

Sara Cristina Tavares Rodrigues

PASSAGEM DA ANÁLISE DE CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA PARA AUTOCONTROLO, PELO MÉTODO SYSMEX

Dissertação de Mestrado em Engenharia Química, apresentada ao Departamento de Engenharia Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra

Junho 2011



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada coisa a Lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis
Heterónimo de Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

“Pela primeira vez sentimo-nos desassossegados. As palavras ganham um novo sentido quando não se tornam previsíveis; ganham nova vida quando propõem olhares e despertam perplexidades, quando inquietam o pensamento. E tornam-se sempre insuficientes quando com elas queremos dizer o que nos vai para lá da alma. Como agora.”

José Manuel Pinho

É chegada a hora de agradecer a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, sem os quais a concretização desta e outras etapas seria impossível.

Aos meus pais, aos meus irmãos, à Marina, aos meus primos, enfim a toda a família, obrigado pelo esforço que fizeram ao longo de todos estes anos, por terem estado sempre ao meu lado, por nunca me deixarem baixar os braços e desistir. Obrigado também por me acompanharem em todos os momentos, mesmos naqueles em que a “viagem é longa” e o destino incerto. Acima de tudo obrigado por existirem e fazerem sempre parte da minha vida!

À Professora Doutora Luísa Durães, por durante esta etapa ter sido muito mais que orientadora. Por todo o apoio e disponibilidade constante ao longo do semestre, pela valiosa transmissão de conhecimentos, pela amizade e o carinho, proporcionando-me um bem-estar imprescindível para a execução deste trabalho.

Ao Professor Doutor António Portugal por toda a disponibilidade demonstrada e orientação, tão precisa e importante, na elaboração deste trabalho. Muito obrigado pelas palavras sábias em momentos cruciais.

À Engenheira Cassilda Campos, o meu sincero agradecimento pela excelente oportunidade profissional, pelo facto de me ter recebido tão bem na Unicer, proporcionando-me todas as condições que se podem desejar quando se desenvolve um trabalho desta natureza. Muito obrigado também pelo tempo dispendido para ajudar, discutir e iluminar todas as minhas dúvidas e dificuldades ao longo da realização deste trabalho.

Ao pessoal da Unicer, Sofia e Pedro pelos momentos de amizade, pelos conselhos sábios e por me terem recebido tão bem... Muito obrigado! Ao pessoal do laboratório, pelo carinho, pelo excelente ambiente de trabalho e por todo o auxílio prestado. Aos técnicos de

produção, com quem aprendi muito e de tudo um pouco. Todos foram responsáveis por terem tornado este local de trabalho único, repleto de companheirismo, boa-disposição e óptimo espírito.

Às amigas de curso, Ticha, Inês, Vanda, Armanda, Maria e Filipa por me terem ajudado a “construir” a pessoa que sou hoje. A elas e aos restantes um agradecimento muito especial por terem tornado a minha vida mais rica nestes últimos anos.

Aos amigos de sempre, Mariana, Sofia, Tiago, Relvas, Ana e Sara. Obrigado por serem quem são e como são!

RESUMO

Saccharomyces cerevisiae é nome mais comumente utilizado na literatura para designar a levedura cervejeira, sendo esta uma das espécies de levedura mais importantes e utilizadas industrialmente. É este o microrganismo responsável pelo processo biológico que dá origem a um produto conhecido de todos nós - a cerveja, sendo esse processo biológico denominado de fermentação alcoólica. Estando estabelecida a importância deste microrganismo no processo de produção de cerveja, o estudo do seu controlo de forma rápida e eficaz é a finalidade principal deste trabalho.

O controlo da levedura é efectuado determinando o número de células e a viabilidade desta. Até agora, a determinação do número de células de levedura na Unicer é efectuada pelos responsáveis pelo controlo de qualidade. No entanto, e devido ao horário limitado deste serviço nem sempre a disponibilidade de resultados satisfaz a procura dos mesmos. Surge assim o autocontrolo, que permite que os técnicos responsáveis pela condução e supervisão do processo passem a ser os responsáveis pela determinação do número de células de levedura.

Os objectivos mais específicos deste trabalho são então: i) a aprendizagem do processo de produção de cerveja, no qual se insere e é parte fundamental o método analítico de contagem de células de levedura, possibilitando desta forma uma fermentação eficiente e sem problemas; ii) a aprendizagem e compreensão do método analítico de medida de células de levedura para que seja possível, primeiramente, efectuar uma correcção aos erros de natureza experimental e, posteriormente, criar as condições necessárias à formação dos técnicos que serão doravante responsáveis pela determinação do número de células de levedura; iii) a pesquisa de métodos mais expeditos para a contagem de células de levedura é também objectivo deste trabalho.

Foi então devidamente clarificada a importância da contagem de células de levedura no processo cervejeiro. Por outro lado, a aquisição de conhecimentos sobre o método analítico usado para essa contagem permitiu que fosse efectuado o tratamento dos erros experimentais, pela eliminação dos erros sistemáticos através da introdução de acções correctivas ou procedimentos padrão e pelo tratamento estatístico dos erros aleatórios. Para implementação do autocontrolo na contagem de células de levedura, criaram-se instruções de trabalho que garantem procedimentos operacionais adequados e criaram-se ainda condições adequadas à formação dos técnicos, como é o caso da formação teórica que é o ponto de partida para a formação prática. Por último, a análise aos diversos métodos de

contagem de células de levedura permitiu concluir que embora o método utilizado na Unicer seja adequado e preciso, existem já tecnologias mais avançadas capazes de fornecer resultados em tempo real e mais completos, as quais devem merecer alguma atenção por parte da empresa.

Palavras-chave: processo cervejeiro; levedura cervejeira; autocontrole; erros experimentais; contagem de células de levedura.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae is the most commonly used name in literature to designate the brewing yeast, which is one of the most important and most used species of yeast in industry. This is the microorganism responsible for the biological process used to ferment a product known to us all - beer, and this biological process is called alcoholic fermentation. Since the importance of this microorganism in the process of beer production is established, the study of its rapid and effective control is the main purpose for this thesis.

The control of yeast is done by determining its cell number and viability. Up until now in Unicer, determining the number of yeast cells is carried out by those responsible for quality control. However, due to the limited hours of this service, the availability of the results do not always meet the demand for them. Thus arises the self control, which allows the technicians responsible for conducting and supervising the process start to be responsible for determining the number of yeast cells.

The specific objectives of this thesis are: i) learning the process of beer production, in which the analytical method of counting yeast cells operates and is a fundamental part, thus enabling a smooth and efficient fermentation; ii) learning and understanding the analytical method of measurement of yeast cells to make possible, firstly, the correction of the errors of experimental nature and, posteriorly, create the necessary conditions for the training of technicians which will henceforth be responsible for determining the number yeast cells; iii) the search for more expeditious methods for counting yeast cells.

The importance of yeast cell counting in brewing was properly clarified. On the other hand, the acquisition of knowledge about the analytical method used for counting allowed the treatment of experimental errors, by the elimination of systematic errors, by introducing standard procedures or corrective actions and by the statistical treatment of random errors. For the implementation of self control in yeast cell counting, were created work instructions to ensure proper operational procedures and were created adequate conditions for training technicians, as is the case of the theoretical training, which is the starting point for the practical training. Finally, the analysis of the various methods of counting yeast cells concluded that although the method used in Unicer is appropriate and accurate, there are already more advanced technologies that can provide results in real time and more completed, which deserve some attention from the company.

Keywords: brewing; brewing yeast; self control; experimental errors; yeast cell count.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	iv
ABSTRACT.....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABELAS.....	xi
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2: PROCESSO CERVEJEIRO	4
2.1. CERVEJA – NOTA HISTÓRICA.....	4
2.2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA.....	5
2.2.1. MATÉRIAS-PRIMAS	6
2.2.2. FABRICAÇÃO DO MOSTO.....	7
2.2.3. FERMENTAÇÃO.....	9
2.2.4. FILTRAÇÃO	12
2.2.5. PRODUTO FINAL	14
2.3. CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX.....	14
2.4. LEVEDURA CERVEJEIRA	15
2.4.1. DADOS HISTÓRICOS.....	18
CAPÍTULO 3: MÉTODOS DE CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA	23
3.1. VISUAL OU LUPA	24
3.2. MICROSCOPIA	25
3.3. CITOMETRIA DE FLUXO	26
3.4. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS.....	28
CAPÍTULO 4: CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX	33
4.1. AMOSTRAGEM	34
4.2. PROCEDIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX	34
4.2.1. PREPARAÇÃO DOS FRASCOS DE RECOLHA DE AMOSTRAS.....	34
4.2.2. RECOLHA DE AMOSTRAS	34
4.2.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA	35
4.2.4. EXECUÇÃO DA ANÁLISE NO SYSMEX.....	36
4.2.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS.....	38
CAPÍTULO 5: ERROS EXPERIMENTAIS	40

5.1.	PROCESSO DE MEDIÇÃO	40
5.2.	ERROS.....	41
5.3.	ANÁLISE E TRATAMENTO DE ERROS	42
5.4.	ANÁLISE DOS ERROS SISTEMÁTICOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX.....	42
5.5.	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ERROS ALEATÓRIOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX.....	50
5.6.	TESTES NÃO-PARAMÉTRICOS – TESTES DE QUALIDADE DE AJUSTE.....	57
5.7.	PROPAGAÇÃO DOS ERROS NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX	60
CAPÍTULO 6: IMPLEMENTAÇÃO DO AUTOCONTROLO NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX.....		63
CAPÍTULO 7: CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS		65
BIBLIOGRAFIA		68
ANEXO I: RESULTADOS OBTIDOS POR SYSMEX E CÁLCULO DE ESTATÍSTICAS		71
ANEXO II: CÁLCULOS DA ESTATÍSTICA TESTE DO TESTE K-S. TABELAS AUXILIARES.		73
ANEXO III: INSTRUÇÃO DE TRABALHO E APRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO TEÓRICA.....		80

