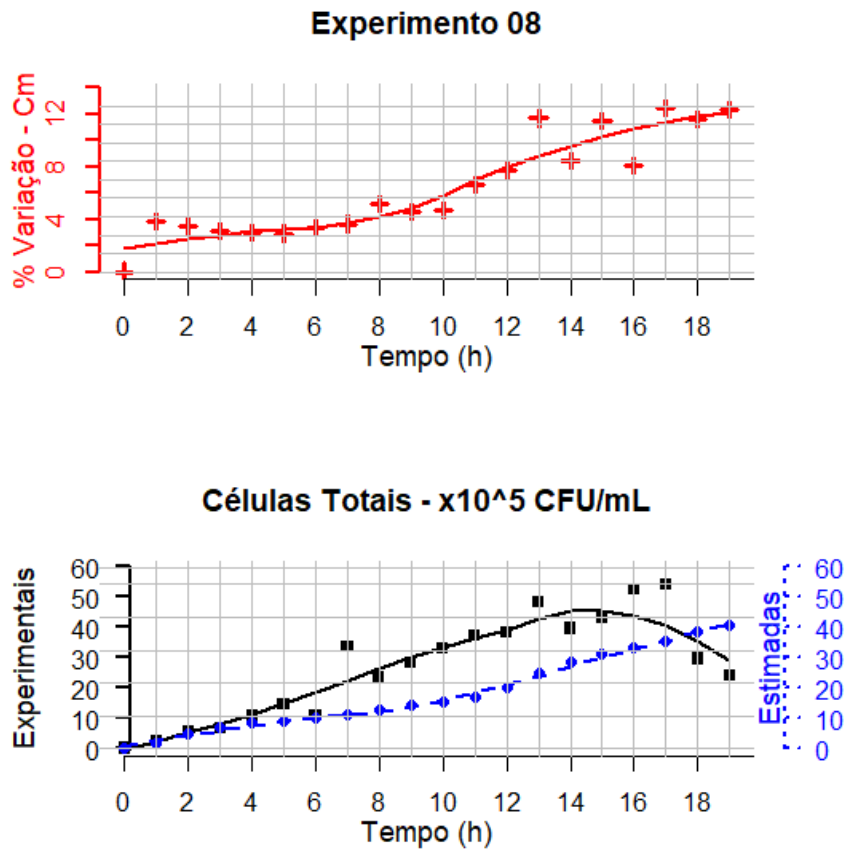


Figura G.16 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 08** com *Saccharomyces cerevisiae*.

Página intencionalmente em Branco

Apêndice H

Dados obtidos nos experimentos
conduzidos com a bactéria *Bacillus*
thuringiensis var. *israelensis* – Bti

Tabela H.1 – Dados dos experimentos conduzidos com a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – Bti

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{al} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9$ CFU/mL)
P05EL1_Exp20181219_12h07min46s.txt			115,18	34,81	8,03	22,31	1	5,50	2,85
P05EL1_Exp20181219_13h07min45s.txt			121,64	31,43	8,73	24,45	2	5,50	2,97
P05EL1_Exp20181219_14h07min45s.txt			117,86	30,28	9,53	27,11	3	6	3,03
P05EL1_Exp20181219_15h07min45s.txt			107,26	30,68	11,63	31,18	4	6	3,18
P05EL1_Exp20181219_16h07min45s.txt			87,70	32,40	15,67	35,77	5	5	3,66
P05EL1_Exp20181219_17h07min45s.txt			92,91	30,52	17,97	43,54	6	5	5,58
P05EL1_Exp20181219_18h07min45s.txt			80,26	32,90	15,80	36,88	7	5	6,66
P05EL1_Exp20181219_19h07min45s.txt			77,94	33,12	15,69	36,79	8	5	7,35
P05EL1_Exp20181219_20h07min45s.txt			75,58	33,35	15,70	36,34	9	5	9,15
P05EL1_Exp20181219_21h07min45s.txt	5	1	68,67	34,49	14,72	34,34	10	5	9,99
P05EL1_Exp20181219_22h07min45s.txt			68,79	34,32	13,21	31,95	11	5	10,62
P05EL1_Exp20181219_23h07min45s.txt			79,82	31,47	14,53	35,67	12	5	11,43
P05EL1_Exp20181220_00h07min45s.txt			79,34	31,38	13,63	34,06	13	5	11,64
P05EL1_Exp20181220_01h07min45s.txt			74,59	31,90	12,36	31,15	14	5,50	11,16
P05EL1_Exp20181220_02h07min45s.txt			80,14	31,23	12,04	29,77	15	6	11,04
P05EL1_Exp20181220_03h07min45s.txt			84,71	30,46	12,06	29,95	16	6	10,89
P05EL1_Exp20181220_04h07min45s.txt			81,81	30,08	11,72	28,82	17	6	11,16
P05EL1_Exp20181220_05h07min46s.txt			81,77	29,45	12,19	29,01	18	6	11,37
P05EL1_Exp20181220_06h07min45s.txt			75,40	28,89	11,84	27,98	19	6	11,70
P10EL2_Exp20181219_12h07min55s.txt			74,64	32,45	8,91	22,60	1	5,50	3,21
P10EL2_Exp20181219_13h07min54s.txt			121,52	30,27	12,28	35,17	2	5,50	0,46
P10EL2_Exp20181219_14h07min54s.txt			92,04	27,56	21,05	62,44	3	5,50	3,09
P10EL2_Exp20181219_15h07min54s.txt			75,89	28,04	22,96	55,88	4	6	3,60

Continua na próxima página ...

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P10EL2_Exp20181219_16h07min54s.txt			66,36	27,06	41,38	73,07	5	5	3,72
P10EL2_Exp20181219_17h07min54s.txt			66,80	26,72	44,49	76,38	6	5	5,10
P10EL2_Exp20181219_18h07min54s.txt			63,52	26,56	51,47	81,50	7	5	6,51
P10EL2_Exp20181219_19h07min52s.txt			63,67	26,43	54,60	82,56	8	5	7,47
P10EL2_Exp20181219_20h07min54s.txt			63,21	27,66	40,31	62,98	9	5	8,91
P10EL2_Exp20181219_21h07min52s.txt			61,78	27,19	48,14	71,86	10	5	9,96
P10EL2_Exp20181219_22h07min54s.txt	10	2	62,71	26,88	51,88	75,85	11	5	10,80
P10EL2_Exp20181219_23h07min54s.txt			63,61	26,12	52,50	75,48	12	5	11,88
P10EL2_Exp20181220_00h07min54s.txt			64,13	26,51	49,22	71,81	13	5	11,79
P10EL2_Exp20181220_01h07min52s.txt			64,15	26,63	48,73	73,21	14	5,50	11,52
P10EL2_Exp20181220_02h07min52s.txt			64,18	26,79	47,27	73,02	15	6	11,58
P10EL2_Exp20181220_03h07min54s.txt			68,67	27,54	31,97	58,95	16	6	11,34
P10EL2_Exp20181220_04h07min56s.txt			68,57	29,79	22,51	48,42	17	6	11,70
P10EL2_Exp20181220_05h07min56s.txt			78,78	30,53	19,81	48,20	18	6	12,78
P10EL2_Exp20181220_06h07min56s.txt			62,04	32,11	17,70	38,69	19	6	12,90
P15EL3_Exp20181219_12h08min00s.txt			100,66	29,66	10,03	26,19	1	5,50	3,48
P15EL3_Exp20181219_13h08min02s.txt			109,50	29,37	10,89	39,03	2	5,50	0,53
P15EL3_Exp20181219_14h08min02s.txt			102,01	29,92	10,69	39,15	3	5,50	3,51
P15EL3_Exp20181219_15h08min01s.txt			96,04	30,20	11,30	41,51	4	5,50	3,78
P15EL3_Exp20181219_16h08min06s.txt			84,18	30,57	12,89	43,50	5	5	3,57
P15EL3_Exp20181219_17h08min03s.txt			73,30	30,99	15,57	46,67	6	5	4,62
P15EL3_Exp20181219_18h08min02s.txt			70,78	31,34	15,88	47,82	7	5	5,88
P15EL3_Exp20181219_19h08min01s.txt			67,94	31,25	17,04	50,02	8	5	6,99
P15EL3_Exp20181219_20h08min02s.txt			64,80	31,36	17,84	49,33	9	5	8,37
P15EL3_Exp20181219_21h08min01s.txt	15	3	62,92	31,24	18,73	49,16	10	5	9,39

Continua na próxima página . . .

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P15EL3_Exp20181219_22h08min01s.txt			61,95	31,15	19,48	49,08	11	5	11,34
P15EL3_Exp20181219_23h08min02s.txt			58,61	30,94	20,15	47,98	12	5	13,32
P15EL3_Exp20181220_00h08min01s.txt			60,84	30,99	20,43	49,08	13	5	11,85
P15EL3_Exp20181220_01h07min59s.txt			59,59	31,04	20,96	48,12	14	5,50	15
P15EL3_Exp20181220_02h07min59s.txt			59,29	31,08	20,97	47,68	15	6	11,88
P15EL3_Exp20181220_03h08min02s.txt			57,77	31,54	20,13	46,48	16	6	11,82
P15EL3_Exp20181220_04h08min02s.txt			58,28	31,67	19,49	46,30	17	6	13,08
P15EL3_Exp20181220_05h08min02s.txt			58,83	31,82	18,84	46,14	18	6	13,14
P15EL3_Exp20181220_06h08min02s.txt			58,12	31,30	18,86	46,41	19	6	13,14
P05EL2_Exp20190111_12h31min21s.txt			76,40	34,65	9,66	23,31	1	6	2,52
P05EL2_Exp20190111_13h31min21s.txt			76,19	34,27	9,95	23,96	2	6	2,58
P05EL2_Exp20190111_14h31min21s.txt			81,21	33,62	10,49	25,23	3	6	2,54
P05EL2_Exp20190111_15h31min21s.txt			81,57	33,37	10,92	26,26	4	6	2,69
P05EL2_Exp20190111_16h31min21s.txt			78,28	33,05	12,27	28,32	5	5,50	2,87
P05EL2_Exp20190111_17h31min21s.txt			66,36	33,59	13,97	31,44	6	5	4,91
P05EL2_Exp20190111_18h31min21s.txt			66,50	33,38	15,18	34,60	7	4,50	6,92
P05EL2_Exp20190111_19h31min21s.txt			63,83	31,94	16,33	35,17	8	5	7,52
P05EL2_Exp20190111_20h31min21s.txt	5	4	64,71	32,03	16,48	35,66	9	5	8,82
P05EL2_Exp20190111_21h31min21s.txt			64,64	31,88	16,77	35,99	10	5	9,53
P05EL2_Exp20190111_22h31min21s.txt			62,47	32,22	16,54	35,48	11	5,50	9,87
P05EL2_Exp20190111_23h31min21s.txt			58,45	33,41	15,27	32,64	12	5,50	11,02
P05EL2_Exp20190112_00h31min21s.txt			58,35	33,80	14,49	31,62	13	5	11,55
P05EL2_Exp20190112_01h31min21s.txt			57,04	33,54	14,42	31,75	14	5,50	11,49
P05EL2_Exp20190112_02h31min21s.txt			61,26	33,03	15,07	32,45	15	6	13,06
P05EL2_Exp20190112_03h31min21s.txt			62,17	33,09	14,03	31,63	16	6	14,26

Continua na próxima página...

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P05EL2_Exp20190112_04h31min21s.txt			64,70	32,94	12,73	30,14	17	6	14,08
P05EL2_Exp20190112_05h31min21s.txt			69,22	32,17	12,74	30,62	18	5,50	13,62
P05EL2_Exp20190112_06h31min21s.txt			68,57	31,36	13,20	31,14	19	6	12,16
P10EL3_Exp20190111_12h31min39s.txt			102,44	32,34	7,85	20,09	1	6	2,38
P10EL3_Exp20190111_13h31min28s.txt			100,37	32,39	7,77	20,31	2	6	2,45
P10EL3_Exp20190111_14h31min28s.txt			101,43	32,41	7,85	20,60	3	6	2,71
P10EL3_Exp20190111_15h31min28s.txt			96,70	32,74	7,91	20,61	4	6	2,82
P10EL3_Exp20190111_16h31min28s.txt			86,47	33,53	8,65	22,42	5	5,50	3,24
P10EL3_Exp20190111_17h31min28s.txt			69,64	35,10	11,78	28,07	6	5	5,79
P10EL3_Exp20190111_18h31min28s.txt			72,50	34,91	12,86	31,57	7	4,50	6,65
P10EL3_Exp20190111_19h31min28s.txt			69,81	33,02	13,48	32,29	8	5	7,52
P10EL3_Exp20190111_20h31min28s.txt			67,83	33,48	13,51	32,68	9	5	8,91
P10EL3_Exp20190111_21h31min27s.txt			64,44	33,88	13,51	32,96	10	5	9,50
P10EL3_Exp20190111_22h31min28s.txt	10	5	65,35	34,19	12,86	32,45	11	5	9,41
P10EL3_Exp20190111_23h31min28s.txt			64,46	33,99	12,74	31,45	12	5,50	10,03
P10EL3_Exp20190112_00h31min30s.txt			61,69	34,26	13,04	31,17	13	5	11,19
P10EL3_Exp20190112_01h31min28s.txt			62,29	33,47	12,48	30,65	14	5,50	11,35
P10EL3_Exp20190112_02h31min28s.txt			63,17	33,54	12,00	29,35	15	5,50	11,80
P10EL3_Exp20190112_03h31min28s.txt			64,12	33,32	11,79	28,83	16	5,50	13,48
P10EL3_Exp20190112_04h31min28s.txt			64,33	32,79	12,12	28,93	17	6,50	14,04
P10EL3_Exp20190112_05h31min28s.txt			65,19	32,81	12,57	29,79	18	6	13,58
P10EL3_Exp20190112_06h31min28s.txt			64,01	32,12	12,10	29,40	19	7	12,16
P15EL1_Exp20190111_12h31min36s.txt			71,60	31,39	10,47	24,46	1	5,50	2,94
P15EL1_Exp20190111_13h31min35s.txt			71,42	31,26	10,76	24,95	2	5,50	3,26
P15EL1_Exp20190111_14h31min35s.txt			71,97	31,32	10,85	25,33	3	5,50	2,60

Continua na próxima página . . .

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P15EL1_Exp20190111_15h31min34s.txt			71,25	31,33	11,13	25,86	4	5,50	2,95
P15EL1_Exp20190111_16h31min34s.txt			65,66	32,28	12,18	27,34	5	5,50	3,11
P15EL1_Exp20190111_17h31min34s.txt			58,28	33,45	14,93	31,44	6	5	4,89
P15EL1_Exp20190111_18h31min34s.txt			59,51	33,25	15,74	34,82	7	4,50	6,21
P15EL1_Exp20190111_19h31min34s.txt		6	58,51	31,94	17,27	35,75	8	5	7,77
P15EL1_Exp20190111_20h31min34s.txt	15		58,65	32,01	17,41	36,28	9	5	8,37
P15EL1_Exp20190111_21h31min34s.txt			58,57	32,07	17,30	36,30	10	5	9,11
P15EL1_Exp20190111_22h31min34s.txt			57,98	32,04	17,14	35,43	11	5	9,98
P15EL1_Exp20190111_23h31min34s.txt			57,64	32,08	16,78	33,72	12	5,50	10,30
P15EL1_Exp20190112_00h31min35s.txt			58,29	32,04	16,36	32,67	13	5	10,66
P15EL1_Exp20190112_01h31min34s.txt			57,70	31,66	16,02	32,35	14	5,50	12,44
P15EL1_Exp20190112_02h31min35s.txt			59,02	31,96	15,78	32,02	15	5,50	11,64
P15EL1_Exp20190112_03h31min34s.txt			57,86	32,43	15,23	31,45	16	5,50	14,24
P15EL1_Exp20190112_04h31min34s.txt			59,81	32,24	13,83	30,32	17	6	13,50
P15EL1_Exp20190112_05h31min34s.txt			60,84	32,13	13,14	29,57	18	6	12,74
P15EL1_Exp20190112_06h31min34s.txt			61,17	31,08	13,27	29,40	19	7	12,02
P05EL3_Exp20190119_06h58min31s.txt			107,51	29,11	8,28	22,41	1	6	2,84
P05EL3_Exp20190119_07h58min30s.txt			92,64	28,82	8,59	21,87	2	6	3,37
P05EL3_Exp20190119_08h58min31s.txt			88,30	29,27	8,72	22,14	3	5,50	3,33
P05EL3_Exp20190119_09h58min30s.txt			87,10	29,43	8,86	22,55	4	5,50	3,42
P05EL3_Exp20190119_10h58min30s.txt			81,55	29,79	9,45	23,41	5	5,50	3,29
P05EL3_Exp20190119_11h58min30s.txt			69,18	30,79	12,52	27,64	6	5,50	3,89
P05EL3_Exp20190119_12h58min31s.txt	5	7	64,41	31,36	15,21	31,55	7	5	5,59
P05EL3_Exp20190119_13h58min31s.txt			66,74	31,38	15,32	32,37	8	5	7,63
P05EL3_Exp20190119_14h58min31s.txt			63,32	31,62	15,55	32,34	9	5	7,95

Continua na próxima página...

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P05EL3_Exp20190119_15h58min31s.txt			62,08	32,03	16,13	33,26	10	4,50	7,97
P05EL3_Exp20190119_16h58min31s.txt			61,74	31,91	16,78	34,11	11	4,50	7,69
P05EL3_Exp20190119_17h58min30s.txt			60,53	32,26	16,30	32,86	12	4,50	9,14
P05EL3_Exp20190119_18h58min31s.txt			59,70	32,57	15,83	32,69	13	5	9,33
P05EL3_Exp20190119_19h58min31s.txt			60,58	32,53	15,86	32,69	14	5	10,15
P05EL3_Exp20190119_20h58min31s.txt			60,61	32,54	15,59	32,65	15	5	11,21
P05EL3_Exp20190119_21h58min31s.txt			60,44	32,65	15,25	32,01	16	5,50	14,64
P05EL3_Exp20190119_22h58min31s.txt			61,71	32,94	13,72	30,89	17	5,50	14,46
P05EL3_Exp20190119_23h58min31s.txt			61,71	32,94	13,72	30,89	18	5,50	14,98
P05EL3_Exp20190120_00h58min31s.txt			65,25	32,37	12,27	28,90	19	5	14,84
P10EL1_Exp20190119_06h58min44s.txt			82,61	30,52	10,32	24,03	1	6	2,92
P10EL1_Exp20190119_07h58min37s.txt			75,40	29,83	11,53	24,95	2	6	3,14
P10EL1_Exp20190119_08h58min37s.txt			75,38	29,75	12,07	25,67	3	5,50	2,87
P10EL1_Exp20190119_09h58min37s.txt			66,33	31,96	10,38	22,77	4	5,50	3,26
P10EL1_Exp20190119_10h58min37s.txt			66,72	31,45	11,54	24,76	5	5,50	3,12
P10EL1_Exp20190119_11h58min37s.txt			61,69	32,15	13,28	26,52	6	5	4,31
P10EL1_Exp20190119_12h58min37s.txt			57,73	32,78	15,02	29,11	7	4,50	5,89
P10EL1_Exp20190119_13h58min37s.txt			58,76	32,54	15,92	30,53	8	5	7,19
P10EL1_Exp20190119_14h58min37s.txt			58,74	32,59	16,11	30,91	9	5	7,38
P10EL1_Exp20190119_15h58min37s.txt			56,70	33,00	16,51	31,94	10	4,50	8,32
P10EL1_Exp20190119_16h58min38s.txt			57,95	32,41	17,07	32,27	11	4,50	8,53
P10EL1_Exp20190119_17h58min37s.txt			57,85	32,50	16,91	31,73	12	4,50	9,70
P10EL1_Exp20190119_18h58min37s.txt			57,41	32,72	16,79	31,63	13	4,50	10,49
P10EL1_Exp20190119_19h58min37s.txt			56,54	33,11	16,60	31,34	14	5	10,95
P10EL1_Exp20190119_20h58min37s.txt			56,64	33,01	16,65	31,48	15	5	14,48

Continua na próxima página...