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Conteúdos abordados nos restantes capítulos deste trabalho.	3
Figura 2 – Processo de produção de cerveja (retirada de www.unicer.pt ^[4]).	5
Figura 3 – Fotografia de uma levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em gemulação, obtida por microscópio electrónico de varrimento (retirada de Rodrigues ^[7]).	16
Figura 4 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura US em fermentação.	18
Figura 5 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura US em stockagem.	18
Figura 6 – Resultados da determinação da viabilidade da levedura em amostras de levedura US em stockagem.	19
Figura 7 – Relação entre a viabilidade e geração da levedura em amostras de levedura US em stockagem.	19
Figura 8 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura US em propagação.	19
Figura 9 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura CB em fermentação.	21
Figura 10 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura CB em stockagem.	21
Figura 11 – Resultados da determinação da viabilidade da levedura em amostras de levedura CB em stockagem.	21
Figura 12 – Relação entre a viabilidade e geração da levedura em amostras de levedura CB em stockagem.	22
Figura 13 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura CB em propagação.	22
Figura 14 – (A) Câmara de contagem de Neubauer. (B) Observação ao microscópio da câmara de contagem de Neubauer (retirada de http://analgesi.co.cc/html/t25246.html ^[17]).	25
Figura 15 – (A) Célula de levedura não viável corada com azul de metileno. (B) Células de levedura viáveis (retirada de http://www.umce.cl ^[19]).	26
Figura 16 – Representação esquemática dum citómetro de fluxo (retirada de Díaz <i>et al.</i> ^[16]).	27
Figura 18 – Representação esquemática do princípio de Coulter (retirado de Roberts ^[21]).	28
Figura 17 – Dispersão da luz por uma célula (retirada de Díaz <i>et al.</i> ^[16]).	28
Figura 19 – Sysmex F-520.	29
Figura 20 – (A) Design do chip. (B) Trajectória das células vivas não coloradas e das células mortas coloradas separadas por dielectroforese (retirado de Mernier <i>et al.</i> ^[22]).	30
Figura 21 – Comportamento das células de levedura quando sujeitas a um campo eléctrico de rádio-frequência (retirado de Carvell <i>et al.</i> ^[23]).	30

Figura 22 – (A) “Yeast Monitor” constituído pela sonda e equipamento principal. (B) Sonda do “Yeast Monitor” instalada numa tubagem (retirado de Carvell <i>et al.</i> [23]).	31
Figura 23 – (A) Sysmex F-520. (B) Zona de leitura do Sysmex. Legenda: 1 – Opérculo; 2 – Eléctrodo externo; 3 – Transdutor.	33
Figura 24 – Representação esquemática das teclas de operação do Sysmex.	36
Figura 25 – Contribuições dos diferentes procedimentos num processo de medição (retirado de Fonseca [26]).	40
Figura 26 – Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (18,7; 0,20)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente à levedura de sementeira US.	53
Figura 27 – Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (1,32; 0,002)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente à levedura de sementeira CB.	54
Figura 28 – Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (19,4; 0,76)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente ao mosto semeado US.	54
Figura 29 – Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (1,4; 0,001)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente ao mosto semeado CB.	54
Figura 30 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de levedura de sementeira US.	58
Figura 31 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de levedura de sementeira CB.	59
Figura 32 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de mosto semeado US.	59
Figura 33 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de mosto semeado CB.	59

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Características que distinguem os diferentes tipos de levedura empregues no processo cervejeiro.....	17
Tabela 2 – Comparação dos diferentes métodos/tecnologias de contagem de células de levedura e determinação da viabilidade.....	32
Tabela 3 – Funções do Sysmex e respectivas teclas.....	37
Tabela 4 – Equações de cálculo utilizadas para obter os resultados finais da contagem de células de levedura por Sysmex.....	39
Tabela 5 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas ao método analítico de contagem de células de levedura em fermentação e propagação.....	45
Tabela 6 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas no método analítico de contagem de células de levedura em stockagem.....	48
Tabela 7 – Valores das estatísticas das distribuições aleatórias para as quatro amostras em estudo.	56
Tabela 8 – Resultados obtidos no teste K-S para as diferentes amostras em estudo, para um nível de significância de 5%.....	60
Tabela 9 – Resultados obtidos pela aplicação da lei da propagação dos erros para as quatro tipo de amostras em estudo.....	62
Tabela 10 – Plano de formação dos técnicos de produção para a implementação do autocontrolo na contagem de células de levedura por Sysmex.....	64

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A presente Dissertação de Mestrado resulta da realização de um estágio na empresa Unicer, mais precisamente no Centro de Produção de Cerveja de Santarém.

Com mais de um século de história, a Unicer é uma empresa líder no sector de bebidas em Portugal, tendo já expandido o seu negócio para além-fronteiras. Os produtos desta empresa que apresentam maior destaque são as cervejas e as águas engarrafadas, donde se distinguem as marcas Super Bock, Cristal, Carlsberg, Água das Pedras, Vitalis, entre outras, tão conhecidas de todos nós. Contudo, esta empresa não se resume só à produção de cervejas e água, produzindo também refrigerantes e vinhos. Outras áreas de negócio deste grupo são a produção e comercialização de malte e ainda o turismo.

O presente trabalho encontra enquadramento no processo de produção de cerveja, mais propriamente na etapa de fermentação. Uma das particularidades a reter desde já sobre o processo biotecnológico de produção de cerveja é que o microrganismo responsável pela conversão das matérias-primas em cerveja é a levedura, utilizada em outros processos fermentativos como a produção de vinhos ou de pão. Esta conversão é efectuada através de um processo biológico bem conhecido de todos nós – a fermentação alcoólica.

Dito isto, a levedura, mais propriamente o número de células de levedura, é uma das variáveis processuais mais importantes a ter sob controlo na produção de cerveja. A problemática em estudo prende-se com o facto de nem sempre estarem disponíveis, em tempo real, resultados do número de células essenciais à boa condução do processo de produção de cervejeira.

É do conhecimento geral que a condução eficiente de processos requer o controlo apertado e expedito de variáveis processuais importantes. Posto isto, urge desenvolver e implementar medidas que tornem o controlo de processos mais eficaz. Surge, desta forma, a necessidade da passagem para autocontrolo do método analítico que permite determinar o número de células de levedura em determinada fase do processo cervejeiro, nomeadamente, durante a etapa de fermentação. O autocontrolo pode ser definido, num contexto industrial, como o controlo de variáveis processuais importantes pelos técnicos responsáveis pela condução e supervisão do processo, neste caso, os técnicos de produção.

Assim, os principais objectivos deste trabalho são a aprendizagem do processo de produção de cerveja, para que seja possível perceber qual a importância da contagem de

células para o processo, e ainda a aprendizagem e compreensão do método de análise de contagem de células de levedura, para ser possível definir procedimentos e criar as respectivas instruções de trabalho que garantam os procedimentos operacionais correctos. Após adquirido conhecimento acerca do método, é mais fácil efectuar a identificação dos erros de natureza experimental, sendo que esta identificação é também um objectivo deste trabalho, uma vez que permite a redução ou eliminação dos erros, aumentando desta forma a confiança nos resultados analíticos. Para que seja possível efectuar a passagem do método para autocontrolo, é necessário identificar as ferramentas necessárias para efectuar esta passagem e treinar os técnicos que têm de recorrer ao método de contagem de células de levedura, sendo estes objectivos muito importantes deste trabalho.

Paralelamente aos objectivos de índole mais prática, atrás enunciados, existe outro objectivo que visa a procura de métodos mais expeditos para a contagem de células de levedura, que embora não sejam para já tidos em consideração, podem vir a revelar-se uma mais-valia para a empresa no futuro, quando esta procurar soluções tecnologicamente mais atractivas para a contagem de células.

Para que seja possível perceber qual a metodologia empregue para cumprir com os objectivos acima descritos, encontra-se representado na figura 1 um mapa geral dos restantes capítulos que compõem esta tese, bem como dos tópicos abordados em cada capítulo.

No capítulo 2 é feita uma abordagem à história da cerveja e é efectuada também uma descrição de todas as etapas do processo cervejeiro, bem como das matérias-primas necessárias à produção de cerveja. Neste capítulo enquadra-se a contagem de células no processo de produção. Por último, ainda neste capítulo, é feita uma descrição detalhada da levedura cervejeira, devido à importância deste microrganismo quer para o processo quer para o trabalho que vai ser realizado.

No capítulo 3 descrevem-se os principais métodos de contagem de células de levedura, inclusive o método de contagem utilizado na Unicer. É também efectuada uma comparação entre estes, com vista a apontar vantagens e desvantagens de uns métodos em relação aos outros, sendo desta forma possível verificar qual o método mais expedito para efectuar a contagem de células de levedura.

No capítulo 4 são definidas as etapas e os procedimentos que compõem o método analítico de contagem de células de levedura usado na Unicer, concretamente com o equipamento Sysmex.

O capítulo 5 diz respeito aos erros experimentais. Neste capítulo são então definidos os erros experimentais e, posteriormente, é efectuada a sua análise e tratamento.

No capítulo 6 são indicadas as ferramentas que permitem a passagem do método de contagem de células de levedura para autocontrolo.

Por último, no capítulo 7 apresentam-se as conclusões finais e propostas de trabalhos futuros.

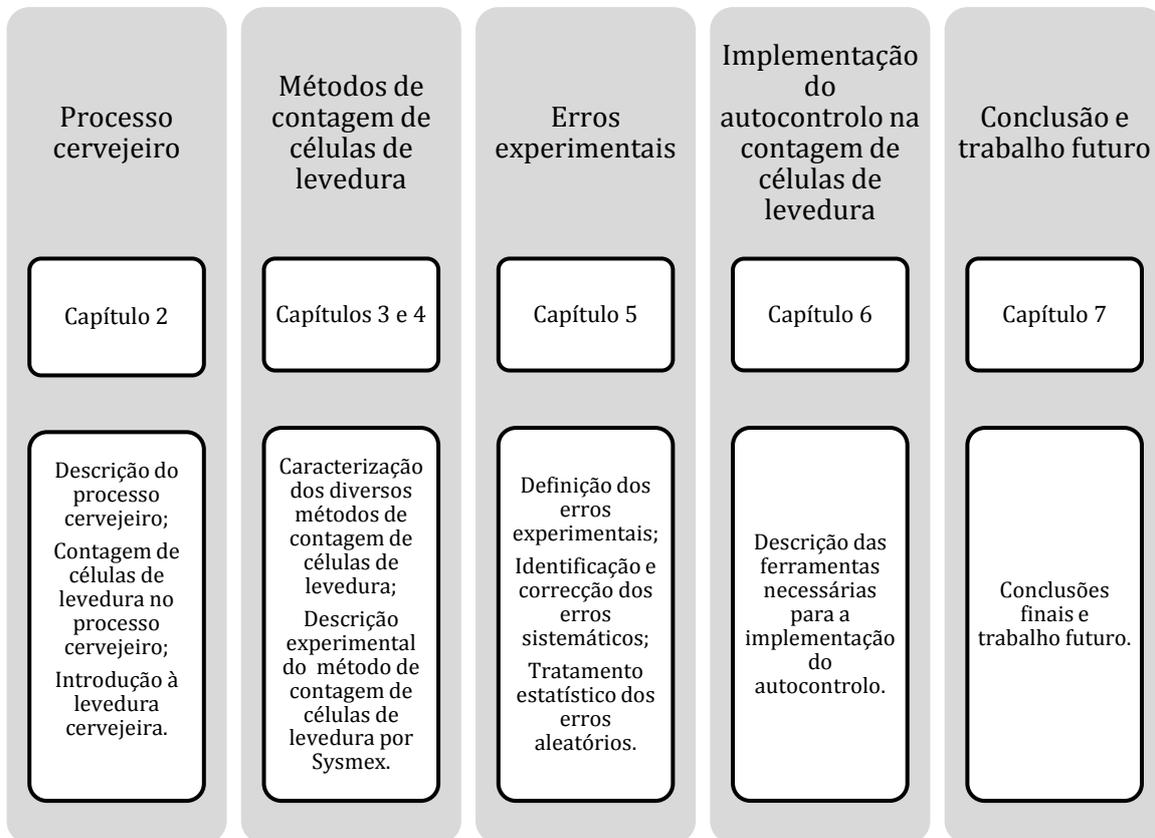


Figura 1 – Conteúdos abordados nos restantes capítulos deste trabalho.

CAPÍTULO 2: PROCESSO CERVEJEIRO

2.1. CERVEJA – NOTA HISTÓRICA

É do conhecimento geral que a cerveja é uma bebida ligeiramente alcoólica, obtida a partir de uma mistura de cereais, sobretudo cevada na forma de malte, e lúpulo fermentados. A sua história inicia-se há milhares de anos atrás, sendo difícil precisar com exactidão o momento em que surge esta bebida pela primeira vez.

Pensa-se que o aparecimento de bebidas fermentadas surge a par com o desenvolvimento da agricultura que ocorreu no Crescente Fértil, região que se estende desde a Mesopotâmia até ao Egipto. Todos os povos desta região, como os Sumérios, mais tarde o povo da Babilónia e, por último, os Egípcios, tinham enraizado na sua cultura a produção de cerveja. Existem evidências arqueológicas que remetem também o aparecimento desta bebida na China, onde estaria a ser produzida uma bebida fermentada a partir de uma mistura de arroz, mel e fruta, no sétimo milénio antes de Cristo. No entanto, o desenvolvimento da cerveja, conforme a conhecemos hoje, é devida aos povos da Suméria, Babilónia e Egipto ^[1].

Com a conquista do Egipto pelos Gregos, difunde-se também a este povo a produção de cerveja, que mais tarde também se disseminará pelos Romanos. No entanto, nesta fase de expansão, a cerveja é tida como uma bebida menos importante que o vinho ^[1].

A Idade Média teve um grande impacto sobre a cerveja, uma vez que existiram desenvolvimentos na sua técnica de fabricação, que nesta altura decorria em mosteiros. A cerveja adquire novamente grande importância, os monges tentam melhorar o produto e dão grande importância ao uso do lúpulo, utilizado pela primeira vez pelo povo Germânico^[1].

Após o período da Idade Média, em que a produção de cerveja sofre um revés, a ocorrência de diversas descobertas e acontecimentos permite uma melhoria na técnica e processo de fabricação da cerveja e na sua difusão pelo Mundo. Algumas dessas descobertas passam pela invenção da máquina a vapor por James Watt, a descoberta da refrigeração artificial por Carl Linde, o desenvolvimento dos caminhos-de-ferro permitindo assim a expansão deste produto, a invenção do método de pasteurização por Louis Pasteur, e por último a descoberta da levedura de fermentação baixa por Emil Christian Hansen ^[2].

De forma natural a cerveja foi-se difundindo pelas sociedades modernas, existindo hoje em dia variados tipos de cerveja e processos industriais capazes de fazer chegar este produto a nossa casa com a melhor qualidade possível.

2.2. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA

O processo levado a cabo para que seja possível a produção de cerveja tem como base científica e tecnológica diversos ramos da ciência, como é o caso da química, da bioquímica, da microbiologia, da genética, entre outros. O processo utilizado, já desde os primórdios da humanidade, é de uma complexidade fascinante devido a todas as transformações que ocorrem nas matérias-primas até à obtenção de um produto final, apreciado e consumido pelas mais diversas comunidades do Mundo. O processo cervejeiro é reconhecido como um processo biotecnológico tradicional, devido à sua longa história [3].

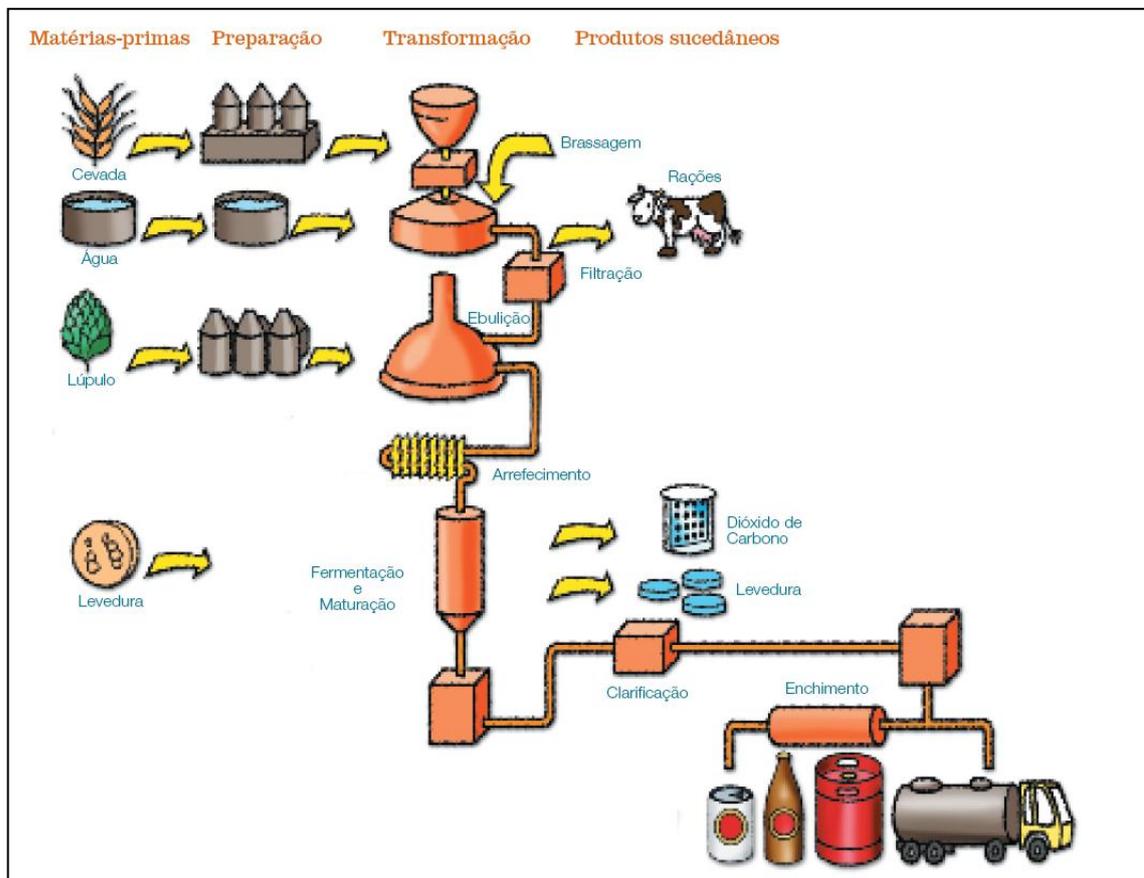


Figura 2 – Processo de produção de cerveja (retirada de www.unicer.pt [4]).