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P10EL1_Exp20190119_21h58min37s.txt			56,79	33,21	16,18	31,06	16	5,50	14,90
P10EL1_Exp20190119_22h58min37s.txt			57,26	33,42	14,96	30,13	17	5,50	15,04
P10EL1_Exp20190119_23h58min38s.txt			59,33	33,51	13,04	28,22	18	6	15,36
P10EL1_Exp20190120_00h58min37s.txt			60,10	33,46	12,67	27,75	19	6	16,06
P15EL2_Exp20190119_06h58min45s.txt			96,13	30,61	6,53	16,51	1	5,50	3,04
P15EL2_Exp20190119_07h58min44s.txt			95,53	28,69	7,31	18,87	2	6	3,38
P15EL2_Exp20190119_08h58min44s.txt			98,02	28,19	7,70	20,11	3	5,50	3,25
P15EL2_Exp20190119_09h58min44s.txt			94,86	29,48	7,04	18,76	4	5,50	3,47
P15EL2_Exp20190119_10h58min44s.txt			90,65	29,74	7,18	19,02	5	5,50	4,08
P15EL2_Exp20190119_11h58min44s.txt			76,40	31,03	8,67	21,66	6	5	4,12
P15EL2_Exp20190119_12h58min44s.txt			65,76	31,67	13,14	28,58	7	4,50	6,04
P15EL2_Exp20190119_13h58min44s.txt			63,94	32,14	13,50	29,61	8	5	6,44
P15EL2_Exp20190119_14h58min46s.txt			62,21	32,69	13,53	29,96	9	5	7,61
P15EL2_Exp20190119_15h58min44s.txt			57,26	33,55	13,90	30,64	10	4,50	7,38
P15EL2_Exp20190119_16h58min44s.txt			59,35	32,83	14,26	30,09	11	4,50	8,33
P15EL2_Exp20190119_17h58min44s.txt	15	9	60,89	32,49	14,14	29,23	12	4,50	9,82
P15EL2_Exp20190119_18h58min44s.txt			59,05	32,89	13,75	28,48	13	4,50	11,70
P15EL2_Exp20190119_19h58min44s.txt			28,48	32,56	13,73	28,52	14	5	11,49
P15EL2_Exp20190119_20h58min44s.txt			59,88	33,12	13,08	28,07	15	5	15,10
P15EL2_Exp20190119_21h58min44s.txt			61,14	33,03	13,01	27,97	16	5,50	15,04
P15EL2_Exp20190119_22h58min46s.txt			60,79	33,13	12,79	27,57	17	6	14,70
P15EL2_Exp20190119_23h58min44s.txt			62,53	33,27	12,11	27,06	18	6,50	14,30
P15EL2_Exp20190120_00h58min44s.txt			63,67	33,07	11,66	26,81	19	6	14,04
P05EL1_Exp20190127_06h55min46s.txt			110,58	36,12	7,40	17,85	1	6	3,19
P05EL1_Exp20190127_07h55min46s.txt			108,54	32,71	7,86	20,31	2	6	3,65

Continua na próxima página . . .

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P05EL1_Exp20190127_08h55min46s.txt			106,00	32,45	8,06	20,75	3	5,50	2,99
P05EL1_Exp20190127_09h55min46s.txt			97,07	32,79	7,92	20,22	4	5,50	3,61
P05EL1_Exp20190127_10h55min46s.txt			104,00	32,67	8,87	22,84	5	6	3,25
P05EL1_Exp20190127_11h55min46s.txt			87,33	32,49	12,16	27,93	6	5	4,52
P05EL1_Exp20190127_12h55min46s.txt			83,51	33,19	14,10	31,37	7	5	6,32
P05EL1_Exp20190127_13h55min46s.txt			80,88	33,34	14,37	32,33	8	5	7,38
P05EL1_Exp20190127_14h55min46s.txt			74,18	33,62	14,27	31,22	9	5	8,24
P05EL1_Exp20190127_15h55min46s.txt			67,13	34,56	13,58	29,73	10	5	8,61
P05EL1_Exp20190127_16h55min46s.txt			69,50	34,05	14,21	30,33	11	5	9,42
P05EL1_Exp20190127_17h55min46s.txt	5	10	67,17	34,43	14,13	30,25	12	5	10,66
P05EL1_Exp20190127_18h55min46s.txt			66,65	34,74	14,00	30,09	13	5	11,16
P05EL1_Exp20190127_19h55min46s.txt			65,46	34,98	13,77	29,87	14	5	13,86
P05EL1_Exp20190127_20h55min46s.txt			71,44	34,80	13,64	29,96	15	5,50	14,32
P05EL1_Exp20190127_21h55min46s.txt			73,48	34,73	11,94	27,82	16	6	15,08
P05EL1_Exp20190127_22h55min46s.txt			76,02	34,15	11,90	27,72	17	7	16,16
P05EL1_Exp20190127_23h55min46s.txt			76,31	33,71	11,55	26,95	18	7	15,68
P05EL1_Exp20190128_00h55min46s.txt			81,93	32,74	10,84	25,79	19	6,50	15,28
P10EL2_Exp20190127_06h55min57s.txt			86,42	30,27	8,15	20,17	1	6	3,51
P10EL2_Exp20190127_07h55min57s.txt			85,81	29,03	9,02	21,69	2	5,50	4,23
P10EL2_Exp20190127_08h55min57s.txt			86,44	28,86	9,40	22,68	3	5,50	3,57
P10EL2_Exp20190127_09h55min57s.txt			80,48	28,88	9,69	23,02	4	5,50	3,65
P10EL2_Exp20190127_10h55min58s.txt			73,31	30,14	10,25	23,45	5	6	4,15
P10EL2_Exp20190127_11h55min59s.txt			59,11	31,47	13,29	27,26	6	5	4,17
P10EL2_Exp20190127_12h55min57s.txt			58,91	32,08	14,62	29,97	7	5	6,94
P10EL2_Exp20190127_13h55min57s.txt			57,15	32,57	14,68	30,01	8	5	7,36

Continua na próxima página...

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P10EL2_Exp20190127_14h55min57s.txt			56,64	32,62	14,73	30,05	9	5	8,79
P10EL2_Exp20190127_15h55min57s.txt			55,81	32,61	14,91	29,92	10	5	9,88
P10EL2_Exp20190127_16h55min57s.txt			55,63	32,82	14,98	29,66	11	5	11,66
P10EL2_Exp20190127_17h55min57s.txt	10	11	55,47	32,69	15,23	29,98	12	5	11,46
P10EL2_Exp20190127_18h55min57s.txt			54,91	32,90	15,05	29,82	13	5	14
P10EL2_Exp20190127_19h55min57s.txt			55,61	33,01	14,65	29,39	14	5	14,42
P10EL2_Exp20190127_20h55min57s.txt			57,08	33,18	12,83	28,14	15	7	14,46
P10EL2_Exp20190127_21h55min57s.txt			59,67	32,48	11,53	26,33	16	7	13,02
P10EL2_Exp20190127_22h55min58s.txt			60,62	32,19	11,51	25,91	17	6,50	14,52
P10EL2_Exp20190127_23h55min57s.txt			60,22	32,20	11,51	25,81	18	7	14,36
P10EL2_Exp20190128_00h55min56s.txt			60,56	32,18	11,58	25,89	19	6,50	14,34
P15EL3_Exp20190127_06h56min07s.txt			80,15	30,27	8,60	21,01	1	6	3,79
P15EL3_Exp20190127_07h56min06s.txt			73,30	29,67	9,82	22,48	2	5,50	3,78
P15EL3_Exp20190127_08h56min06s.txt			68,82	29,84	10,38	23,17	3	5,50	3,59
P15EL3_Exp20190127_09h56min06s.txt			66,62	29,60	11,01	24,02	4	5,50	3,95
P15EL3_Exp20190127_10h56min07s.txt			66,16	30,27	11,91	25,36	5	6	4,57
P15EL3_Exp20190127_11h56min07s.txt			58,68	30,70	14,78	28,85	6	5	6,28
P15EL3_Exp20190127_12h56min07s.txt			57,17	31,61	16,07	31,14	7	5	7,51
P15EL3_Exp20190127_13h56min07s.txt			56,54	31,75	16,53	31,98	8	5	8,24
P15EL3_Exp20190127_14h56min07s.txt			56,12	31,79	16,96	32,23	9	5	8,38
P15EL3_Exp20190127_15h56min07s.txt	15	12	55,40	32,08	17,08	32,26	10	5	9,56
P15EL3_Exp20190127_16h56min07s.txt			55,84	32,03	17,32	32,44	11	5	10,66
P15EL3_Exp20190127_17h56min07s.txt			54,80	32,22	17,20	32,29	12	5	10,99
P15EL3_Exp20190127_18h56min07s.txt			54,61	32,38	16,63	31,90	13	5	13,24
P15EL3_Exp20190127_19h56min07s.txt			55,10	32,62	15,44	30,82	14	5,50	13,52

Continua na próxima página . . .

Tabela H.1 – *Continua da tabela anterior*

Arquivo	Concentração de Inóculo (%)	Número do Experimento	R_s (Ω)	R_{cy} (Ω)	C_m (μF)	C_{dl} (μF)	Tempo	pH	Células Totais ($\times 10^9 CFU/mL$)
P15EL3_Exp20190127_20h56min07s.txt			58,11	32,13	13,33	28,98	15	7	13,48
P15EL3_Exp20190127_21h56min07s.txt			60,90	31,33	12,54	27,81	16	7	13,40
P15EL3_Exp20190127_22h56min06s.txt			59,40	31,64	12,40	27,37	17	6,50	13,44
P15EL3_Exp20190127_23h56min06s.txt			61,53	31,13	12,91	28,08	18	7	13,70
P15EL3_Exp20190128_00h56min06s.txt			59,44	31,68	12,73	27,54	19	6,50	14,68

Página intencionalmente em Branco

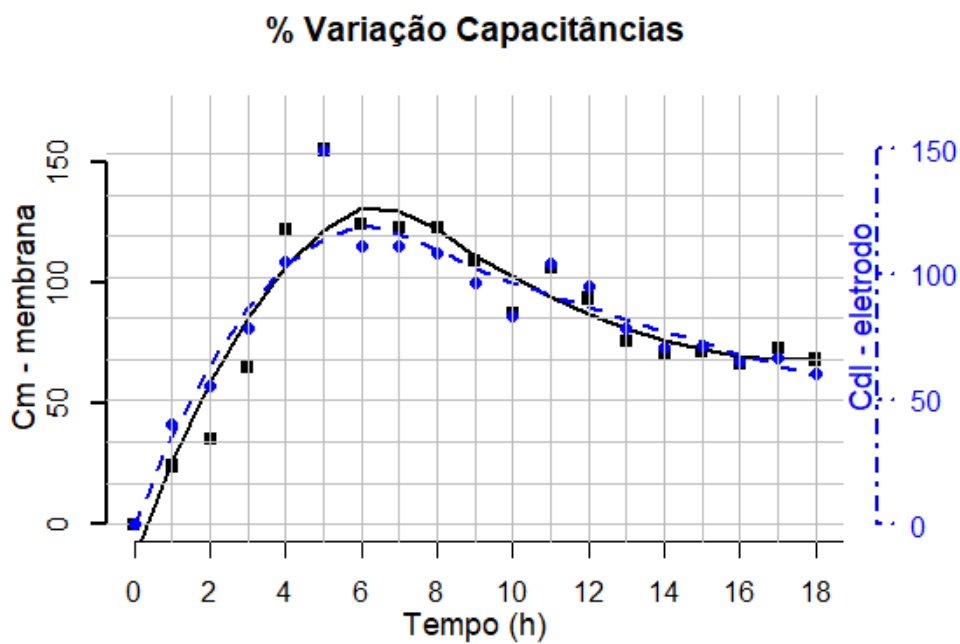
Apêndice I

Figuras do experimento conduzido com *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti) não incluídas no texto

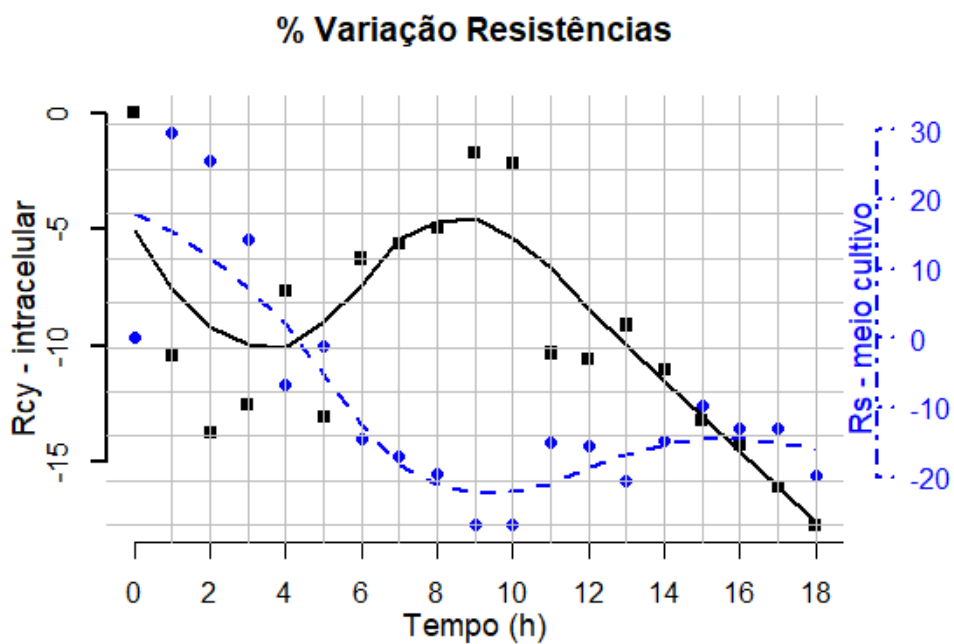
I.1 Curvas utilizando o densiCHECK[®] – método de McFarland

No gráfico superior de cada figura (letra *a*), tem-se a curva normalizada da variação das capacitâncias da membrana celular (C_m) (■ e *linha contínua*) e de eletrodo (C_{dl}) (● e *linha tracejada*).

No gráfico inferior de cada figura (letra *b*), tem-se a curva normalizada da variação das resistências do meio de cultivo (R_{cy}) (■ e *linha contínua*) e intracelular (R_s) (● e *linha tracejada*).

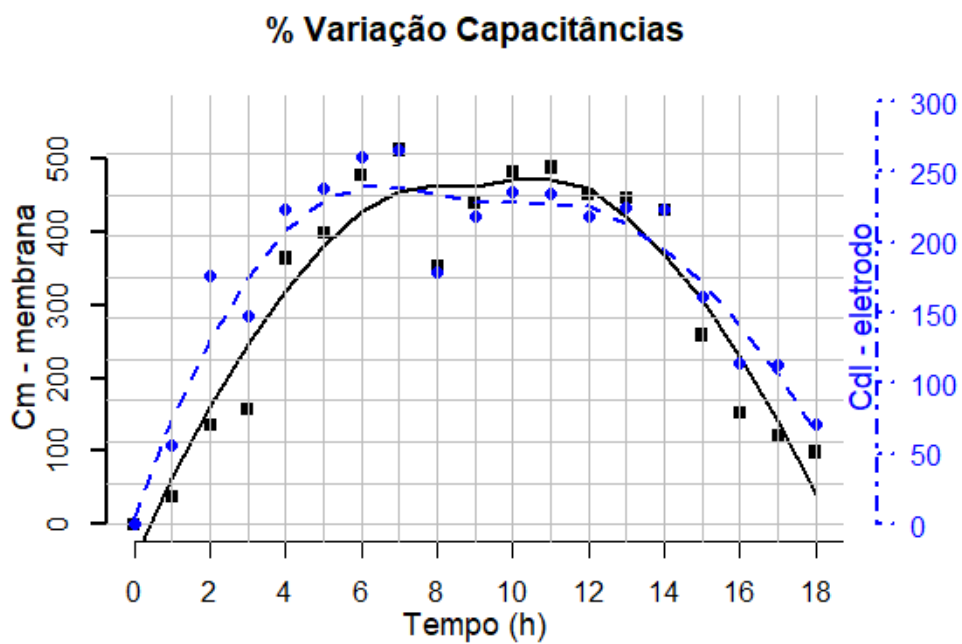


(a)

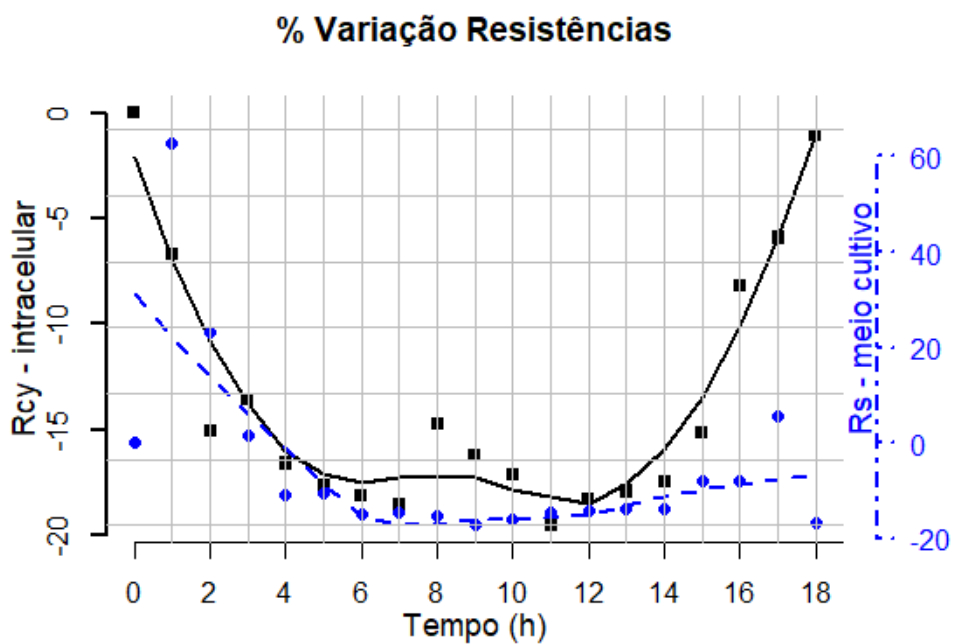


(b)

Figura I.1 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 01** com **Bti**.

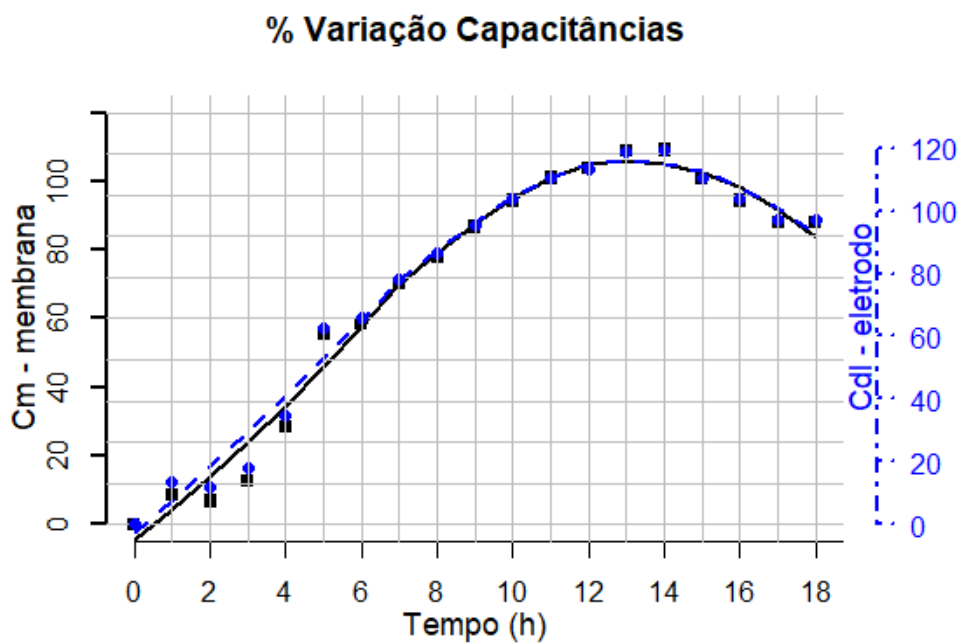


(a)

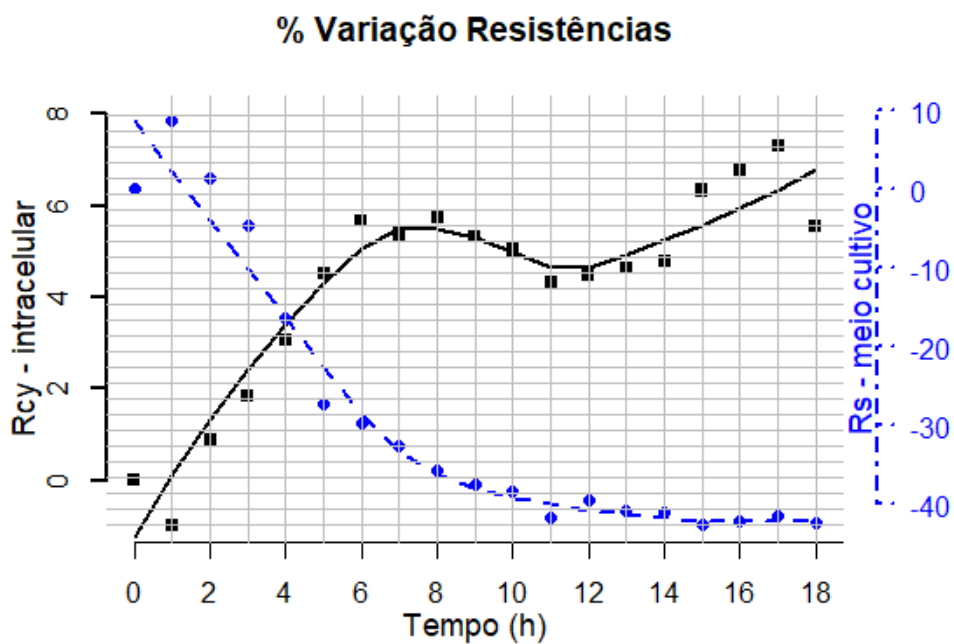


(b)

Figura I.2 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 02** com **Bti**.

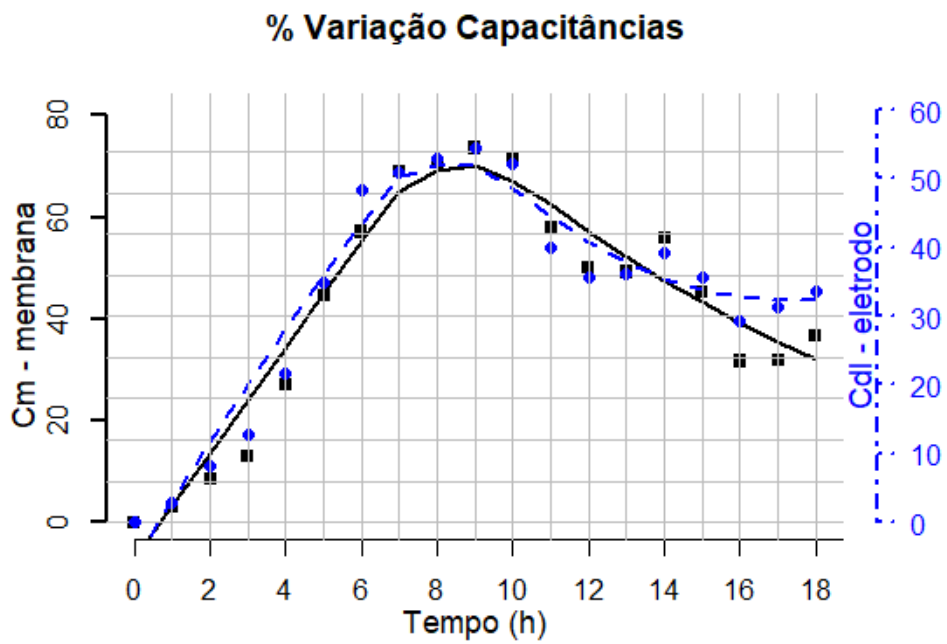


(a)

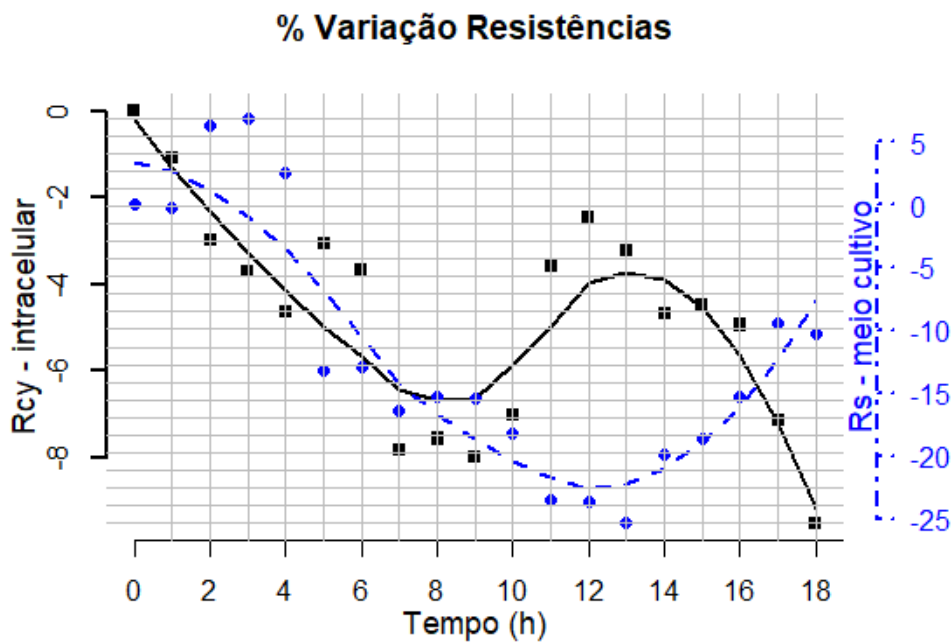


(b)

Figura I.3 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 03** com **Bti**.

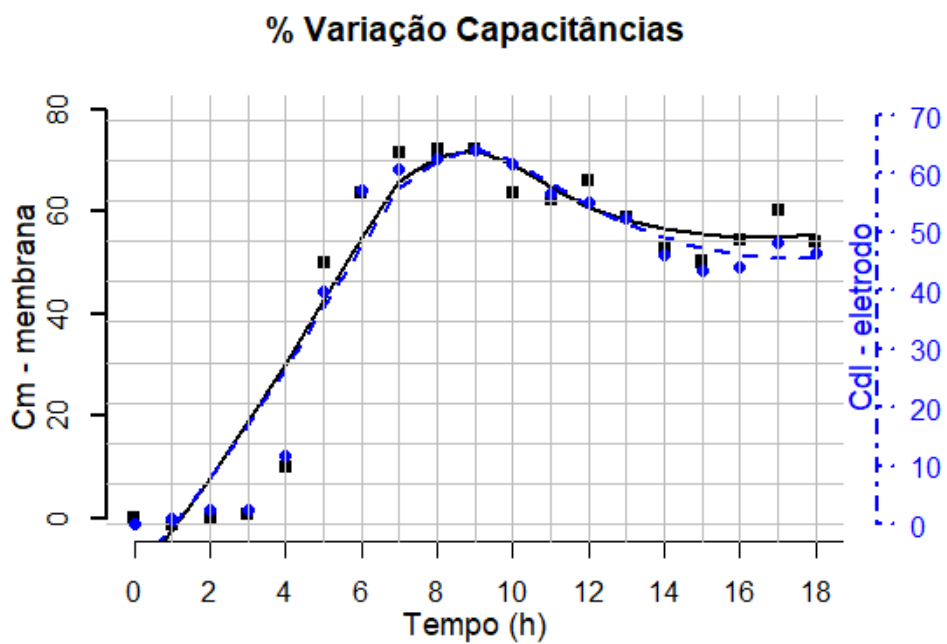


(a)

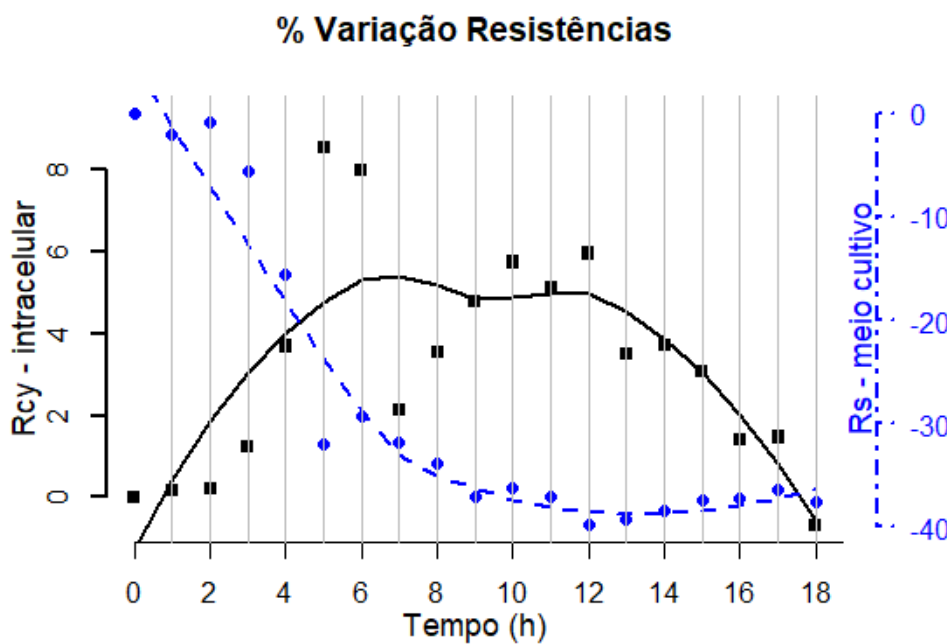


(b)

Figura I.4 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 04** com **Bti**.

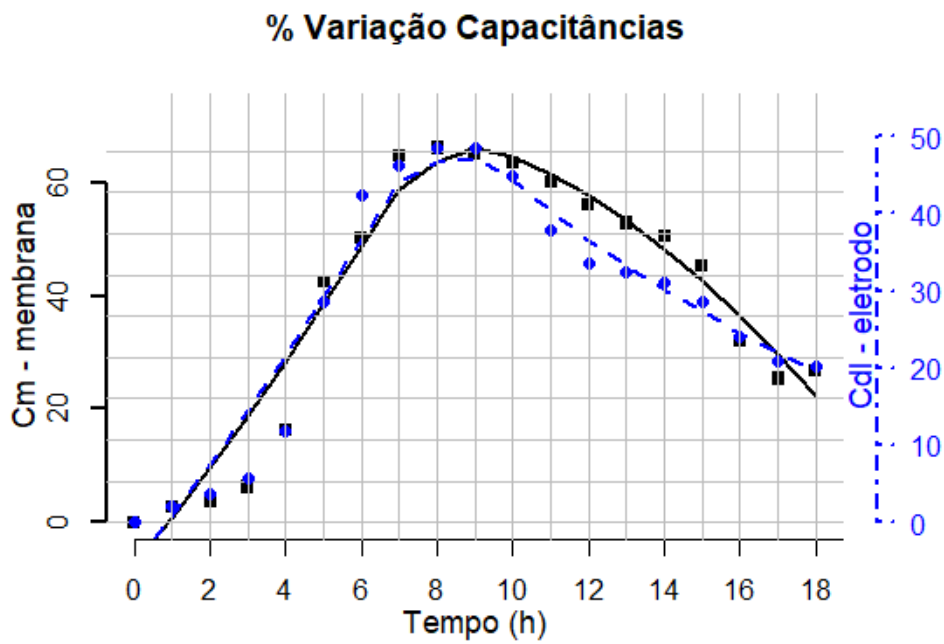


(a)

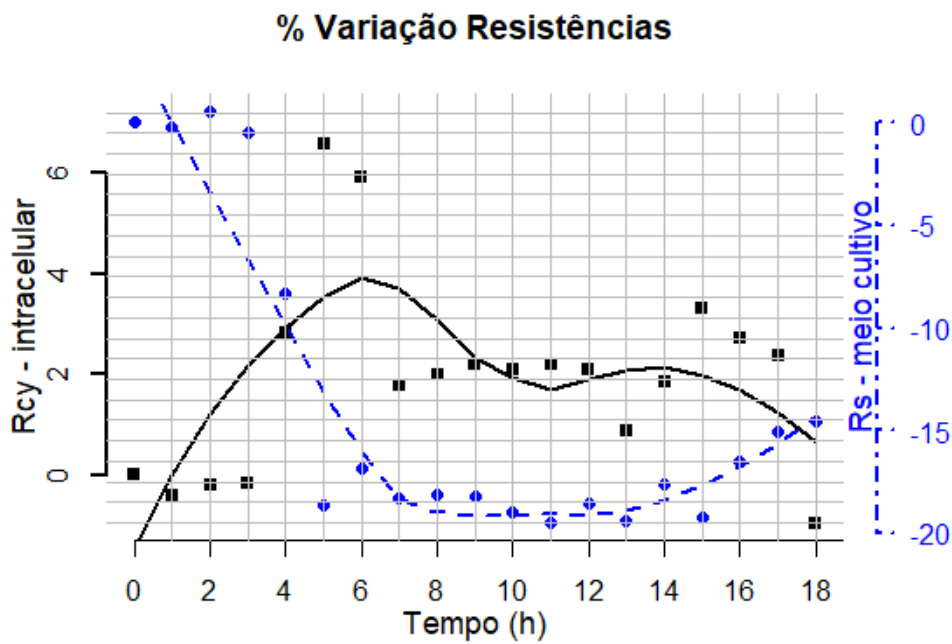


(b)

Figura I.5 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 05** com **Bti**.

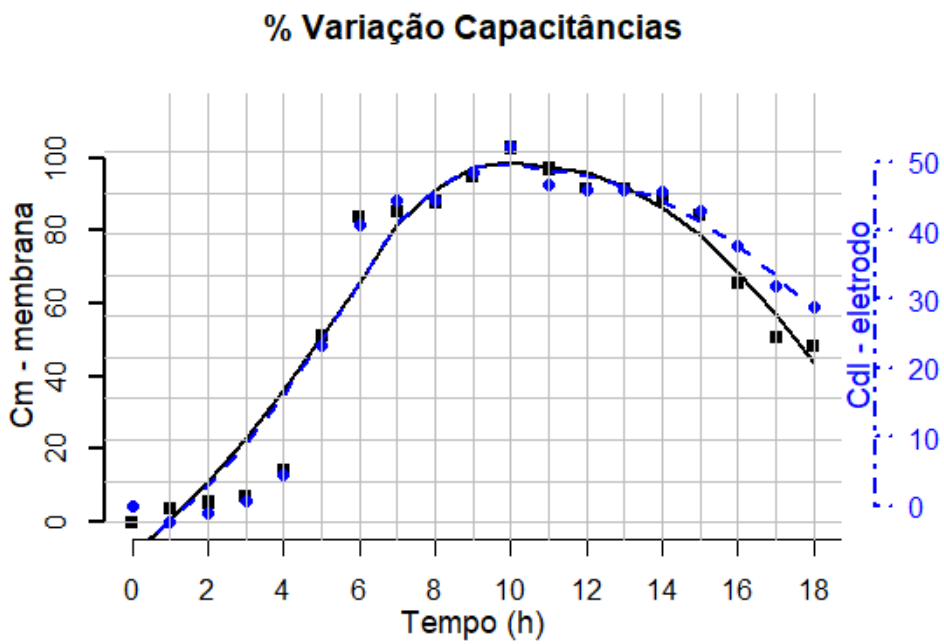


(a)

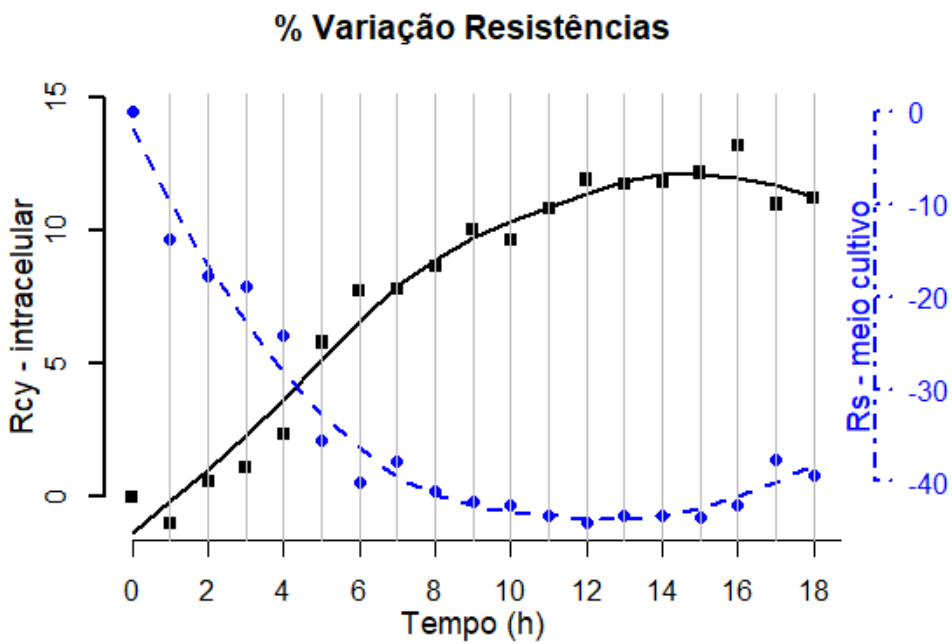


(b)

Figura I.6 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 06** com **Bti**.