A figura 2 trata-se de um esquema simples do complexo processo de produção de cerveja que será descrito seguidamente. Esta figura pretende apenas dar ênfase às principais etapas do processo e às principais matérias-primas e produtos sucedâneos do mesmo.

2.2.1. MATÉRIAS-PRIMAS

As matérias-primas utilizadas no processo cervejeiro são essencialmente a água, o malte, o lúpulo e a levedura, enquanto se utilizam como matérias-subsidiárias os grãos crus, também denominados de “gritz” quando são originários do milho, o xarope de açúcar e, por último, o açúcar caramelizado.

A água utilizada no processo deve respeitar determinadas características, tais como ter uma composição mineralógica adequada e ser potável, para que seja possível alcançar no final o sabor desejado.

O malte, obtido da cevada através de um processo de maltagem, é um dos principais constituintes da cerveja. O método a partir do qual é obtido é, de uma forma global, um processo mais acelerado do que a germinação natural, transformando assim o cereal em malte. O processo de maltagem é efectuado com o intuito de converter o amido em açúcares fermentáveis pela levedura, uma vez que este processo activa as enzimas do malte responsáveis por essa conversão [5]. A maltagem pode ser conduzida de formas distintas, dando origem a diferentes tipos de malte, o que por consequência, dará origem a diferentes tipos de cerveja.

O lúpulo, é também um importante constituinte da cerveja, uma vez que é o responsável pelo aroma e amargo tão característicos da cerveja. A esta planta estão também associadas outras contribuições, tal como o auxílio na formação de espuma e ainda lhe são reconhecidas propriedades anti-sépticas.

A levedura é de extrema importância no processo cervejeiro, uma vez que este microrganismo é o responsável pela transformação das matérias-primas em cerveja, devido à sua capacidade de converter açúcares em álcool e gás carbónico, quando em condições anaeróbias. As leveduras podem ser classificadas com base no seu comportamento ao flocular, ou seja, em leveduras de fermentação alta e leveduras de fermentação baixa [5]. Na Unicer as leveduras utilizadas são as de fermentação baixa, o que significa que à medida que se vai desenrolando o processo as leveduras vão sedimentando no fundo do recipiente.

Os grãos crus ou “gritz” são assim designados uma vez que ao contrário da cevada, não foram sujeitos ao processo de maltagem. Outra das distinções em relação ao malte é o facto do “gritz” não conter enzimas e ter um elevado teor de amido. De referir que, este elevado teor de amido reduzirá a possibilidade de formação de precipitados na cerveja após a fermentação, reduzindo assim o aparecimento de turvação no produto final.

O xarope de açúcar ou glucose é um açúcar fermentável que contribui para o crescimento e desenvolvimento da levedura e, por último, o açúcar caramelizado ou caramelo tem como função o aumento da cor e do aroma da cerveja.

Uma vez apresentadas as matérias-primas e subsidiárias utilizadas neste processo de produção, estamos em condições de proceder à descrição das etapas processuais que conduzem à produção da cerveja. Este processo pode ser dividido em três etapas fundamentais: a fabricação do mosto, a fermentação e, por último, a filtração da cerveja.

2.2.2. FABRICAÇÃO DO MOSTO

A etapa de fabricação do mosto é também conhecida como brassagem e pode ser dividida nas etapas de moagem do malte, empastagem do malte, caldas, sacarificação, filtração, ebulição, clarificação, arrefecimento e oxigenação do mosto. É durante esta etapa que se definem características finais do produto como a atenuação (descrita mais à frente), a cor, o conteúdo alcoólico e o amargor [6]. A fabricação do mosto é essencial uma vez que vai produzir os nutrientes essenciais para a fermentação. A sua composição é rica em açúcares, aminoácidos, vitaminas, iões inorgânicos e lípidos [5].

Inicialmente as matérias-primas malte e “gritz” são sujeitas a um processo de limpeza com o intuito da remoção de impurezas que possam ser prejudiciais ao processo, como é o caso dos metais.

A moagem do malte é depois efectuada para obter uma distribuição granulométrica que favoreça as etapas que se seguem, isto é, que ajude à extracção e conversão dos constituintes do malte em água. O “gritz” não é moído uma vez que já se encontra no tamanho desejado, mas se tal não se verificar também poderá ser sujeito a uma operação de redução de tamanho. O equipamento utilizado para cumprir este objectivo é o moinho de martelos, e a operação é designada de moagem seca, uma vez que os grãos são moídos sem qualquer adição de água. O tamanho de partícula obtido no final da moagem deve cumprir dois objectivos - devem ser suficientemente finas para maximizar o rendimento da extracção, mas o seu processamento deve minimizar os danos nas cascas que servirão de meio filtrante na etapa de filtração subsequente [6].

Segue-se a empastagem do malte que ocorre na caldeira de empastagem. De uma forma global, trata-se da mistura do malte com água tépida, possibilitando assim a ocorrência das reacções bioquímicas de desdobramento das moléculas mais complexas, como o amido e proteínas, em moléculas mais simples e solúveis, pela acção das enzimas do

malte. As enzimas responsáveis por estas transformações pertencem aos grupos das enzimas amilolíticas e proteolíticas, convertendo o amido e as proteínas em açúcares simples e aminoácidos, respectivamente. A eficiência do processo de empastagem é de extrema importância para que seja possível obter um extracto – substâncias solubilizadas no mosto – com características adequadas para a produção de cerveja. Na caldeira de empastagem, ou em etapas posteriores, são adicionados aditivos, como o cloreto de cálcio e o ácido fosfórico. O primeiro é um co-factor das enzimas, enquanto o segundo tem como função o ajuste de pH.

Na caldeira das caldas é efectuado o tratamento ao “gritz”, que como acima referido, não tem enzimas. Desta forma, é necessário adicionar à caldeira das caldas uma mistura de malte e água proveniente da caldeira de empastagem, possibilitando assim a ocorrência de reacções bioquímicas. Após a conversão das moléculas complexas de amido em açúcares simples, a mistura presente na caldeira das caldas é reencaminhada para a caldeira de empastagem. De referir que nem todas as cervejas tem na sua constituição os grãos crus, pelo que a etapa das caldas pode não ser necessária, funcionando apenas a caldeira de empastagem.

A sacarificação pode ser definida como a última etapa de degradação enzimática do mosto, ou seja, onde se garante que todo ou a maior parte do amido e compostos complexos foram degradados em moléculas mais simples. Durante todas estas operações são mantidas sob controlo variáveis importantes, como pH, temperatura e tempo.

A filtração tem como intuito remover a fase sólida da fase líquida, seguindo no processo o líquido límpido isento de sólidos - mosto, ficando a fase sólida, denominada de “drêche”, como um sub-produto do processo. Este sub-produto pode ser vendido para a nutrição animal, uma vez que na sua composição estão as matérias-primas que não solubilizaram na fase de fabricação, tais como as cascas, proteínas e lípidos. Esta operação é efectuada num filtro prensa e globalmente divide-se em duas fases, o isolamento do mosto e a lavagem da “drêche” que tem como objectivo recuperar o mosto residual [6].

A ebulição do mosto tem como objectivos a solubilização dos compostos de amargo e aromáticos do lúpulo que é adicionado nesta fase, a esterilização do mosto, a inactivação das enzimas, a precipitação de substâncias prejudiciais, como é o caso de proteínas de elevado peso molecular, e, por último, a concentração do mosto. Este foi diluído durante a lavagem que ocorre no filtro, e necessita de ser concentrado nesta fase através da eliminação do excesso de água, para que se atinja a concentração em açúcares pretendida. É ainda de

referir, relativamente à adição do lúpulo, que é necessário existir um compromisso entre a temperatura e o tempo em que este é adicionado, uma vez que são necessárias temperaturas elevadas para que ocorra a dissolução, mas à temperatura de ebulição pode ocorrer evaporação de alguns constituintes do lúpulo. Desta forma, a adição deste componente pode ser feita gradualmente ou por fases.

A clarificação é a etapa responsável por tornar o mosto num líquido límpido, livre de matérias em suspensão, que iriam causar efeitos negativos na fermentação, dando características indesejáveis à cerveja. Tal é alcançado pela acção da força centrípeta, num decantador denominado de “whirlpool”.

A passagem do mosto clarificado por um permutador de calor, permite o arrefecimento deste para valores de temperatura que sejam favoráveis ao crescimento e desenvolvimento da levedura que lhe vai ser adicionada.

Dado que a levedura necessita de oxigénio para que se inicie o seu crescimento, o mosto frio vai ser oxigenado. O controlo desta operação é fundamental para o processo, pois uma má condução da oxigenação pode implicar problemas de aroma e sabor no produto final. De referir ainda que a oxigenação pode ser efectuada com oxigénio ou com ar, consoante a geração da levedura que se vai utilizar no processo. No caso de uma levedura da geração zero, ou seja, que ainda não foi utilizada em nenhuma fermentação, a oxigenação é feita com oxigénio, para o caso de leveduras de gerações superiores a zero, isto é, leveduras que já foram utilizadas em fermentação, a oxigenação é feita com ar.

A correcção do extracto (medido em termos de açúcares no mosto) é efectuada nesta fase, denominando-se a etapa de standardização do mosto. No entanto, esta etapa só se torna necessária no caso do extracto não se encontrar dentro dos limites previamente estipulados.

2.2.3. FERMENTAÇÃO

Como anteriormente salientado, a fermentação é a etapa mais importante de todo o processo cervejeiro, pois é a fase em que o mosto é transformado em cerveja por acção da levedura.