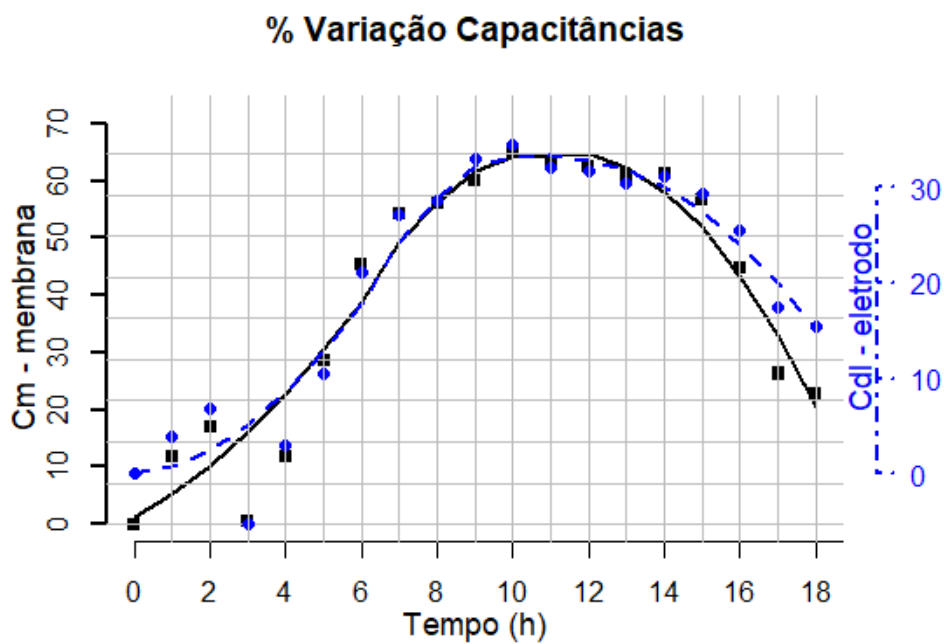


(a)

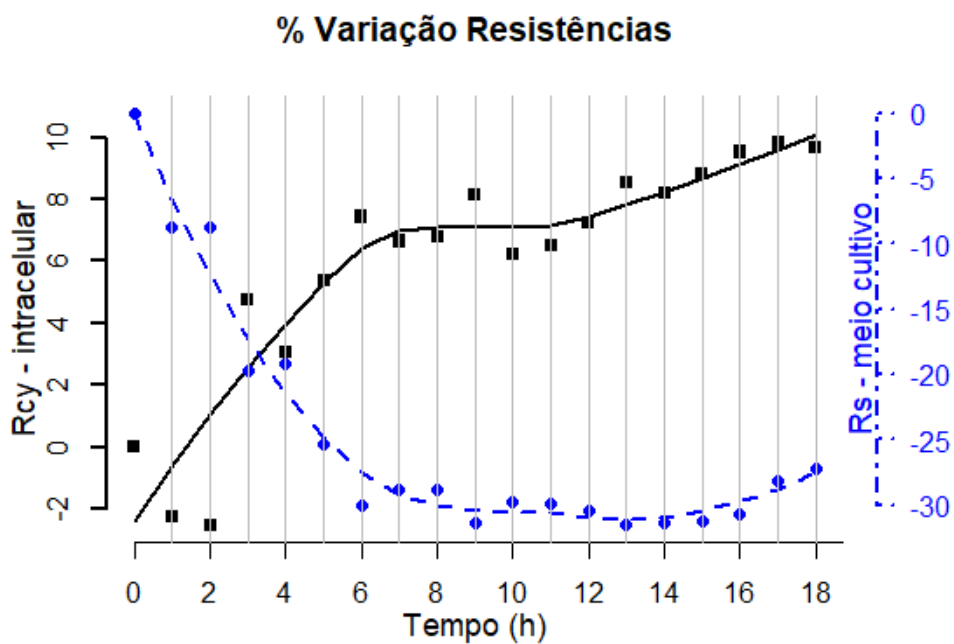


(b)

Figura I.7 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 07** com **Bti**.

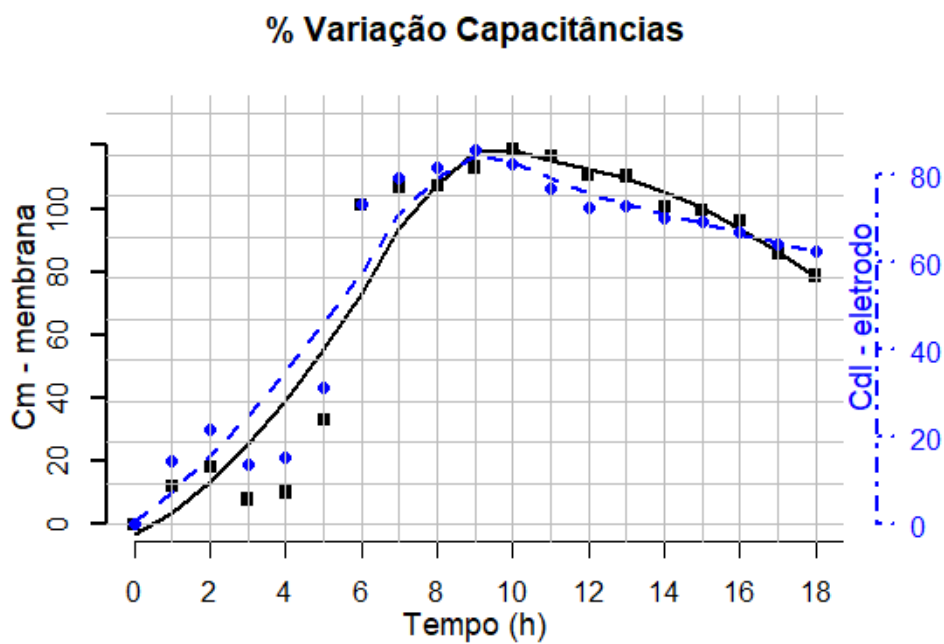


(a)

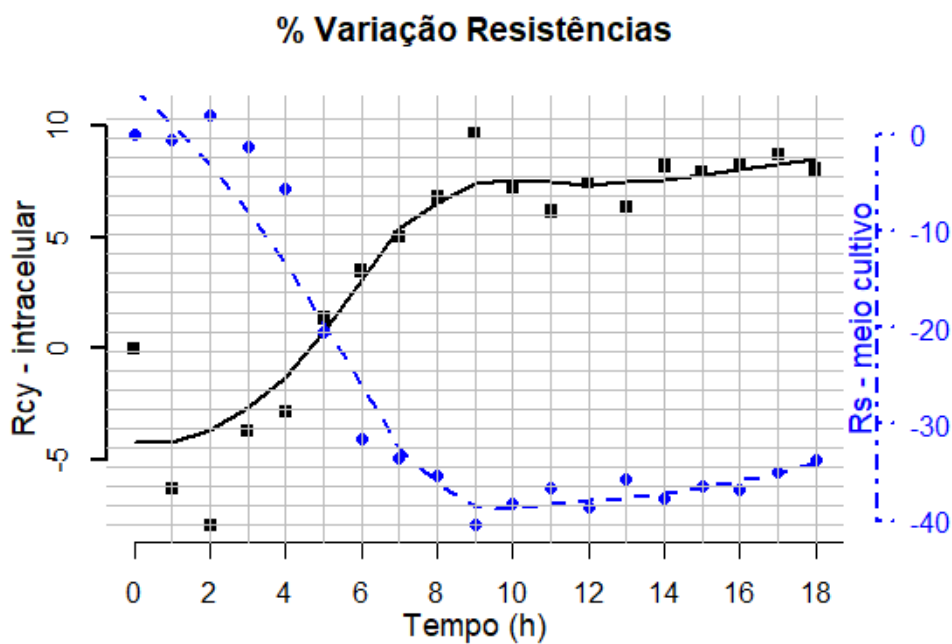


(b)

Figura I.8 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 08** com **Bti**.

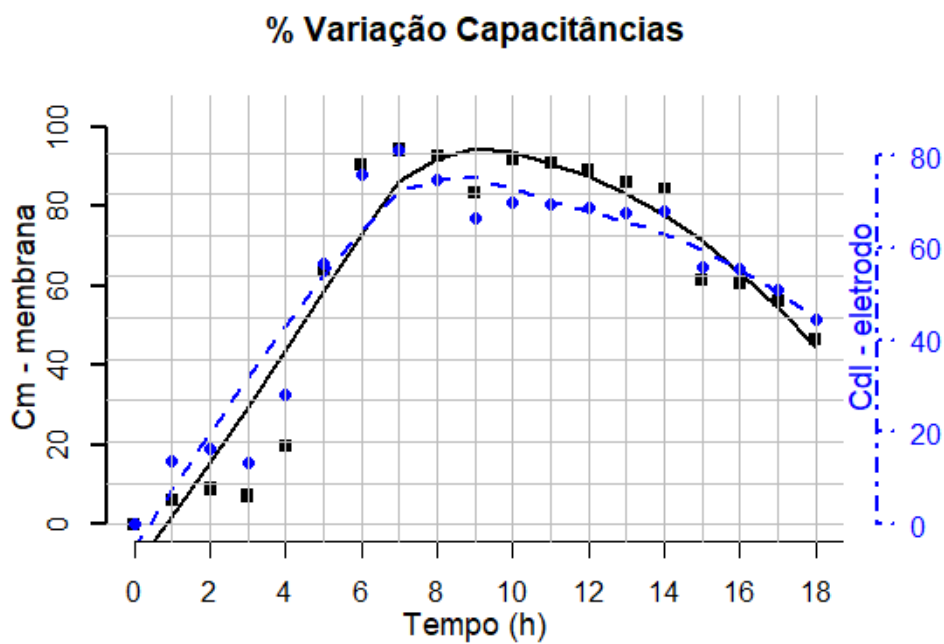


(a)

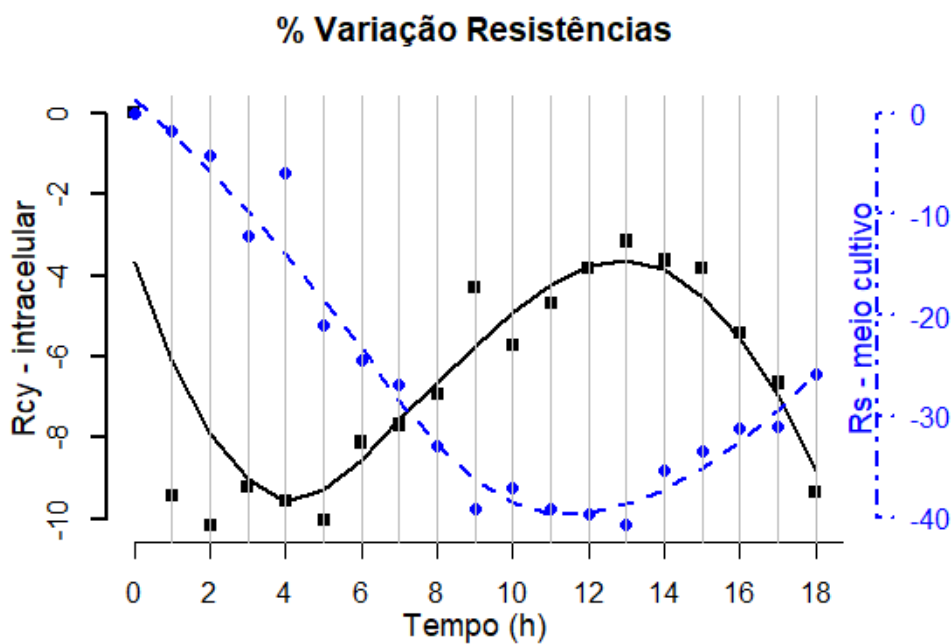


(b)

Figura I.9 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 09** com **Bti**.

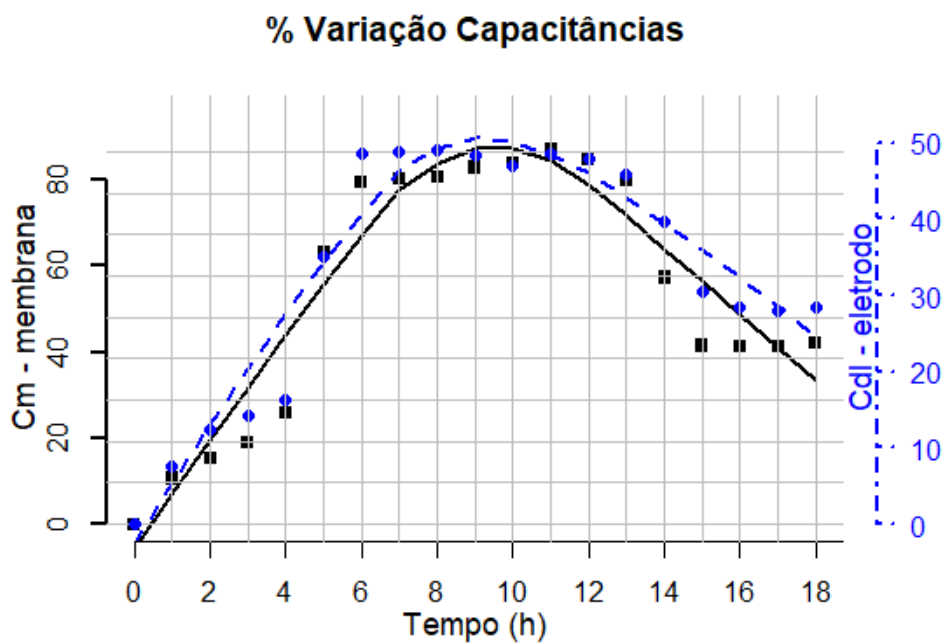


(a)

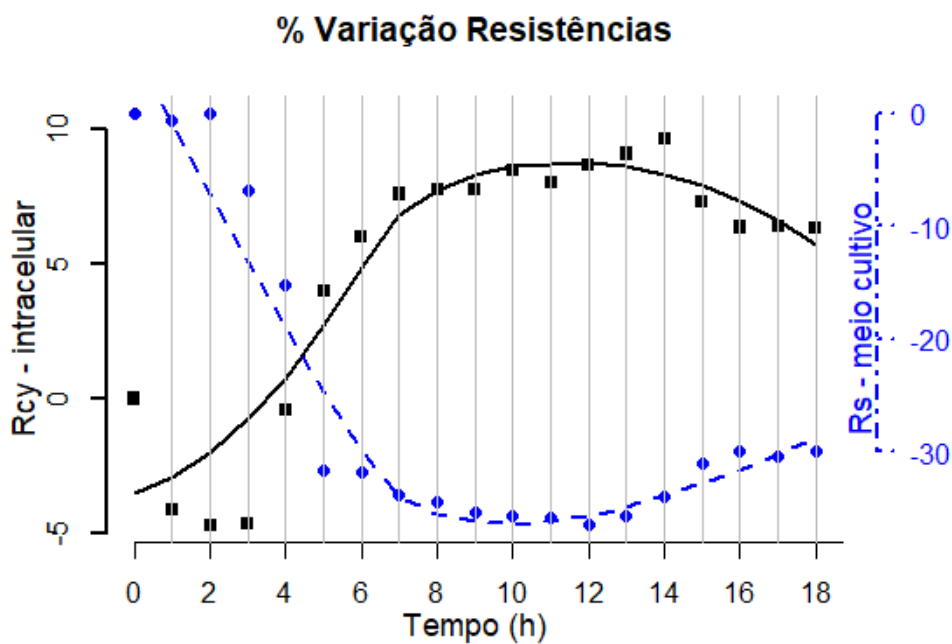


(b)

Figura I.10 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 10** com **Bti**.

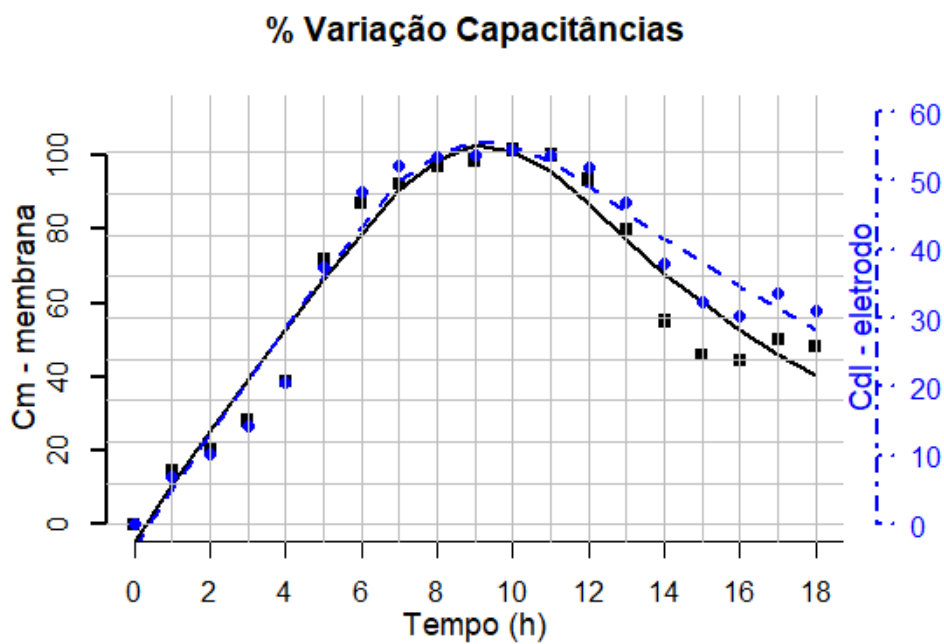


(a)

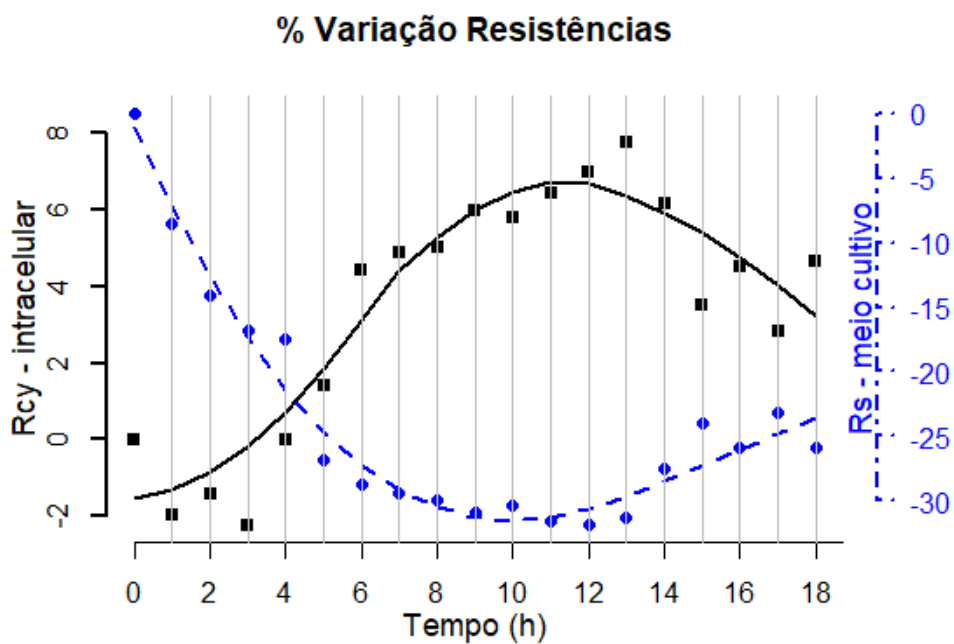


(b)

Figura I.11 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 11** com **Bti**.



(a)



(b)

Figura I.12 – (a) variação das capacitâncias de membrana C_m e de eletrodo C_{dl} , (b) variação das resistências do meio de cultivo R_s e intracelular R_{cy} do **experimento 12** com **Bti**.

I.2 Curvas utilizando a demanda de oxigênio (OUR)

No gráfico superior de cada figura, o sinal $+$ e *linha tracejada* indicam as variações de C_m e seu ajuste, respectivamente. No gráfico inferior de cada figura, compara-se o total de células (CT) experimentais medido pelo método de McFarland e seu ajuste (sinal \blacksquare e *linha contínua*) com o total de células estimadas pelo método proposto (Equação 4.8) e seu ajuste (\bullet e *linha pontilhada*, respectivamente).

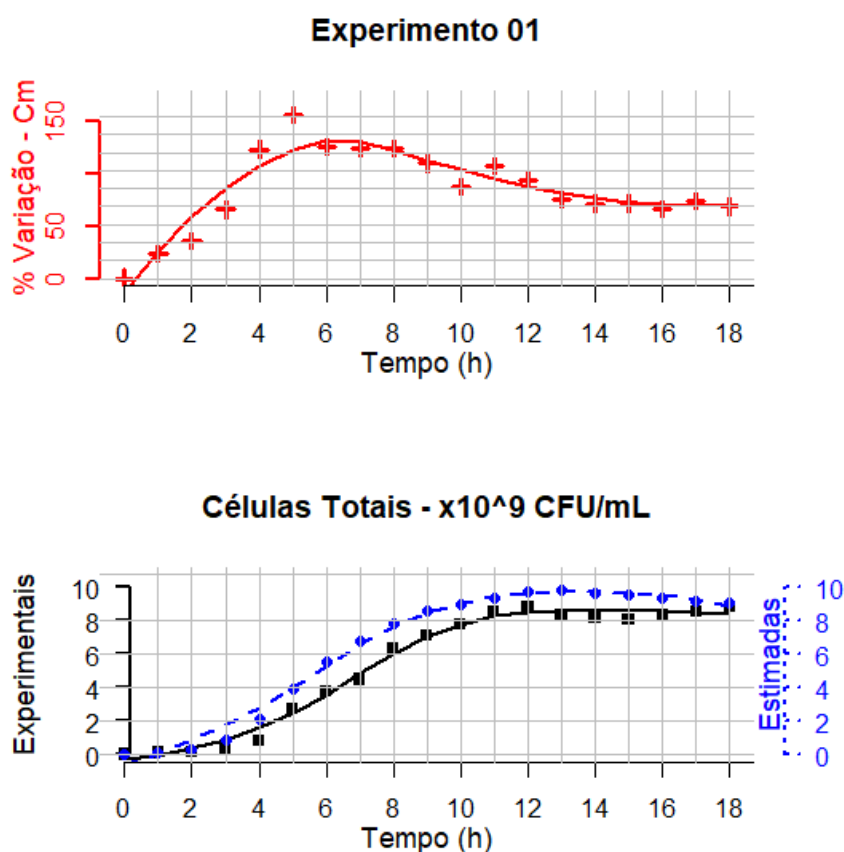


Figura I.13 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 01** com **Bti**.

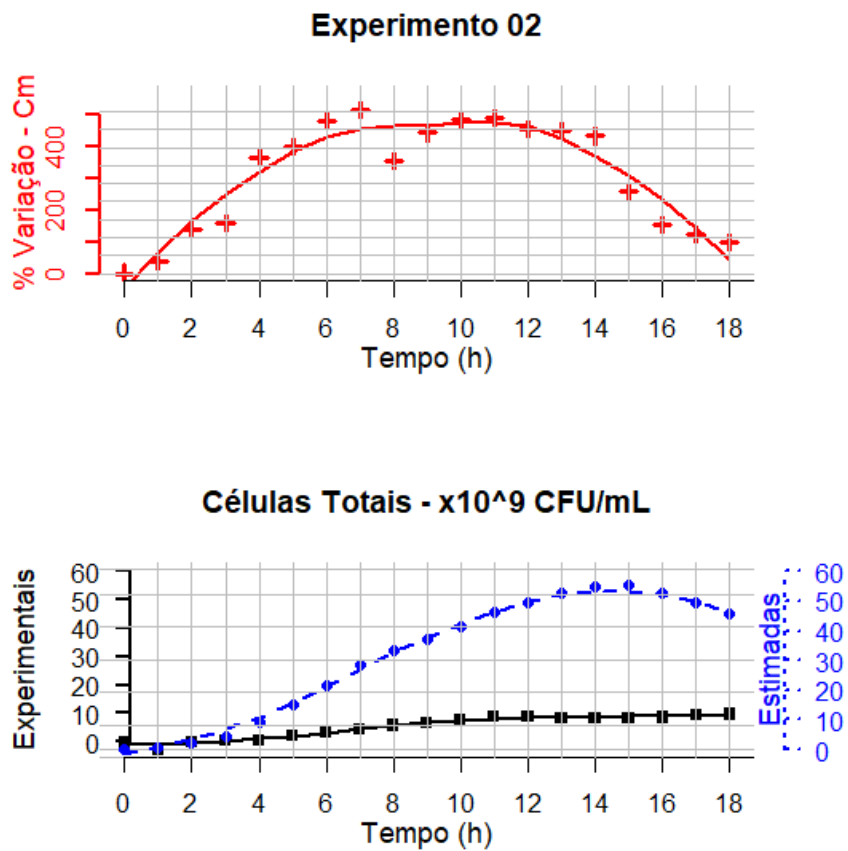


Figura I.14 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 02** com **Bti**.

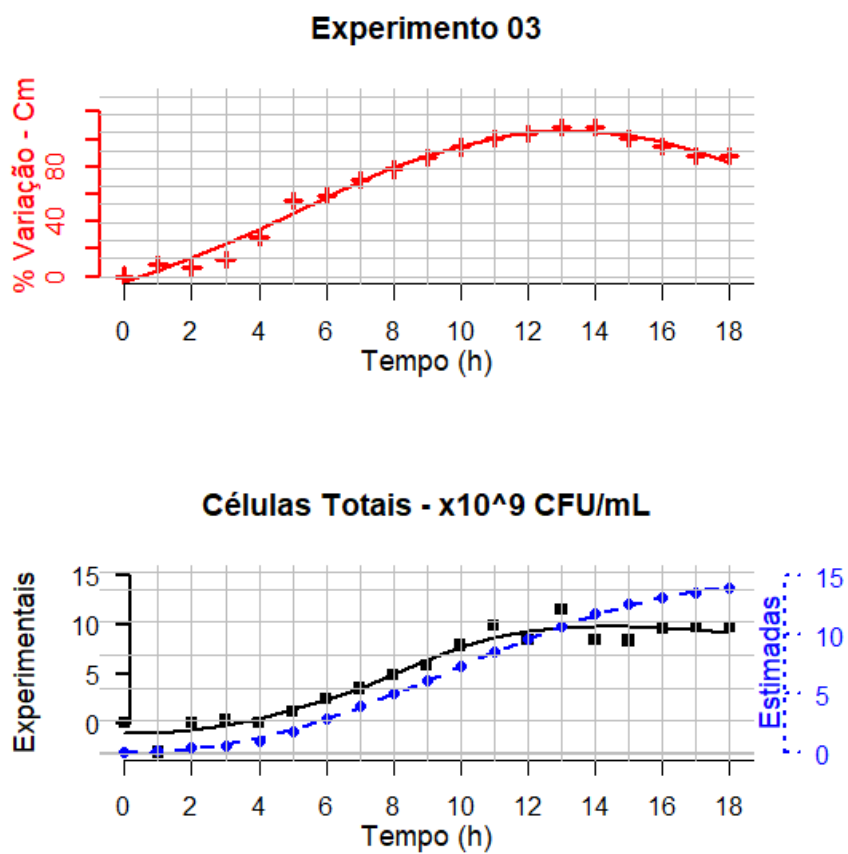


Figura I.15 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 03** com **Bti**.

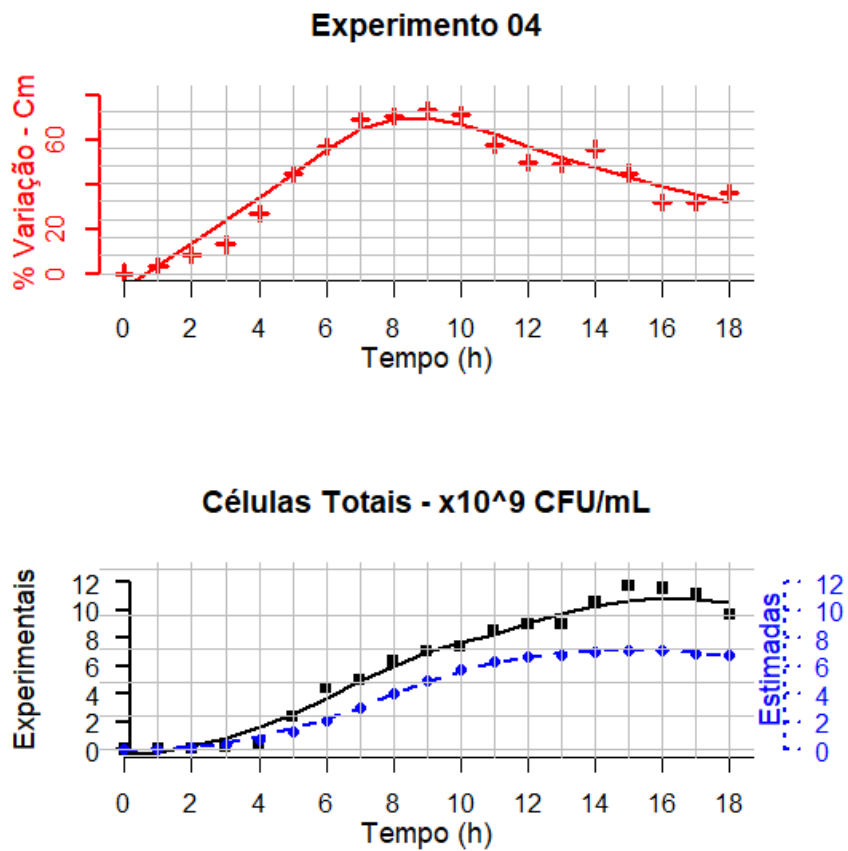


Figura I.16 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 04** com **Bti**.

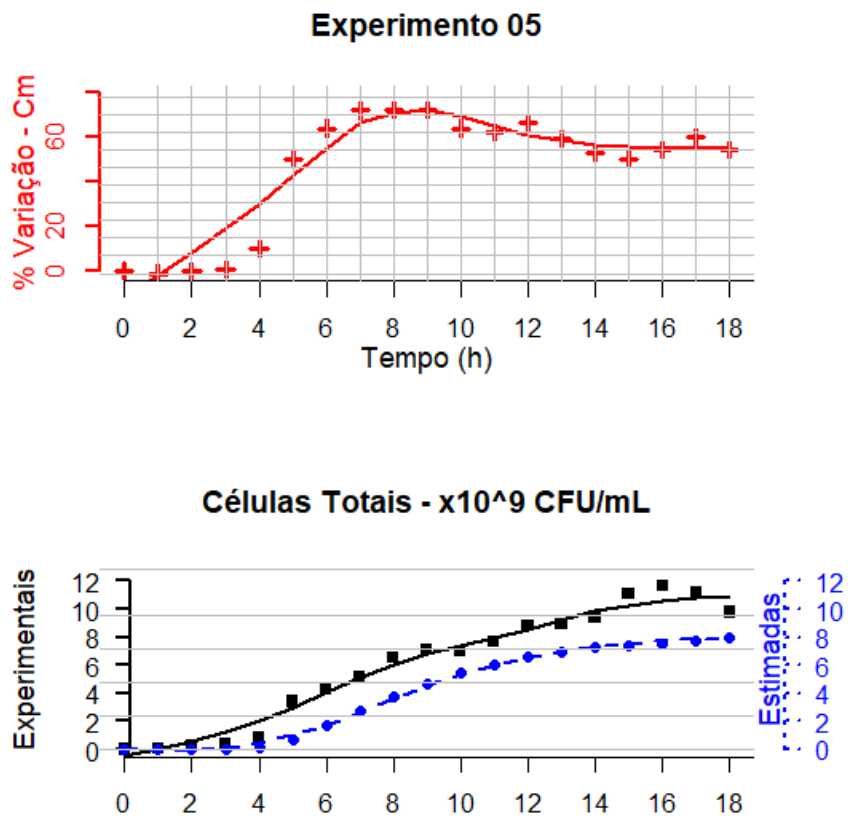


Figura I.17 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 05** com **Bti**.

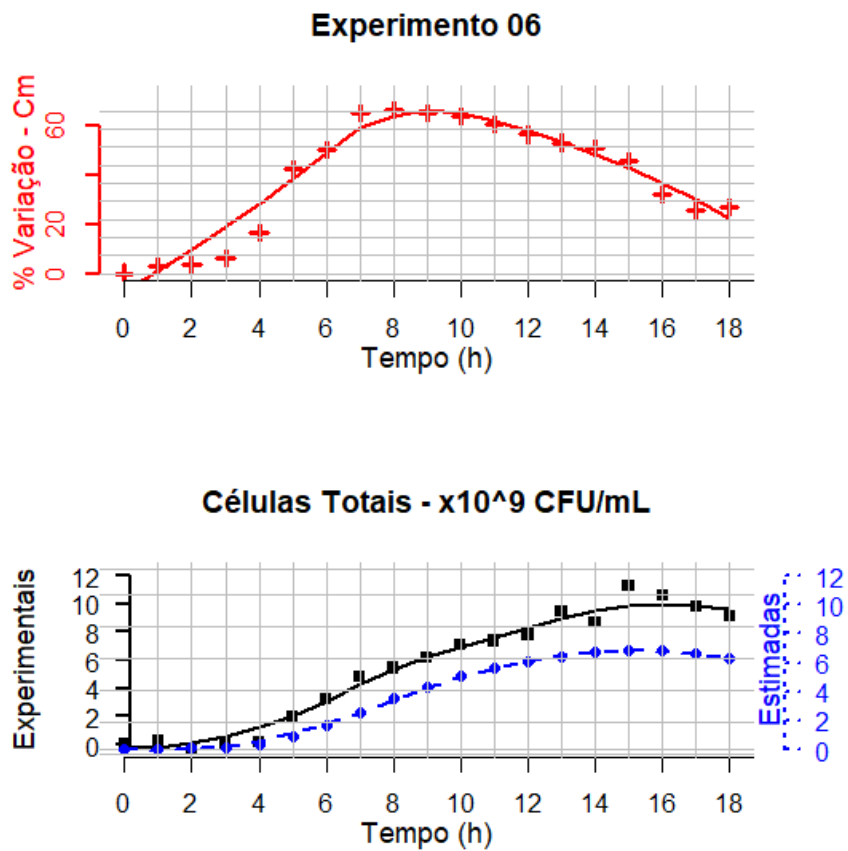


Figura I.18 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 06** com **Bti**.

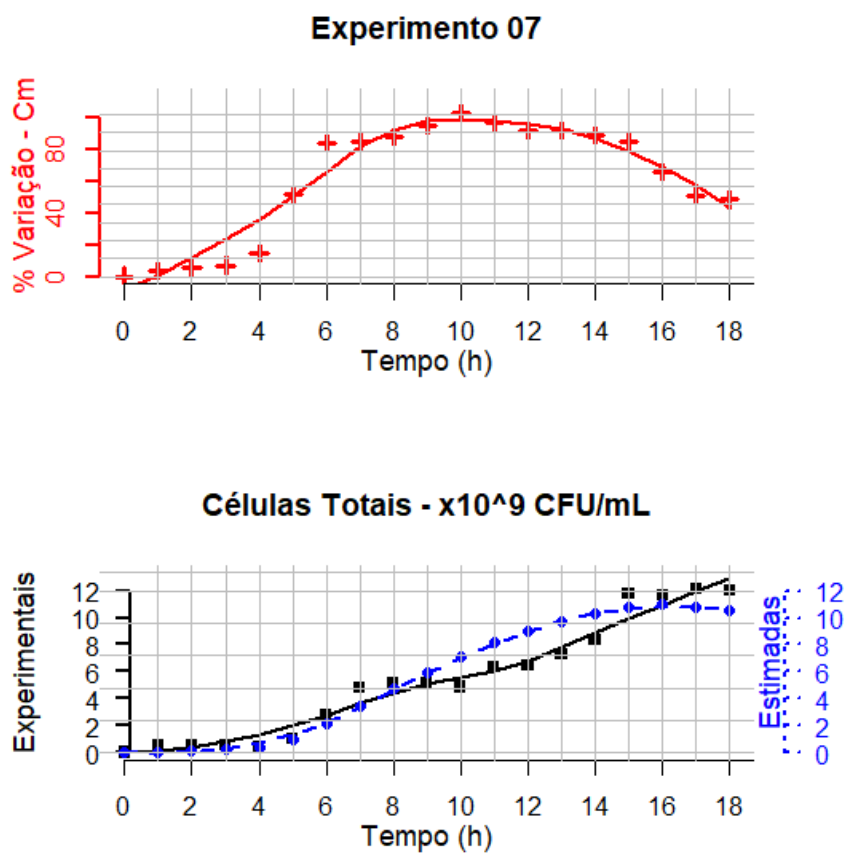


Figura I.19 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 07** com **Bti**.

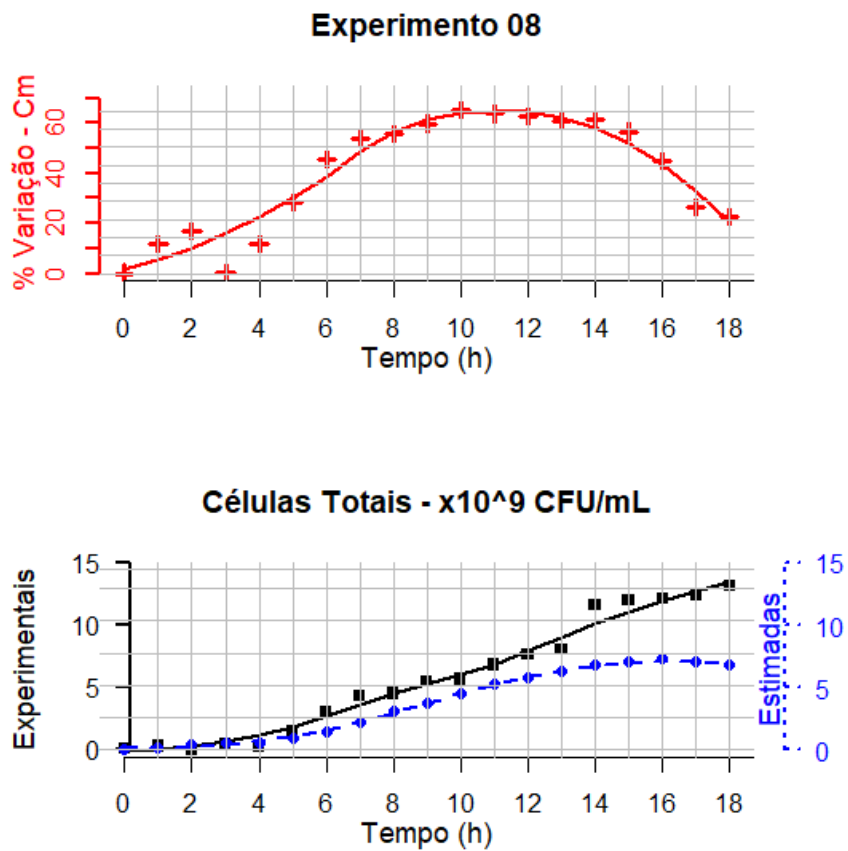


Figura I.20 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 08** com **Bti**.