Para que se dê início à fermentação é necessário adicionar-se a levedura ao mosto previamente arrefecido e arejado. Na indústria, a adição de levedura ao mosto é designada por sementeira. A quantidade de levedura a semear deve ser a mais precisa possível, para

que sejam evitados problemas como autólises e contaminações das células de levedura, fermentações mal conduzidas, e a geração de aromas inconvenientes [6].

É ainda importante referir que a selecção da levedura tem em conta importantes parâmetros, como a atenuação que se refere à capacidade da levedura em fermentar os açúcares do mosto, a floculência que como o próprio nome indica diz respeito à capacidade de formar aglomerados e sedimentar, a velocidade de multiplicação da levedura e, por último, a produção de aromáticos. Feita então a selecção da levedura tendo em conta os parâmetros atrás enunciados, esta terá de ser preservada e mantida no laboratório, para que se possa dispor sempre duma cultura pura.

A fermentação pode então ser definida como o efeito cumulativo do crescimento da levedura no mosto, resultando no aparecimento da cerveja, isto é, a levedura vai consumindo os nutrientes do mosto, ocorrendo assim a sua multiplicação e crescimento, e através de reacções biológicas vai dando origem ao produto desejado [5]. Quando no final da fermentação se procede à recolha da levedura, é possível utilizá-la novamente para semear novos mostos, dando desta forma origem a cervejas do mesmo tipo. É importante referir que, no caso de se utilizar uma levedura diferente da usada habitualmente, a cerveja produzida será diferente.

Novas gerações de levedura são propagadas em tanques de propagação, onde se encontra mosto com características perfeitas que vai ser inoculado com levedura proveniente da cultura pura. Dos tanques de propagação, a levedura passa para uma cuba de fermentação onde a sua propagação vai continuar.

O processo de fermentação inicia-se quando a mistura – mosto e levedura – é encaminhada para os tanques cilindro-cónicos onde se desenrola o processo biológico. Estes tanques são comumente designados de cubas de fermentação.

Durante a fermentação podemos identificar a ocorrência de quatro fases distintas. A primeira fase, denominada de **fase “lag” ou de respiração**, é a fase de adaptação da levedura ao meio. Esta é caracterizada pela propagação da levedura, consumo de todo o oxigénio do mosto e utilização das reservas da levedura como fonte de energia, uma vez que a assimilação de açúcares do mosto é praticamente inexistente. A reacção que representa esta fase é $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O + Energia$.

A fase que se segue é a **fase de crescimento**, caracterizada essencialmente pela multiplicação intensa das células de levedura. Nesta fase e fases subsequentes, e uma vez que todo o oxigénio foi consumido, estamos em condições de anaerobiose.

A terceira fase é conhecida como a **fase de fermentação**. Nesta fase as reacções biológicas de consumo de açúcares do mosto dão origem ao álcool e dióxido de carbono e outros produtos secundários responsáveis pelo aroma e sabor característicos da cerveja. A reacção de fermentação alcoólica é dada por $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2CO_2 + 2CH_3CH_2OH + Energia$.

O final da fase de fermentação é caracterizado pela diminuição do extracto e pela agregação das células de levedura, que começam então a flocular.

A última fase, denominada de **fase estacionária**, ocorre quando os agregados de células de levedura começam a acumular-se no fundo da cuba de fermentação, ou seja, sedimentam. Esta fase é também caracterizada pela redução do metabolismo da levedura [7]. Devido à libertação de calor decorrente da fermentação, é necessário efectuar o arrefecimento das cubas de fermentação, para que esta ocorra a temperatura controlada. O fim da fermentação ocorre quando já não existem açúcares fermentescíveis na cerveja [6].

O dióxido de carbono produzido pela fermentação é tóxico para a levedura [5]. Este gás é reencaminhado para a sala de recuperação de energia, onde será purificado, de forma a ser possível a sua utilização no processo quando é necessária a adição de dióxido de carbono na cerveja. Se estiver em excesso pode ainda ser vendido.

Ainda relativamente à fermentação é importante salientar que durante o processo cervejeiro vão chegando, ao longo do tempo, às cubas de fermentação mostos arejados, o que por um lado favorece a multiplicação da levedura, mas por outro favorece a formação de um subproduto indesejável da fermentação, o diacetilo. Durante a fase de maturação a baixas temperaturas, a concentração deste subproduto baixa até que este não seja detectável [3].

As etapas posteriores à fermentação são a maturação da cerveja seguida da estabilização coloidal da mesma. Com o abaixamento da temperatura na etapa de maturação, a levedura sedimenta depositando-se na base das cubas de fermentação, sendo possível a sua recolha para posterior utilização. O processo de recolha deve ser efectuado o mais atempadamente possível com o intuito de evitar a ocorrência de autólise. A levedura recolhida é armazenada em tanques verticais denominados tanques de stockagem. Estes tanques são arejados e agitados de forma a diminuir a ocorrência de células mortas. Após

algumas sementeiras a levedura vai degenerando, sendo por isso desprezada e substituída por uma levedura propagada a partir da cultura pura. Industrialmente, a levedura é desprezada quando se encontra na sétima ou oitava geração, seguindo para um filtro onde se recupera alguma cerveja que, se se encontrar dentro das especificações, será reintroduzida no processo no início da linha de filtração. É prática corrente a lavagem ácida da levedura para evitar a contaminação desta por microrganismos nocivos. Esta lavagem ácida é efectuada nos tanques de stockagem e apenas às leveduras pertencentes a gerações ímpares. Outro ponto a reter é o tempo de permanência da levedura nos tanques de stockagem, que não deve ser superior a 5 dias, sob a pena da levedura se tornar inutilizável.

As etapas de maturação e estabilização coloidal, também designadas por guarda, têm como principais objectivos a maturação, a deposição da levedura e outros precipitados e ainda a estabilização físico-química. Durante o período de maturação da cerveja, e uma vez que ainda se encontra levedura no meio, ocorre a eliminação de compostos voláteis, como é o caso do diacetilo, responsáveis por um sabor indesejável da cerveja. É também durante a maturação que ocorre a excreção de compostos da levedura que vão contribuir beneficemente para o corpo e características da cerveja. A fase que se segue à maturação é autólise, que corresponde à auto-destruição das células, sendo esta uma fase a evitar uma vez que pode conferir um aroma e gosto desagradável à cerveja.

A estabilização coloidal é alcançada pela eliminação de complexos formados pelas proteínas e taninos, que vão precipitar quando em condições de baixas temperaturas. A presença destes compostos iria causar turvação no produto final.

2.2.4. FILTRAÇÃO

Por requisitos do mercado a que se destina, este produto deve apresentar-se límpido, transparente e brilhante. Para tal efectua-se a etapa de filtração, também conhecida por clarificação, antes da cerveja ser enviada para o enchimento. O objectivo essencial da clarificação é o de remover por completo todas as substâncias que se encontram em suspensão na cerveja, vulgarmente designadas de turvação. Para além da remoção da turvação, a etapa de clarificação confere também à cerveja estabilidade biológica e química.

As substâncias que dão origem à turvação da cerveja são algumas células de levedura que não sedimentam e precipitados originários do malte e do lúpulo que já se encontravam solubilizados mas que, por alterações de natureza físico-química que ocorreram no meio, reprecipitaram.

Todo o processo de clarificação da cerveja deve ser operado a baixas temperaturas, com o intuito de evitar a chamada turvação ao frio, e ainda, se deve evitar a entrada de oxigénio no processo, quer na filtração quer nas etapas a jusante. A entrada de oxigénio e a sua consequente dissolução na cerveja tem um efeito muito nefasto, uma vez que provoca reacções de oxidação com os seus componentes e torna o produto intragável [6].

A clarificação da cerveja inicia-se então com uma centrifugação à cerveja proveniente da fermentação, com o intuito de lhe retirar o que resta de levedura, facilitando desta forma a filtração que se segue e prevenindo assim a ocorrência de autólise da levedura e a proliferação de possíveis contaminações bacteriológicas devido à presença desta. A centrífuga de discos utilizada é então um elemento de pré-clarificação, uma vez que a turvação que segue no processo será tratada pelo seguinte equipamento de clarificação – o filtro de velas ou filtro de “kieselghur”.

O filtro de velas é constituído por cilindros de aço inoxidável onde se depositará o meio filtrante. O meio filtrante utilizado é uma suspensão de terra de diatomáceas ou “kieselghur”, donde surge o nome do filtro.

A suspensão de “kieselghur” é produzida num tanque agitado auxiliar. O agitador utilizado neste equipamento deve ter como característica o facto de não emulsionar ar, com intuito de evitar a dissolução de oxigénio na cerveja. A suspensão é uma mistura de “kieselghur” com água desarejada e carbonatada, mantida homogénea pela acção do agitador acima referido.

Esta suspensão é alimentada ao filtro começando a depositar-se uma camada sobre as velas do filtro, dando origem ao leito filtrante ou pré-camada. Após formada a pré-camada prossegue-se com a filtração da cerveja, ficando as partículas responsáveis pela turvação retidas no leito filtrante e passando através deste o líquido límpido. A par com a suspensão de “kieselghur”, as leveduras e as proteínas vão formar o bolo de filtração. A quantidade de turvação dita a quantidade de “kieselghur” a adicionar, que é tanto maior quanto mais turva se encontrar a cerveja. Ao longo do tempo de filtração o filtro vai ficando obstruído, devido à deposição de impurezas no leito filtrante. Para que não ocorra obstrução completa do filtro é usual adicionar-se suspensão de “kieselghur”, para que o leito se mantenha poroso e operacional durante mais tempo.