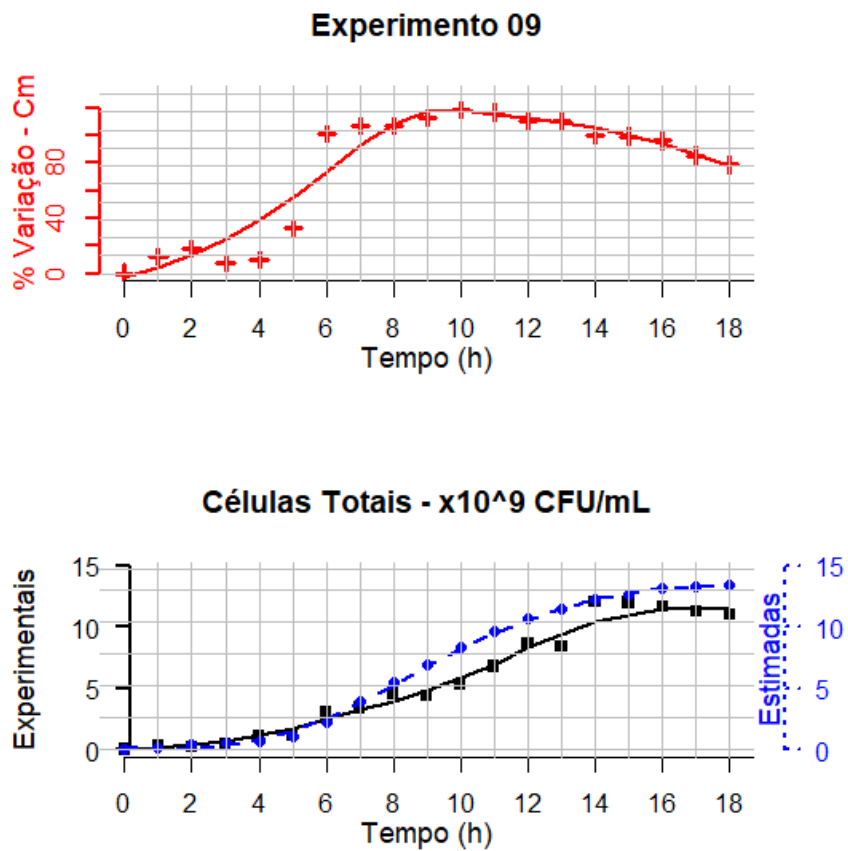


Figura I.21 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 09** com **Bti**.

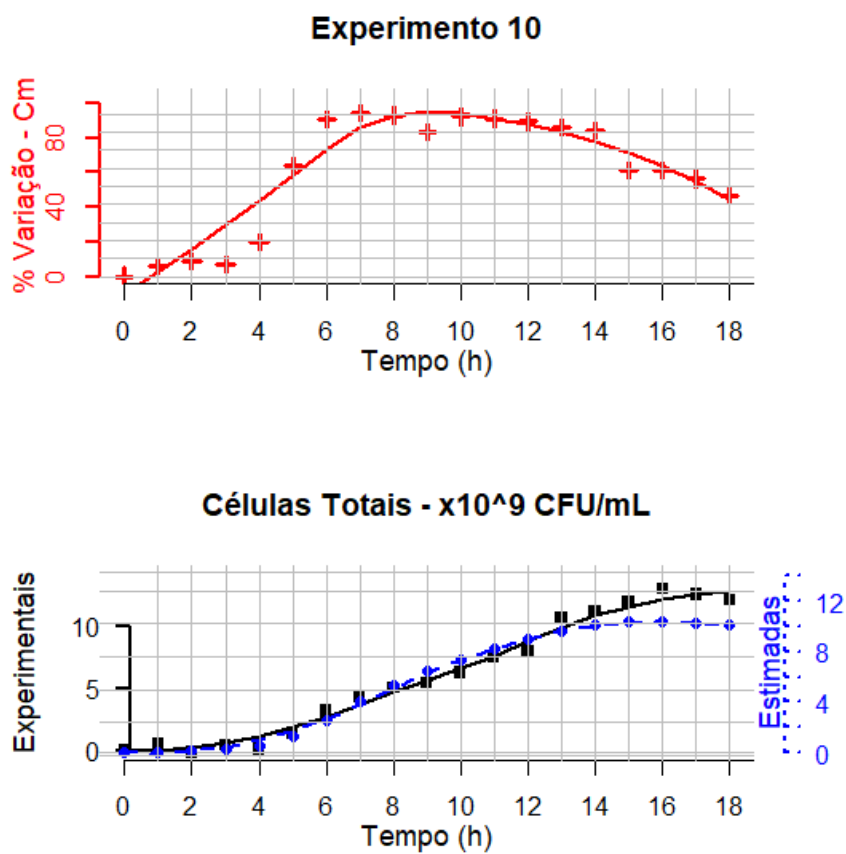


Figura I.22 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 10** com **Bti**.

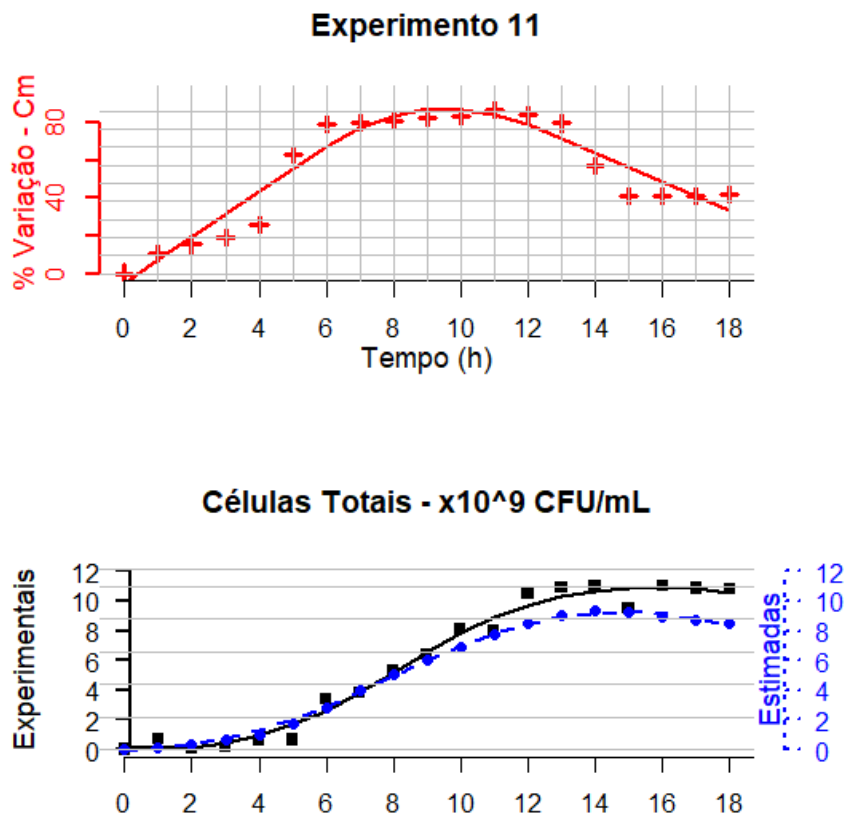


Figura I.23 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 11** com **Bti**.

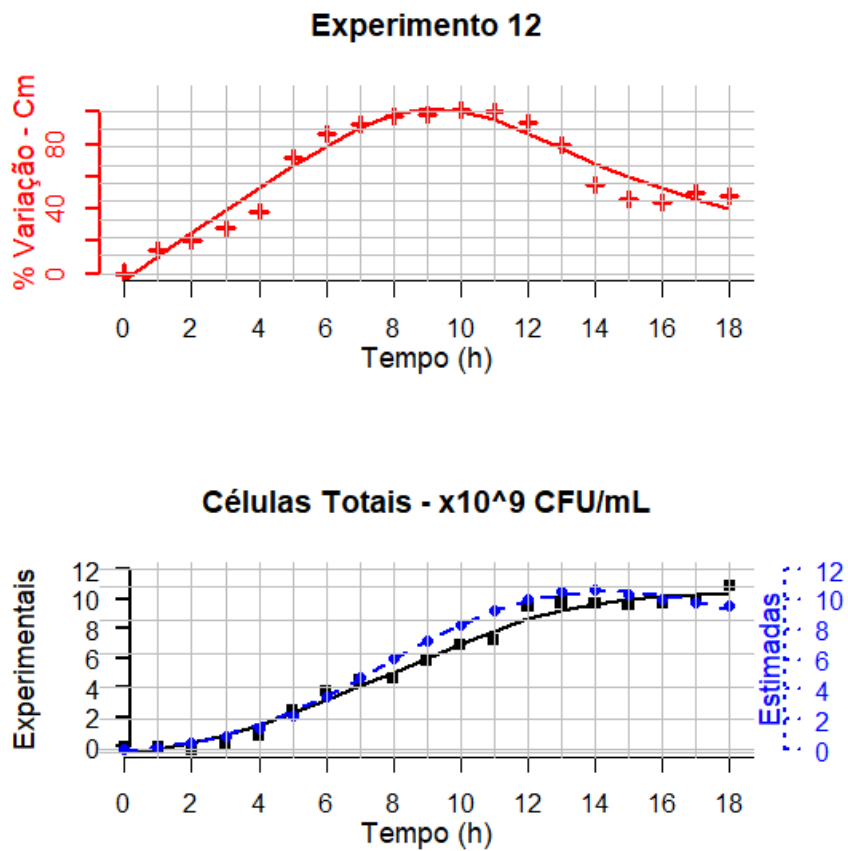


Figura I.24 – Série temporal da capacitância de membrana (C_m) e das células totais (experimentais e estimadas) para o **experimento 12** com **Bti**.

Página intencionalmente em Branco

Apêndice J

Método de Bland-Altman para os experimentos conduzidos com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e com a bactéria *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* (Bti)

J.1 Curva da Etapa 01 - Viabilidade do BIS-STEP

No gráfico apresentado na Figura J.1, utilizando a avaliação de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN [1986]] se obteve a comparação dos métodos analítico e de bioimpedância, respectivamente os métodos da câmara de Neubauer e do BIS-STEP, utilizando a regressão linear multivariada para células totais, onde foram utilizados todos os dados dos inóculos de 0,1 g/L e 0,5 g/L com o viés em preto (linha contínua) foi de 43,86%, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão. O eixo y da Figura J.1 representa o percentual da razão da diferença entre os métodos pela média dessa diferença.

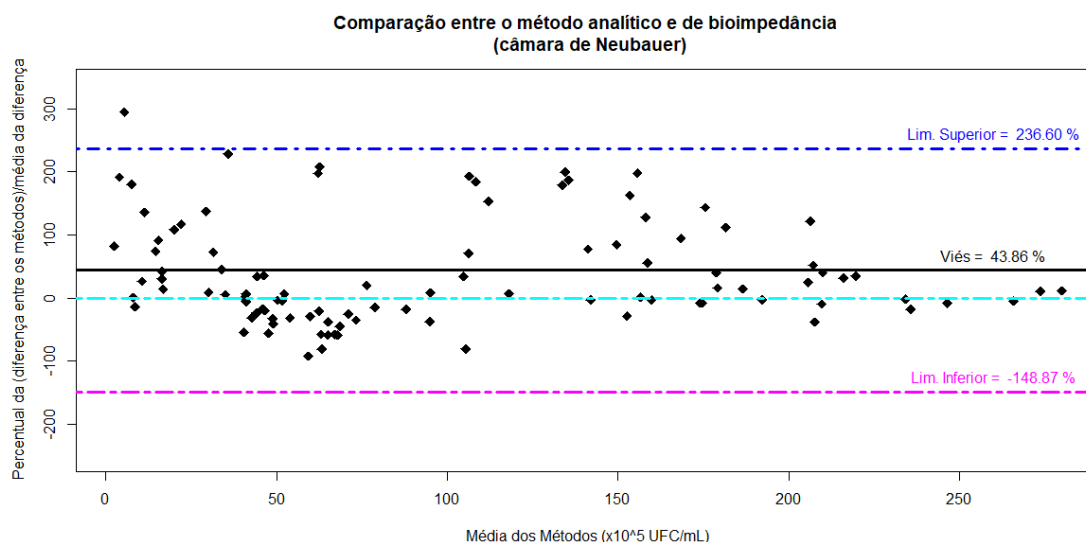


Figura J.1 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) utilizando a regressão linear multivariada do experimento com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 43,85%, onde o eixo y representa o percentual da razão da diferença entre os métodos pela média dessa diferença.

J.2 Curva da Etapa 02

J.2.1 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – Bti

Nos gráficos apresentados a partir da Figura J.2, utilizando a avaliação de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN [1986]] se obteve a comparação dos métodos analítico e de bioimpedância, respectivamente os métodos de McFarland e do BIS-STEP para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi expresso em percentual da razão da diferença entre os métodos pela média dessa diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

Na Tabela J.1 encontram-se os vieses determinados pelo método Bland-Altman [BLAND e ALTMAN [1986]] para *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* – Bti.

Tabela J.1 – Determinação das médias pelo método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN [1986]] para **Bti**.

Arquivo	Concentração de inóculo (%)	número do experimento	Bland-Altman Viés (%)
Bti20181219	5	1	-24,40
Bti20181219	10	2	-121,61
Bti20181219	15	3	-35,48
Bti20190111	5	4	20,81
Bti20190111	10	5	79,91
Bti20190111	15	6	28,72
Bti20190119	5	7	18,54
Bti20190119	10	8	15,33
Bti20190119	15	9	-9,03
Bti20190127	05	10	4,57
Bti20190127	10	11	-3,95
Bti20190127	15	12	-29,46

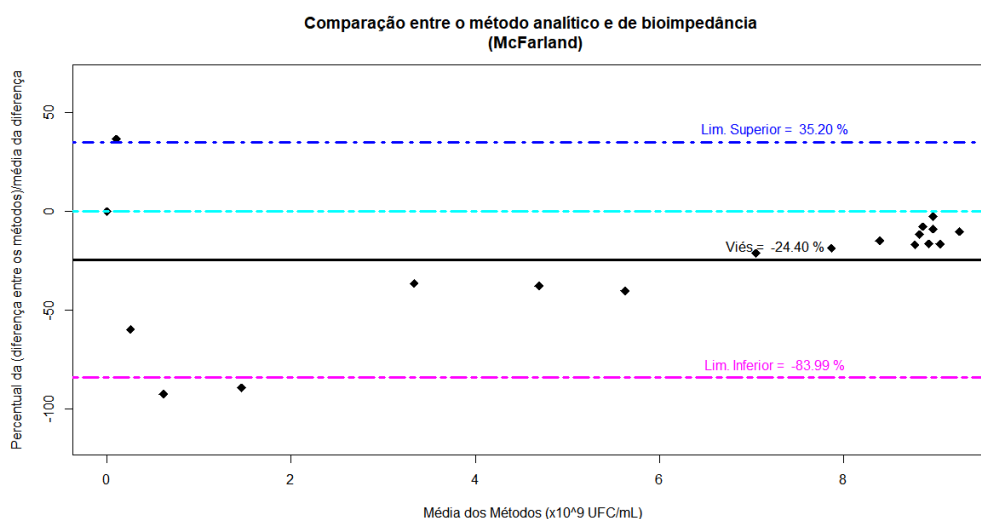


Figura J.2 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 01** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -24,40% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

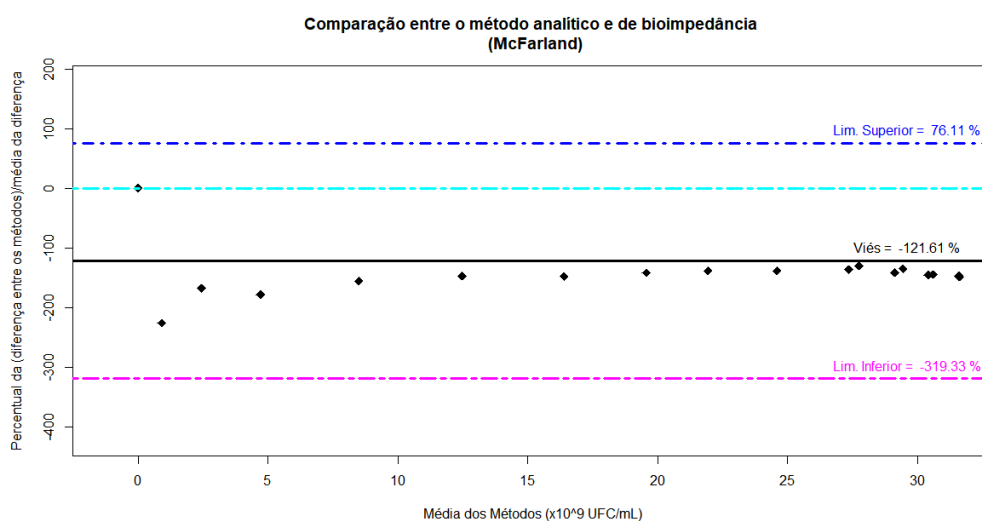


Figura J.3 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 02** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi -121,61% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

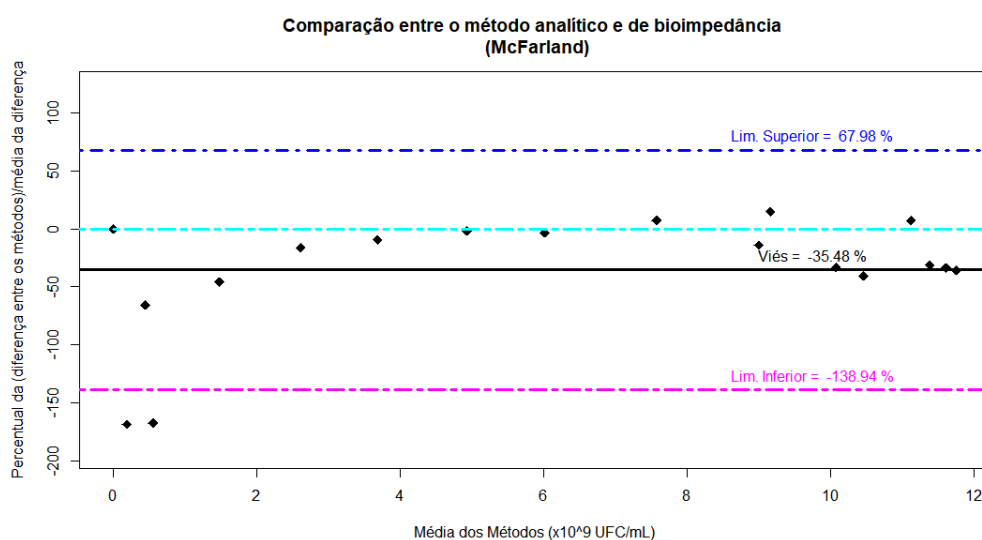


Figura J.4 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 03** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -35,48% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

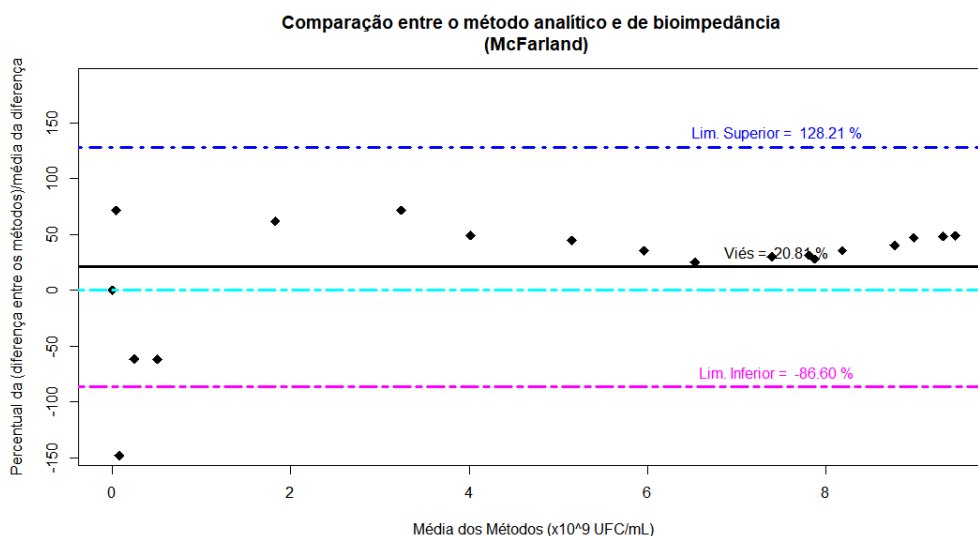


Figura J.5 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 04** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 20,81% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