A próxima fase da clarificação ocorre no filtro de placas ou filtro PVPP, onde a principal função é a de remover os polifenóis, originários do lúpulo, evitando assim a formação de turvação a longo prazo. O PVPP (poli-vinil-poli-pirrolidona), que dá o nome ao

filtro, é um adjuvante da filtração atraindo para si os polifenóis e é adicionado à cerveja após a saída desta do filtro de “kieselghur”. É frequente que após a sua utilização, o PVPP seja regenerado e reutilizado [6].

Após a passagem no filtro PVPP são adicionados à cerveja aditivos como o amargor (lúpulo), extracto de malte para o acerto da coloração e o KMS (metabissulfito de potássio), o qual tem como função captar o oxigénio que possa ter entrado na linha de filtração.

Antes da passagem no último elemento clarificador, os filtros Trap, a cerveja dá entrada no carbonatador onde se adiciona o dióxido de carbono à cerveja de modo a ajustar o seu valor para o pretendido no produto final. É também adicionada à cerveja água desarejada com o intuito de a diluir e regular a sua concentração. É necessário ter em atenção que quanto se efectua esta diluição estamos também a afinar para um valor final todos os outros parâmetros físico-químicos que caracterizam a cerveja, tais como a cor, o extracto, o álcool, o amargo e o pH [6].

Após a passagem da cerveja nos filtros Trap, que tem como intuito o de refinar a operação de clarificação uma vez que são filtros capazes de realizar uma filtração rigorosa e de remover todos os microrganismos da cerveja, esta é encaminhada para os tanques de cerveja filtrada. A sua permanência nestes tanques não deve ser superior a cinco dias, pois após esse período a cerveja terá de ser novamente filtrada.

2.2.5. PRODUTO FINAL

Dos tanques de cerveja filtrada, a cerveja é conduzida para a zona de enchimento, onde este produto será acondicionado nas diversas formas em que se apresenta no mercado, isto é, em garrafa, lata ou em barril. No entanto, antes ou após o enchimento, é necessário proceder à pasteurização, conferindo assim estabilidade biológica ao produto final, pela eliminação de microrganismos patogénicos que nele possam existir. No caso do enchimento de garrafas e latas, a operação de pasteurização é efectuada após o enchimento destas embalagens, sendo este processo conhecido como pasteurização túnel. Já no caso do enchimento dos barris, a pasteurização é efectuada antes do enchimento dos mesmos, sendo este processo denominado de pausteurização flash. O produto final encontra-se então pronto para ser distribuído pelos diversos pontos de venda do país e do mundo.

2.3. CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX

Ao longo das diversas etapas deste processo é efectuada um rigoroso controlo de qualidade, que vai desde as matérias-primas até ao produto final. A contagem de células de

levedura pelo método Sysmex, sobre o qual recai o âmbito deste trabalho, é disso um exemplo. Esta contagem está inserida na fase de fermentação do processo cervejeiro.

A amostragem necessária à contagem é feita nos tanques de stockagem, nas cubas de fermentação e nos tanques de propagação.

A recolha de amostras nos tanques de stockagem é efectuada cerca de duas horas após a recolha da levedura dos tanques de fermentação, encontrando-se o tanque de stockagem sob agitação. A análise as esta amostras é feita com o intuito de determinar o número de células de levedura para, desta forma, ser possível determinar a quantidade de levedura a semear na próxima cuba de fermentação em que esta levedura vai ser utilizada.

A análise efectuada a amostras provenientes das cubas de fermentação tem como objectivo determinar a quantidade de células presentes naquele volume e verificar/supervisionar o cálculo e procedimento de sementeira efectuada. Esta amostragem é realizada após todo o volume da cuba estar completo, ou seja, após lhe terem sido adicionados todos os mostos.

Por último, a análise efectuada a amostras provenientes dos tanques de propagação permite constatar se o comportamento da levedura propagada é o esperado, ou seja, verificar o seu crescimento ao longo de todas as fases da propagação.

2.4. LEVEDURA CERVEJEIRA

Durante a descrição do processo de produção já foram feitas algumas referências à levedura cervejeira. Contudo, como se trata de uma parte tão importante do processo e para este trabalho, será feita uma descrição mais detalhada deste tipo de microrganismo.

A levedura é um microrganismo vivo e unicelular que pertence ao Reino dos fungos. As suas células apresentam uma forma oval com tamanhos que variam entre os 6 e 9 μm [8]. A levedura utilizada no processo cervejeiro pertence ao género *Saccharomyces* [7]. O género *Saccharomyces sensu stricto* inclui algumas das espécies mais importantes na indústria alimentar como é o caso da espécie *Saccharomyces cerevisiae*, levedura utilizada na produção de vinho, de pão, de cerveja e de sakê. A espécie *Saccharomyces bayanus* é utilizada também na produção de vinho e cidra. Por último, a espécie *Saccharomyces pastorianus*, também designada por *Saccharomyces carlsbergensis* ou *Saccharomyces uvarum*, utilizada na produção de cerveja [5]. Na literatura, a levedura cervejeira é comumente denominada de *Saccharomyces cerevisiae*.

O tipo de reprodução que ocorre nas células de levedura é denominado de gemulação. Neste tipo de reprodução assexuada ocorre a duplicação do material genético no núcleo da célula, assegurando desta forma que as células-filhas herdem exactamente as mesmas potencialidades da célula que lhes deu origem, também denominada de célula-mãe. Após a duplicação nuclear, o núcleo-filho migra para a extremidade da célula, sendo posteriormente rodeado por uma parte do citoplasma e dando origem a uma gémula, que é a precursora da célula-filha [8]. Na figura 3 encontra-se representada uma levedura em divisão. É este tipo de reprodução que ocorre numa cuba de fermentação, tornando desta forma possível recolher e utilizar novamente a levedura em fermentações posteriores.

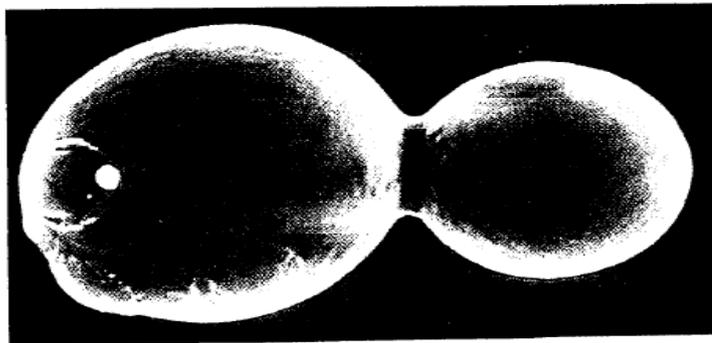


Figura 3 - Fotografia de uma levedura *Saccharomyces cerevisiae* em gemulação, obtida por microscópio electrónico de varrimento (retirada de Rodrigues [7]).

A levedura cervejeira é apenas capaz de um número limitado de divisões, de 10 a 30, deixando cada divisão uma “cicatriz” na célula de levedura, sendo desta forma possível, através de técnicas como a microscopia electrónica, inferir sobre o número de divisões efectuados por uma célula [9].

A grande importância industrial das leveduras deve-se aos distintos processos metabólicos de que estes microrganismos são capazes. Na presença de oxigénio, as leveduras apresentam uma taxa de crescimento elevada quando se encontram em meios ricos em hidratos de carbono e originam como produto do seu metabolismo o dióxido de carbono. Já em condições de anaerobiose e abundância de açúcares, observa-se uma diminuição da taxa de crescimento deste microrganismo, e os produtos obtidos são o dióxido de carbono e o etanol. Este processo biológico é também conhecido como fermentação alcoólica [7].

A classificação da levedura cervejeira baseia-se essencialmente no comportamento deste microrganismo ao flocular. No entanto, existem outras características fenotípicas, genéticas, de crescimento e de metabolismo que permitem efectuar a distinção entre

leveduras utilizadas para a produção de cerveja. Tradicionalmente temos as leveduras do tipo “ale” e do tipo “lager”, sendo que estas designações também servem para distinguir os diferentes tipos de cerveja a que dão origem. Na tabela 1, são indicadas algumas dessas características, bem como as diferentes designações da levedura [5, 7, 10].

Tabela 1 – Características que distinguem os diferentes tipos de levedura empregues no processo cervejeiro.

TIPO DE LEVEDURA	CARACTERÍSTICAS
Levedura do tipo “ale”	No final da fermentação as leveduras ascendem ao topo das cubas de fermentação, devido às características hidrofóbicas da sua membrana celular;
Levedura de fermentação alta; “top fermenting”; <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	Fermentação a temperaturas mais elevadas (18-24°C); Não utiliza o dissacarídeo melibiose; Podem crescer a 37°C;
	Processo de fermentação mais rápido.
Levedura do tipo “lager”	No final da fermentação as leveduras sedimentam no fundo das cubas de fermentação, devido às características hidrofílicas da sua membrana celular;
Levedura de fermentação baixa; “bottom fermenting”; <i>Saccharomyces uvarum</i> ; <i>Saccharomyces carlsbergensis</i> ; <i>Saccharomyces pastorianus</i> .	Fermentação a temperaturas mais baixas (8-14°C); Utiliza o dissacarídeo melibiose, uma vez que possui o gene que produz a enzima extracelular α -galactosidase; Não apresenta crescimento a temperaturas superiores a 34°C;
	Processo de fermentação mais lento.

A levedura mais utilizada industrialmente é a levedura do tipo “lager” e é também aquela que é utilizada no processo de produção de cerveja da Unicer.

Os dois tipos de levedura atrás referidos efectuem de uma maneira geral a mesma função, ou seja, convertem os açúcares do mosto em álcool e gás carbónico. No entanto, as cervejas produzidas por cada tipo/espécie de levedura apresentam sabores distintos. Tal é devido a diferenças bioquímicas de metabolismo, que têm como consequência a formação de substâncias, mesmo que em quantidades muito pequenas, que são capazes de conferir aroma e sabor [10]. O mesmo acontece quando numa mesma instalação industrial se utilizam diferentes estirpes, que são variações de uma espécie de levedura, como é o caso da Unicer. As marcas de cerveja produzidas por esta empresa são essencialmente a SuperBock, a Cristal e a Carlsberg. As duas primeiras marcas são obtidas utilizando uma estirpe de levedura do tipo “lager” denominada industrialmente de levedura US (“Unicer Strain”), enquanto a última marca, é obtida utilizando o mesmo tipo de levedura, mas de uma estirpe diferente, denominada na indústria de levedura CB (“Carlsberg”). Para além das diferenças

de metabolismo acima citadas, estas duas estirpes apresentam também diferenças de carácter morfológico, designadamente a levedura CB é de tamanho inferior à levedura US.

2.4.1. DADOS HISTÓRICOS

Durante a realização do presente estágio foram efectuadas contagens de células de levedura em diferentes amostras para aquisição de conhecimento prático da técnica analítica. Esses dados ajudam nesta fase a caracterizar as diferentes estirpes de levedura utilizadas – levedura US e CB.

A figura 4 refere-se à levedura US em fermentação, enquanto as figuras 5, 6 e 7 se referem à levedura US em stockagem e, por último, a figura 8 diz respeito à levedura US em propagação.

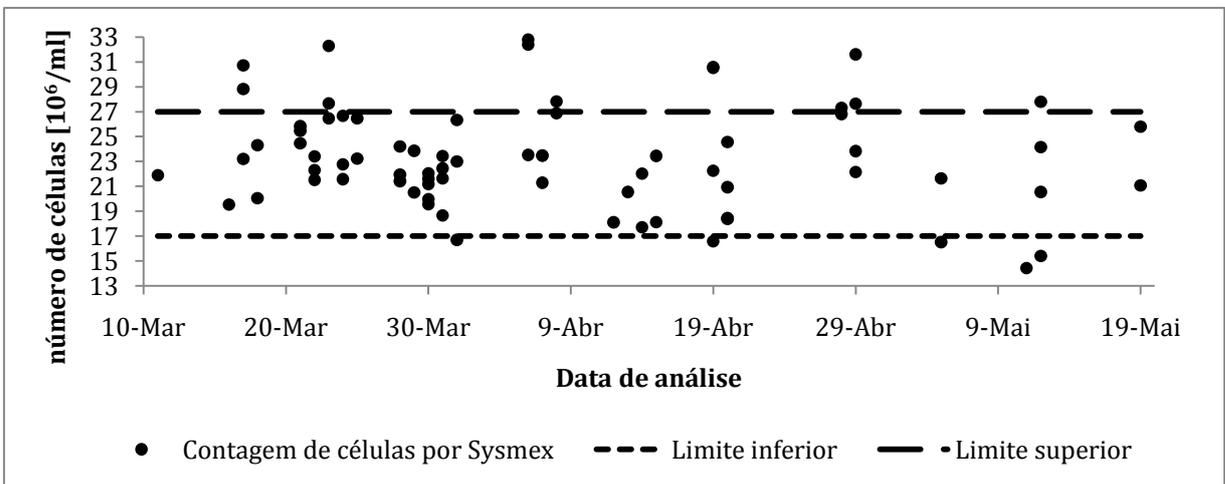


Figura 4 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura US em fermentação.

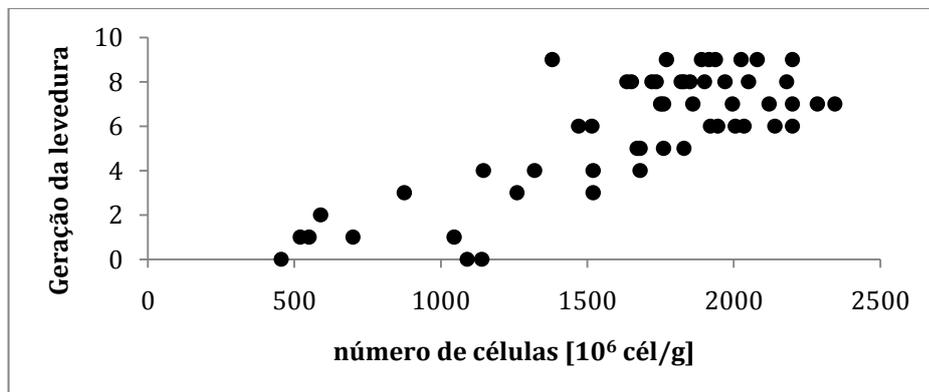


Figura 5 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura US em stockagem.

Através da análise à figura 4 podemos verificar que existem limites estabelecidos para o número de células de levedura em fermentação, sendo que os limites superior e inferior são, respectivamente, de 27 e 17 milhões de células por mililitro. É também observável nesta figura que, os valores obtidos para algumas das amostras analisadas se encontram fora destes limites. Os erros que conduzem à obtenção destes resultados anómalos serão devidamente identificados e, propostas medidas correctivas no Capítulo 5.

A figura 5 relaciona a contagem de células e a geração da levedura em stockagem. Observa-se que à medida que a aumenta a geração da levedura também o seu número de células aumenta. A figura 6 exhibe a percentagem de células mortas da levedura em stockagem. Verifica-se também nesta figura que existe um limite máximo de 15% de células mortas que uma levedura US em stockagem deve cumprir, uma vez que se a percentagem de células mortas for muito elevada a levedura deve ser rejeitada. A associação destes dois parâmetros, número de células e viabilidade, é necessária uma vez que são estes que permitem efectuar o cálculo da quantidade de levedura a semear no processo. Finalmente, a figura 7, relaciona a percentagem de células mortas com a geração da levedura. À semelhança do comportamento exibido na figura 5, também com o aumento da geração da levedura se verifica maior ocorrência de células mortas.

Por último, na figura 8 encontra-se representado a evolução do número de células de uma levedura US em propagação ao longo das várias fases, que serão descritas mais à frente neste trabalho. O número de células nos propagadores (laboratorial e industriais) é superior ao número de células nas cubas de fermentação industriais, uma vez que nos propagadores o volume de mosto em que a levedura se encontra diluída é muito inferior ao volume de mosto que se encontra numa cuba de fermentação industrial. Obtém-se assim uma diluição da levedura superior nas cubas de fermentação industrial, daí que o número de células de levedura por mililitro ser muito inferior nesse caso.

A figura 9 refere-se à levedura CB em fermentação, enquanto as figuras 10, 11 e 12 se referem à levedura CB em stockagem e, por último, a figura 13 diz respeito à levedura CB em propagação.

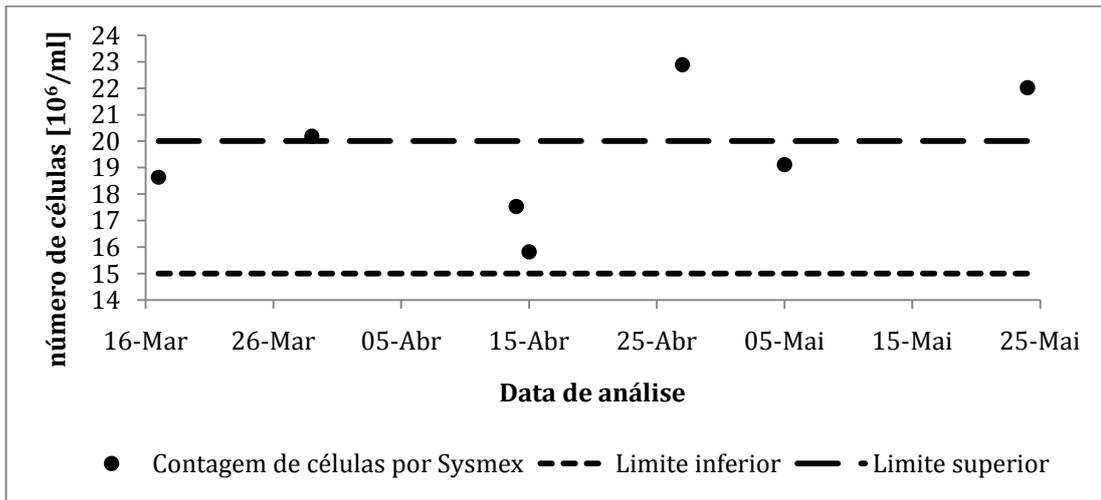


Figura 9 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura CB em fermentação.

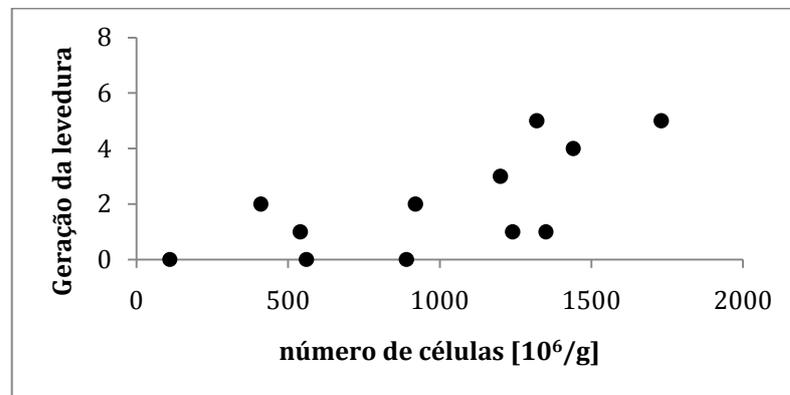


Figura 10 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura CB em stockagem.