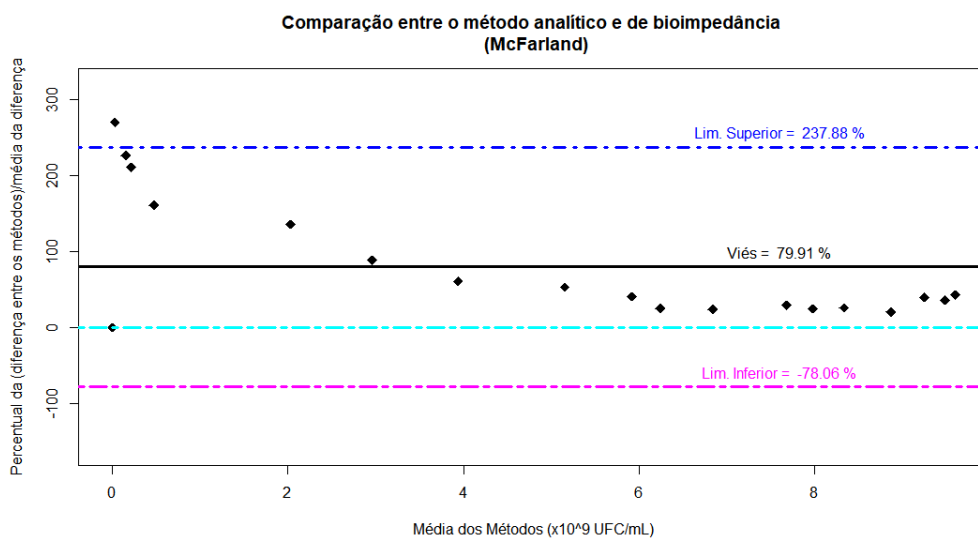


Figura J.6 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 05** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 79,91% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

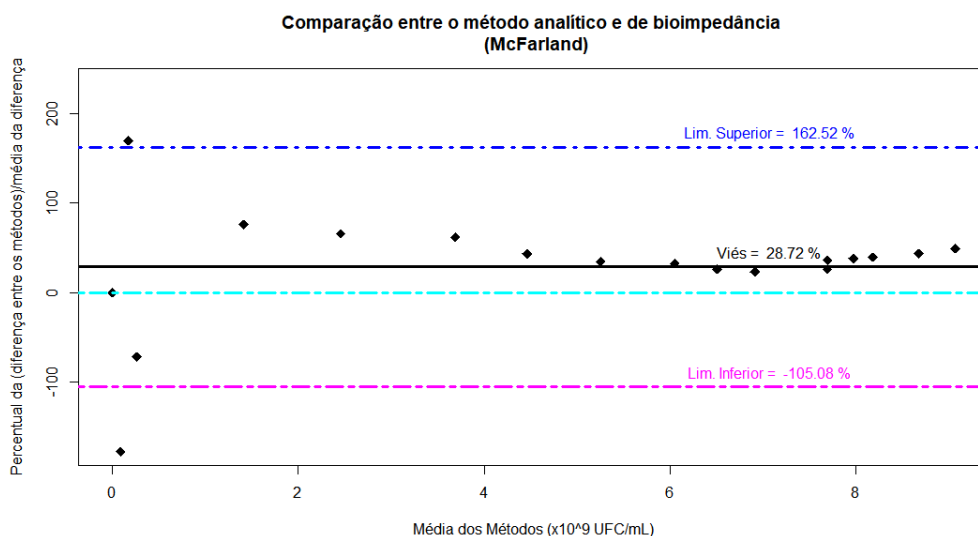


Figura J.7 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 06** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha continua) foi de 28,72% sobre a média das diferenças, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

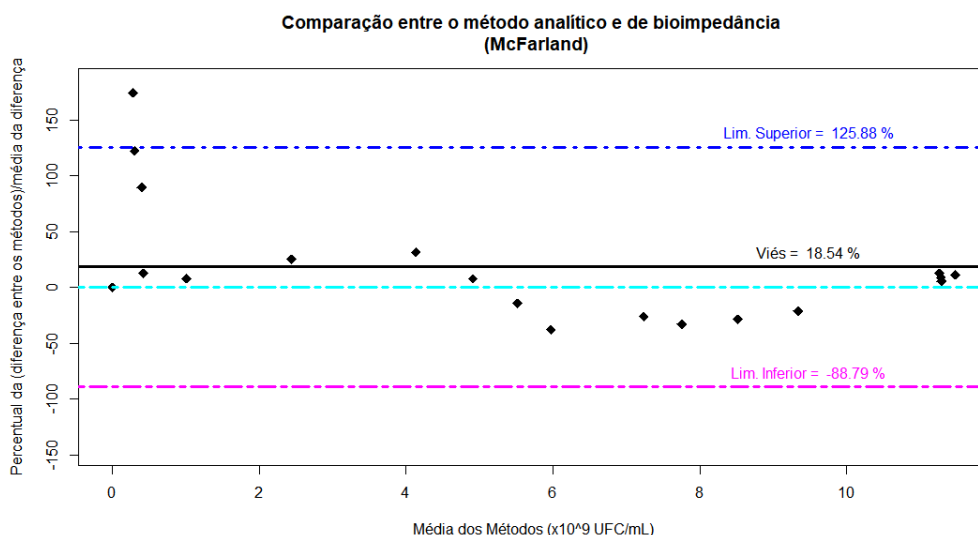


Figura J.8 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 07** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha continua) foi de 18,54% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

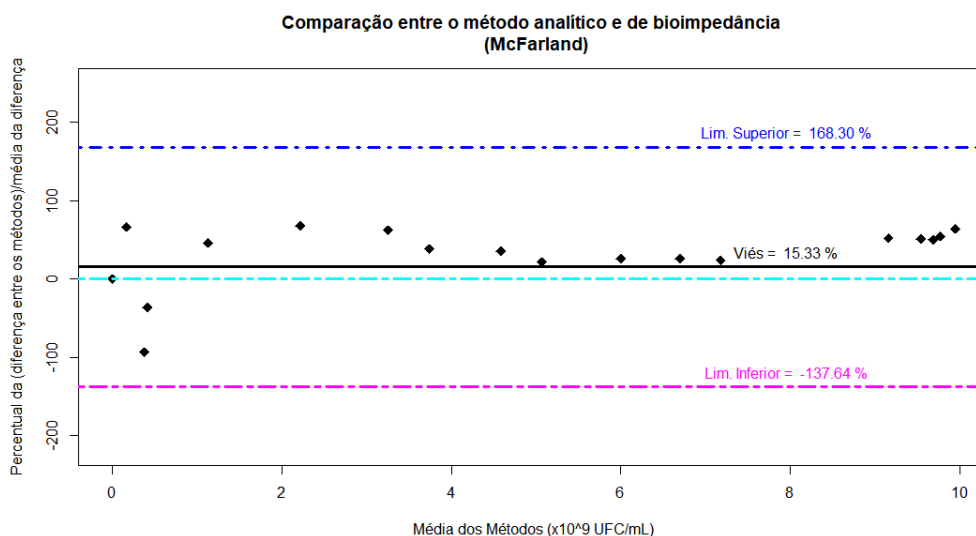


Figura J.9 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 08** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 15,33% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

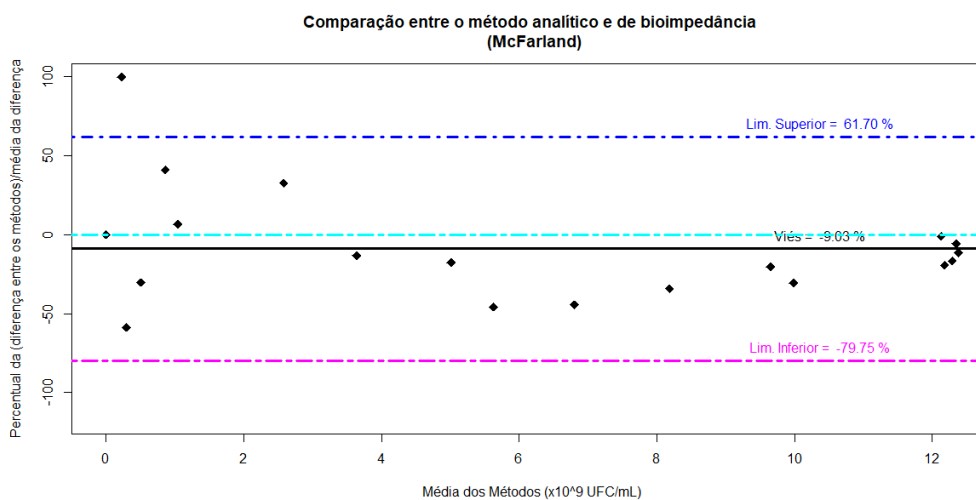


Figura J.10 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 09** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -9,03% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

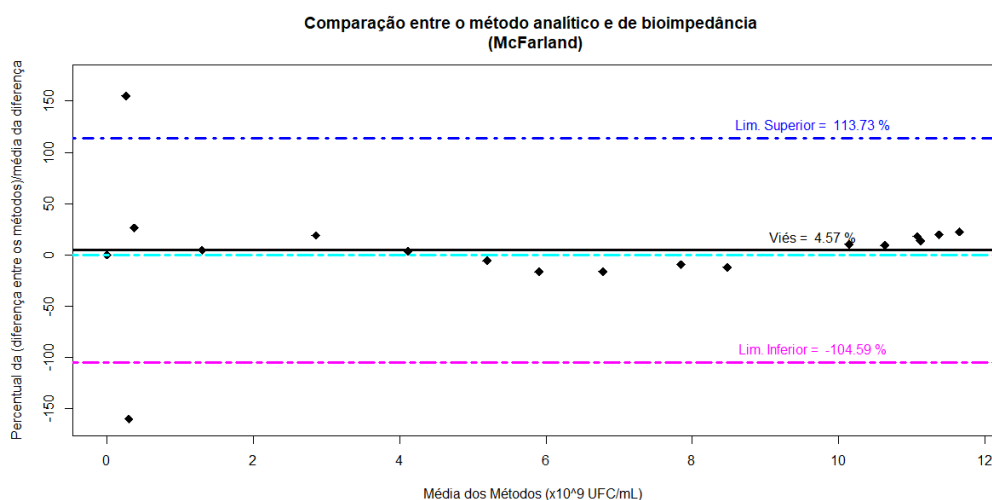


Figura J.11 – Avalia o de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 10** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha continua) foi de 4,57% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

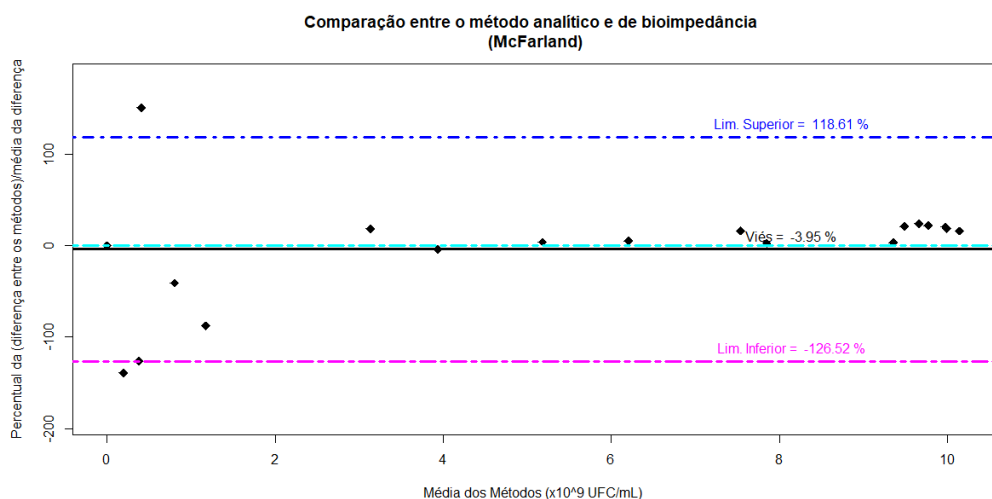


Figura J.12 – Avalia o de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 11** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha continua) foi de -3,95% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

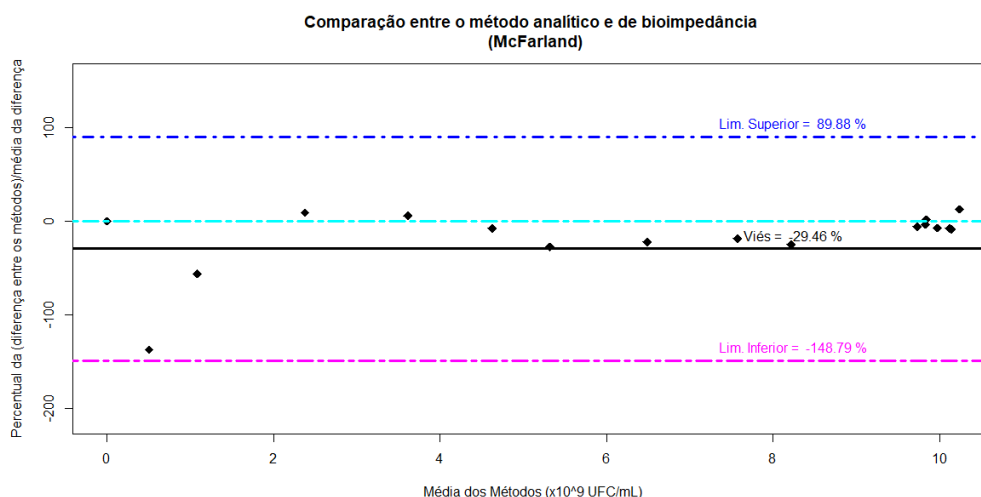


Figura J.13 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (método de McFarland) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 12** com **Bti** para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -29,46% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

J.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* – aplicação do método da Etapa 02 nos dados da Etapa 01

Nos gráficos apresentados a partir da Figura J.14, utilizando a avaliação de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN [1986]] se obteve a comparação dos métodos analítico e de bioimpedância, com os respectivos métodos da câmara de Neubauer e do BIS-STEP para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi expresso em percentual da razão da diferença entre os métodos pela média dessa diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

Na Tabela J.2 encontram-se os vieses determinados pelo método Bland-Altman [BLAND e ALTMAN [1986]] para *Saccharomyces cerevisiae*, utilizando os dados obtidos na Etapa 01.

Tabela J.2 – Determinação das médias pelo método de Bland-Altman [BLAND e ALTMAN [1986]] para *Saccharomyces cerevisiae*.

Arquivo	Concentração de inóculo (g/L)	número do experimento	Bland-Altman Viés (%)
Sc20170315	0,5	1	15,45
Sc20170328	0,5	2	1,27
Sc20170413	0,5	3	-106,80
Sc20170503	0,5	4	-78,31
Sc20170515	0,5	5	82,20
Sc20170801	0,1	6	-123,85
Sc20170831	0,1	7	81,71
Sc20170921	0,1	8	34,51

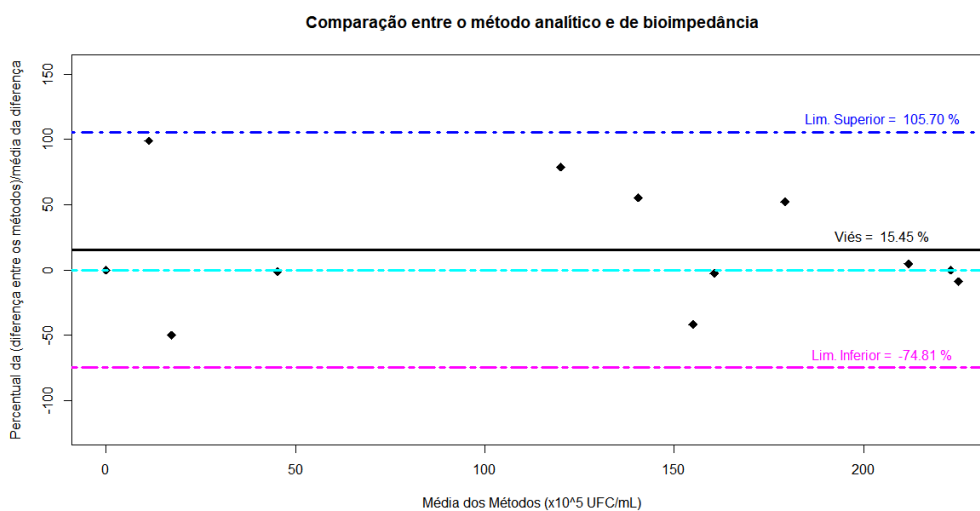


Figura J.14 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 01** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 15,45% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

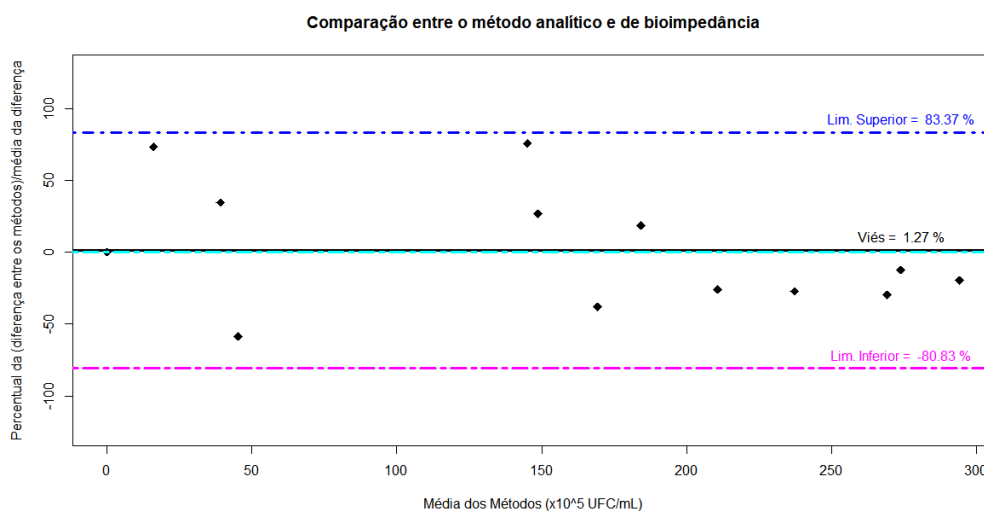


Figura J.15 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 02** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 1,27% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

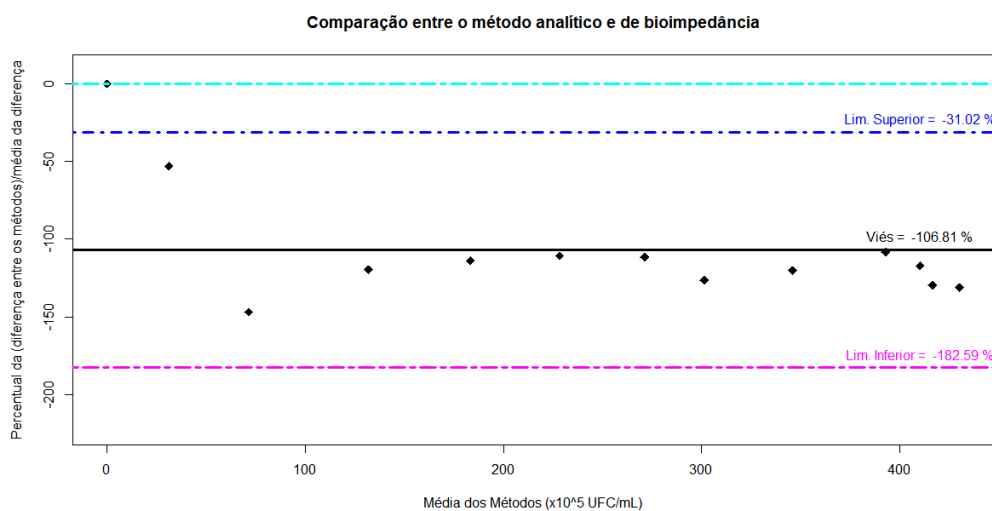


Figura J.16 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 03** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -106,81% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

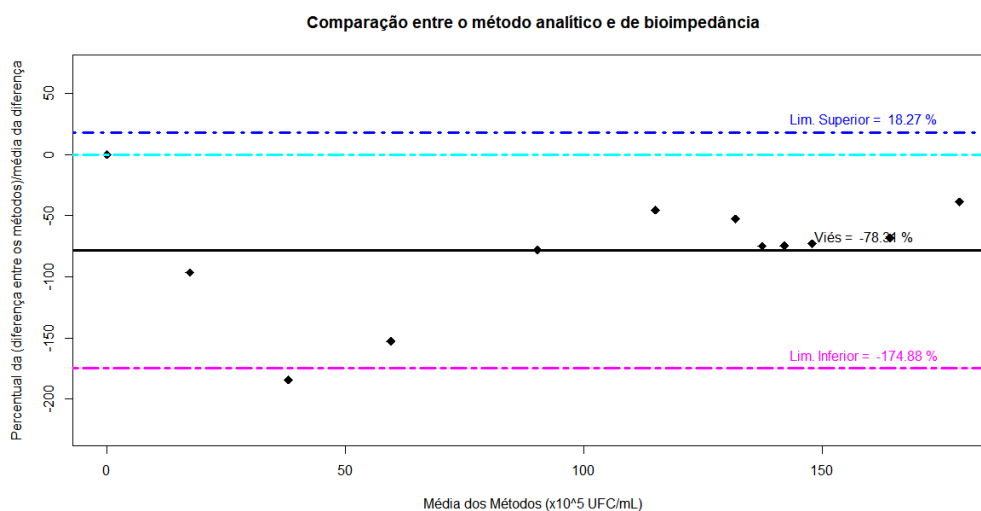


Figura J.17 – Avalia o de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 04** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -78,31% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

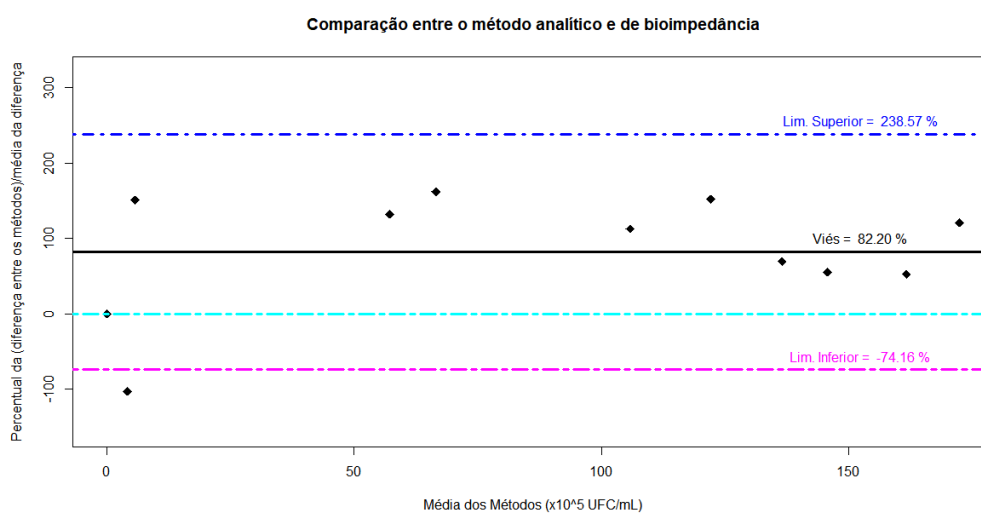


Figura J.18 – Avalia o de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 05** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 82,20% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

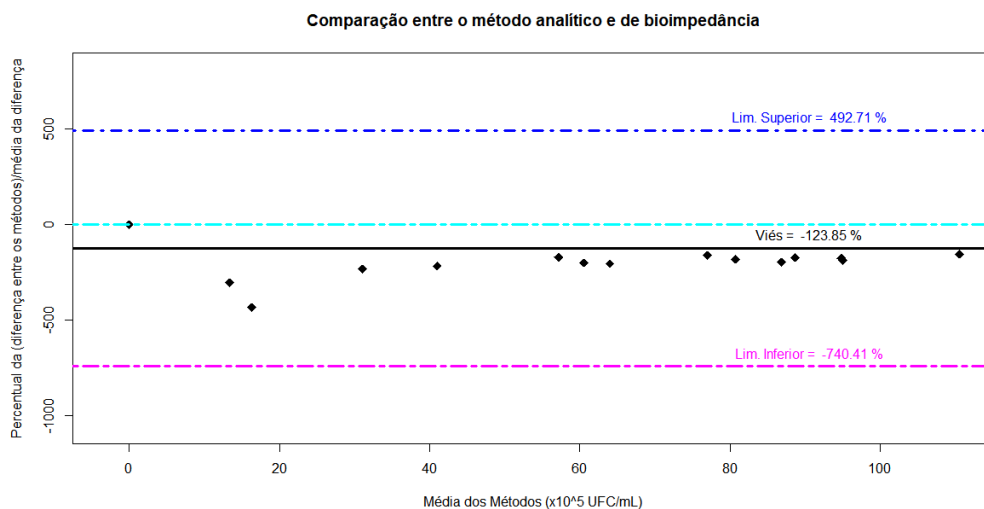


Figura J.19 – Avaliao de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 06** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de -123,85% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

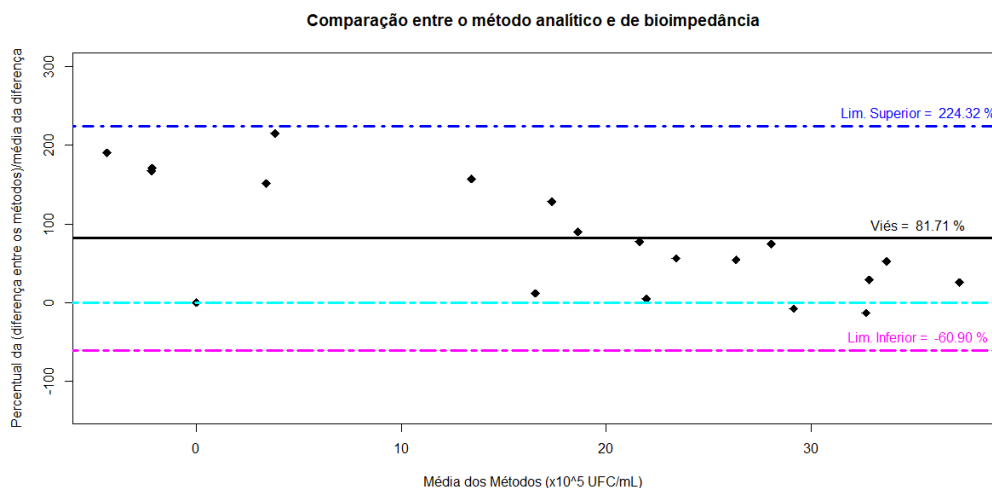


Figura J.20 – Avaliao de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 07** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 81,71% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

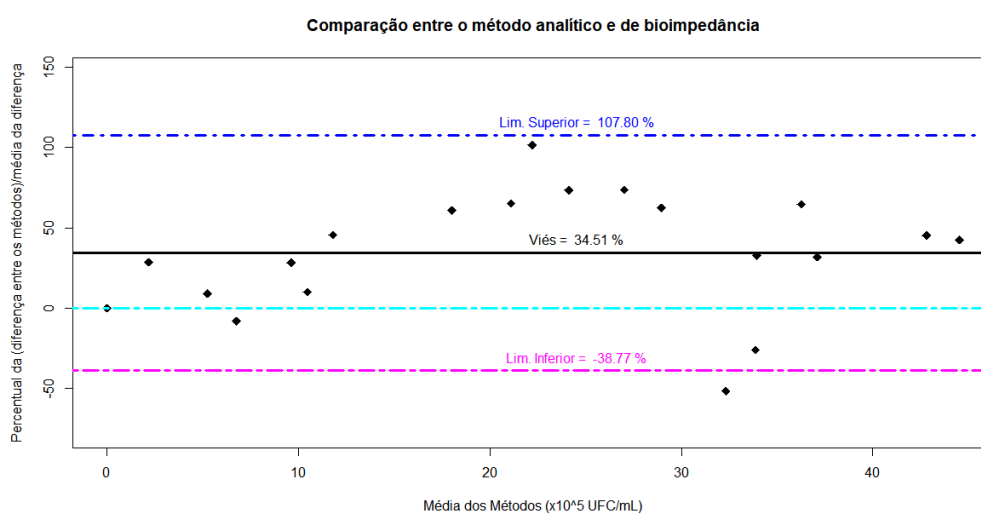


Figura J.21 – Avaliação de Bland-Altman entre os métodos analítico (câmara de Neubauer) e de bioimpedância (BIS-STEP) para o **experimento 08** com *Saccharomyces cerevisiae* para células totais, onde o viés em preto (linha contínua) foi de 34,51% sobre a média da diferença, onde 95% dos pontos estão compreendidos no intervalo de 2 desvios-padrão.

Anexo A

DensiCHEK[®] plus — Medição eletrônica da escala de McFarland

A medição do crescimento microbiano foi realizada através do *método de McFarland*, que se baseia na comparação da turbidez (através de diluições sucessivas, se for o caso) da amostra em relação à da referência (padrão), conforme mostra a Figura A.1.



Figura A.1 – Exemplo de utilização do *método de McFarland*, onde à esquerda se encontra o padrão e, à direita, a amostra.

O equipamento *DensiCHEK*[®] determina o valor da escala de McFarland sem a necessidade de diluição até o valor de 4,0 McF, apresentado na Figura A.2, acima deste valor faz-se necessário uma nova diluição de modo que o novo valor esteja dentro da faixa do equipamento.

Este equipamento vem com um conjunto de 03 referências (padrões) de *McFarland* certificadas e 01 em branco, conforme Figura A.3.

Em anexo, encontra-se o procedimento de utilização e operação do *DensiCHEK* fornecido pelo fabricante, apresentado na Figura A.4.

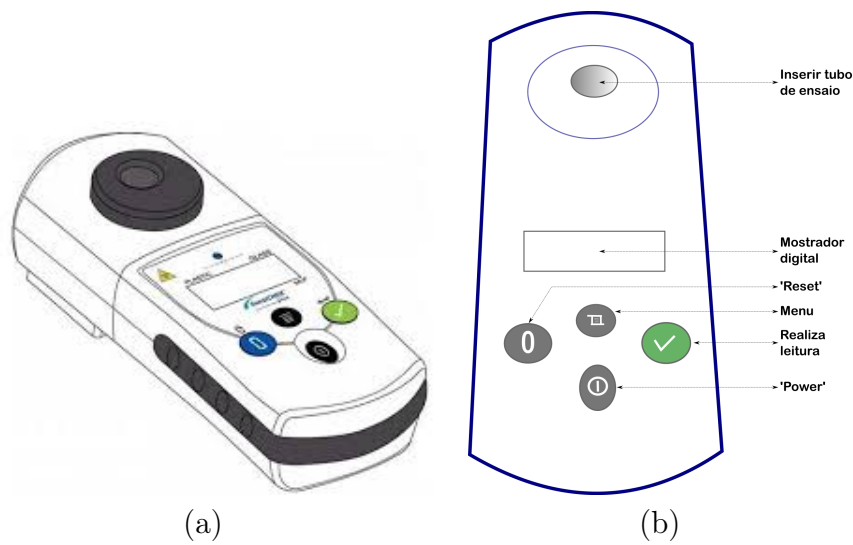


Figura A.2 – *DensiCHEK*: **a)** Turbidímetro digital baseado em *McFarland*. **b)** Identificação das principais partes.

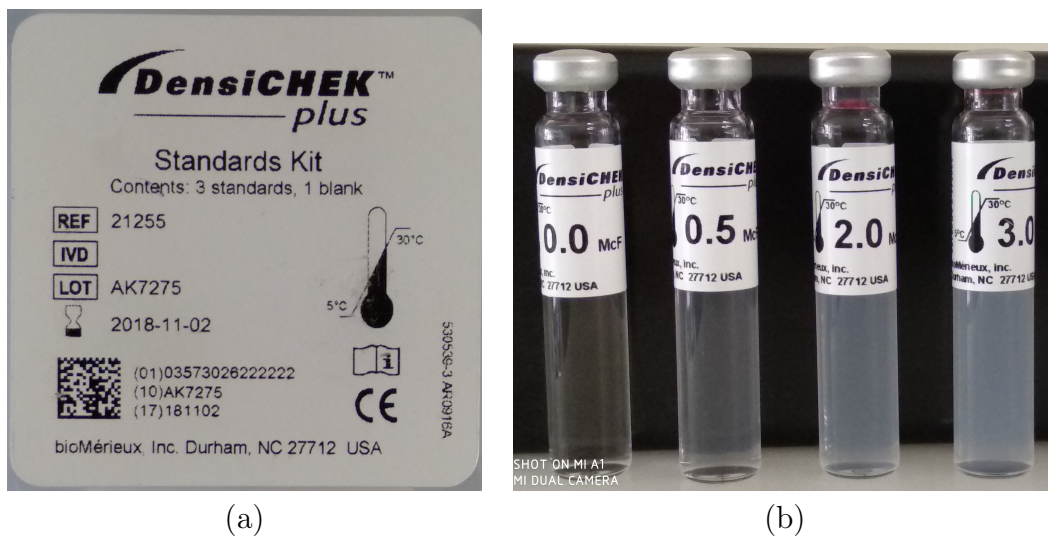


Figura A.3 – Material de referência certificado (MRC) para *DensiCHEK* **a)** Etiqueta da certificação com data de validade. **b)** Materiais (turbidez) de referência.

DensiCHEK™ plus

REF 21255-P2ML2

(2016/03)

BIOMÉRIEUX



bioMérieux, Inc.
100 Rodolphe Street
Durham, North Carolina
27712 USA
www.biomerieux.com

EC REP

bioMérieux® SA
376 Chemin de l'Orme
69280 Marcy l'Etoile - France
RCS LYON 673 620 399
Tel: 33 (0)4 78 67 20 00
Fax 33 (0)4 78 67 20 90

IVD



Kit de Padrões DensiCHEK™ Plus

PT

RESUMO E EXPLICAÇÃO

Os Padrões DensiCHEK™ Plus são utilizados para verificar o desempenho da medição do aparelho. Os Padrões DensiCHEK™ Plus são utilizados para verificar o desempenho do aparelho seja monitorizada e, por conseguinte, confirma a precisão da solução de suspensão com os microrganismos.

PRINCÍPIO

O valor real expresso nos padrões McFarland (McF) está impresso na etiqueta do tubo padrão. Coloque o tubo padrão no DensiCHEK™ Plus. Pode comparar-se o valor apresentado no aparelho com o valor impresso na etiqueta.

CONTEÚDO DO KIT <ul style="list-style-type: none"> • Conjunto de quatro padrões: 0,0 (em branco), 0,5, 2,0 e 3,0 • Folheto informativo 	PRECAUÇÕES DE UTILIZAÇÃO <ul style="list-style-type: none"> • Não abra os tubos. • Não agite o padrão. A presença de bolhas de ar irá afetar as leituras.
COMPOSIÇÃO DOS PADRÕES <ul style="list-style-type: none"> • Água desmineralizada 90,0 a 100,0% • Hexametilenotetramina 1,0 a 10,0% • Polímero de formazina < 1,0% • Outros componentes < 1,0% • Formaldeído < 0,1% 	CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO <ul style="list-style-type: none"> • O kit pode ser utilizado até expirar a data de validade indicada na embalagem. • Não congelar nem sobreaquecer Temperatura: <ul style="list-style-type: none"> • Armazenamento: 5 °C a 30 °C • Funcionamento: 15 °C a 30 °C Humidade relativa: <ul style="list-style-type: none"> • Armazenamento: 20% a 85% sem condensação • Funcionamento: 20% a 80% sem condensação
MATERIAIS NECESSÁRIOS (MAS NÃO FORNECIDOS) <ul style="list-style-type: none"> • Pano sem fios 	FREQUÊNCIA DO TESTE <p>Recomenda-se a utilização de um ou mais padrões McF (0,5, 2,0, 3,0) para testar a precisão do DensiCHEK™ Plus antes da primeira utilização, todos os meses ou mais frequentemente se exigido pelas normas regulamentares locais.</p>

VERIFICAÇÃO DO APARELHO

IMPORTANTE: Confirme se o aparelho DensiCHEK™ Plus está predefinido como tubo de VIDRO para realizar a calibração. Consulte a secção *Alterar as definições do tipo de tubo* no Manual do Utilizador do Aparelho.

1. Selecione o padrão 0,0 McF e limpe a superfície exterior com papel para lentes.
2. Cuidadosamente, inverta o padrão 0,0 McF cinco a seis vezes para assegurar que está homogéneo.
3. Certifique-se de que o aparelho está ligado, insira o padrão 0,0 McF no aparelho e prima a tecla Zero/Percorrer. Lentamente, efetue uma rotação completa do padrão. O aparelho apresenta uma série de traços seguidos por 0,00.
4. Selecione o padrão pretendido (0,5, 2,0 ou 3,0) e limpe a superfície exterior com papel para lentes.
5. Cuidadosamente, inverta o padrão cinco a seis vezes para assegurar que está homogéneo.
6. Insira o padrão no aparelho e, lentamente, efetue uma rotação completa até ser apresentado um valor numérico.
7. Verifique se o valor McFarland apresentado se situa dentro do intervalo aceitável:

Intervalo	aceitável dos padrões	
0,5 McF	0,44	0,56
2,0 McF	1,85	2,15
3,0 McF	2,79	3,21

8. Se quaisquer padrões se situarem fora do intervalo aceitável, repita as etapas 1 – 7. Se o seu padrão continuar fora do intervalo, contacte a Assistência Técnica da bioMérieux.

ELIMINAÇÃO DE RESÍDUOS

É da responsabilidade de cada laboratório gerir os resíduos e os efluentes produzidos de acordo com o seu tipo e com o grau de perigosidade e proceder ao tratamento e eliminação dos mesmos (ou contratar uma entidade para proceder ao seu tratamento e eliminação) em conformidade com quaisquer normas aplicáveis.

Figura A.4 – DensiCHEK: Procedimento de utilização e operação.