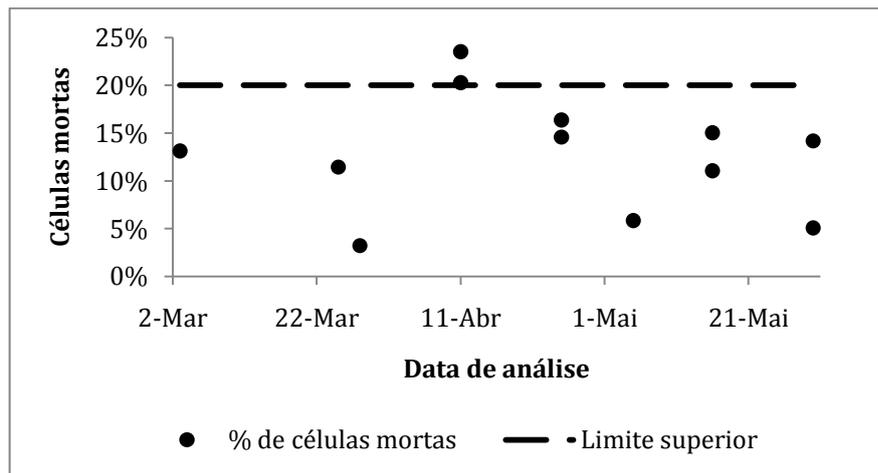


Figura 11 – Resultados da determinação da viabilidade da levedura em amostras de levedura CB em stockagem.

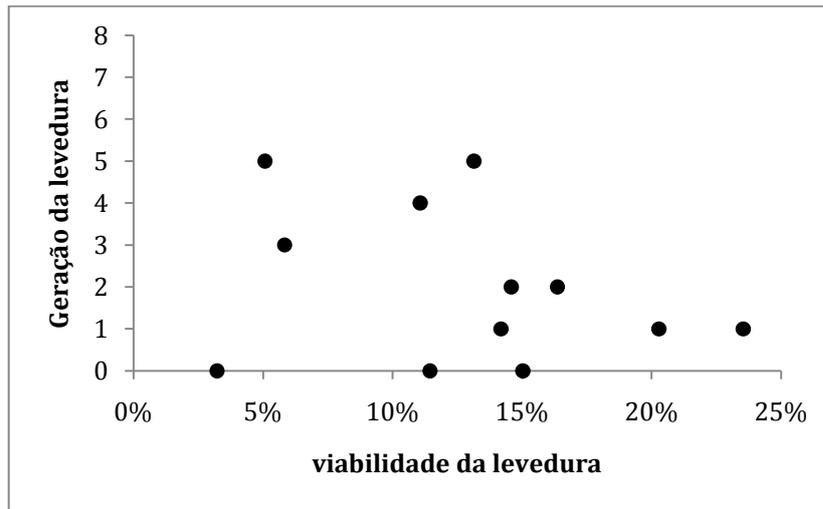


Figura 12 – Relação entre a viabilidade e geração da levedura em amostras de levedura CB em stockagem.

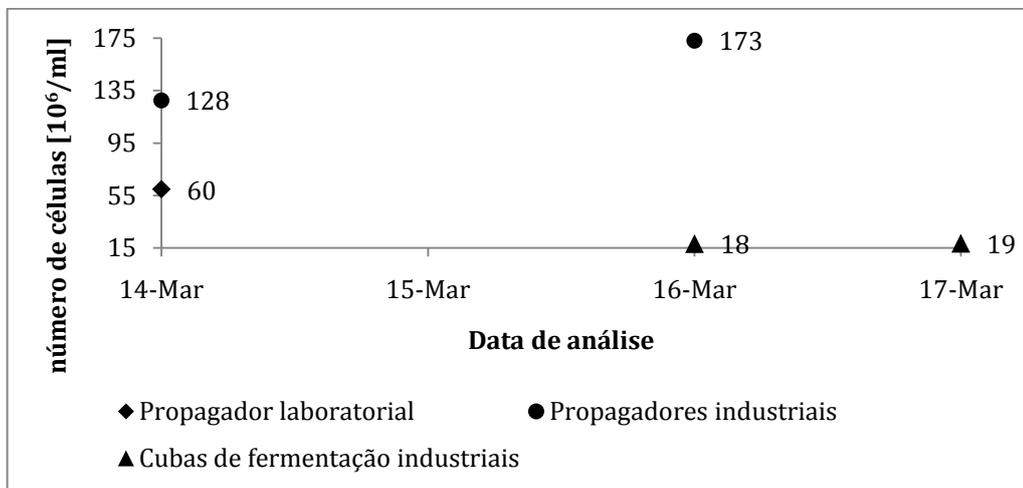


Figura 13 – Resultados da contagem de células de levedura por Sysmex em amostras de levedura CB em propagação.

Todas as considerações tomadas anteriormente para as figuras 4 a 8 são aplicáveis também às figuras 9 a 13. Há apenas a distinguir os limites superior e inferior do número de células em fermentação, que para uma levedura CB, tomam os valores de 20 e 15 milhões de células por mililitro, respectivamente (figura 9). O número de células mortas numa levedura CB não deve ultrapassar os 20%, sendo também esta uma característica que distingue a levedura CB da US (figura 11). O comportamento que a levedura CB exibe no gráfico 12 não é muito semelhante ao comportamento da levedura no gráfico 10, onde se verifica uma relação mais “linear” entre o número de células e a geração da levedura. No entanto, ainda assim a figura 12 indica que com o aumento da geração da levedura, ocorre também o aumento do número de células mortas.

CAPÍTULO 3: MÉTODOS DE CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA

Procede-se agora à exposição da revisão bibliográfica que foi efectuada para uma melhor assimilação de conceitos e percepção da problemática em estudo. Como a grande maioria das técnicas analíticas, também a contagem de células de levedura foi sofrendo evoluções ao longo dos tempos, desde métodos unicamente dependentes do experimentalista e morosos a métodos cada vez mais automatizados e expeditos.

A procura de novas tecnologias de contagem de células apresenta-se como uma mais-valia para os processos biotecnológicos, dos quais o processo cervejeiro faz parte. É de extrema importância para o fabrico de cerveja, o conhecimento do número de células de levedura e a sua viabilidade (percentagem de células mortas), sendo assim possível efectuar uma sementeira de levedura correcta, alcançando um bom desempenho da fermentação e um produto final de qualidade e boas características organolépticas [7]. Os problemas causados por uma sementeira elevada de levedura passam pela diminuição do tempo do processo fermentativo, conduzindo a problemas como baixa viabilidade da levedura, perda de amargura, problemas durante a filtração e aumento do risco de autólise. No caso de se efectuar uma sementeira baixa de levedura, como seria de esperar, irá resultar num processo fermentativo mais demorado, tendo isso consequências económicas negativas no processo [11]. Desta forma, e como acima referido, é necessário ter dados exactos sobre o número de células de levedura e a sua viabilidade.

Durante esta abordagem aos métodos de contagem de células de levedura vai ser feita também referência ao método utilizado na Unicer, efectuando a comparação deste com as restantes técnicas em termos de vantagens e desvantagens. Interessa ainda referir que também vão ser feitas referências a métodos de determinação da viabilidade da levedura, especialmente no caso em que a medição da viabilidade da levedura está associada ao método de contagem de células.

Antes de abordar os métodos encontrados na literatura, interessa definir o que se entende e qual a importância da contagem de células de levedura. Segundo alguns autores, contagem de células corresponde à tarefa de obter o número de células totais de uma amostra [12]. Para além do já referido acima, a contagem de células de levedura é muito importante nos processos fermentativos, pois permite o aumento da produtividade do processo [13].

Foi apurado que, de uma forma geral, a contagem de células de levedura pode ser efectuada por:

- 3.1. Visual ou Lupa;
- 3.2. Microscopia;
- 3.3. Citometria de fluxo;
- 3.4. Métodos Electroquímicos.

3.1. VISUAL OU LUPA

A contagem de células de levedura viáveis pode ser efectuada por simples observação directa ou com recurso a uma lupa, determinando o número de células capazes de formar colónias num meio de cultura propício ao desenvolvimento do microrganismo em análise. Para tal, assume-se que cada célula viável dará origem a apenas uma colónia. A cultura do microrganismo é efectuada em placas de Petri, onde se deposita um meio de cultura adequado e posteriormente se incuba o microrganismo a analisar, sendo esta cultura efectuada em condições assépticas. O resultado é expresso em Unidades Formadoras de Colónias por ml (CFU/ml – “Colony-Forming Units per mililiter”) [14].

Algumas das limitações deste método é o facto de ser muito moroso, devido ao período de tempo necessário para a incubação [15] e, pelo facto de células agregadas darem origem a apenas uma colónia, o que contraria o que inicialmente se assume, ou seja, que apenas uma células dará origem a uma colónia [14]. Outra desvantagem apontada a este tipo de método está relacionada com a ausência de colónias após o período de incubação. Tal facto conduziria à conclusão de que as células se encontravam mortas no momento em que se efectuou a amostragem, o que pode não corresponder à realidade, uma vez que têm vindo a encontrar-se evidências de estados intermediários das células que permanecem indetectáveis aos métodos tradicionais. As células em estados intermediários são normalmente referidas na literatura como viáveis mas não cultiváveis (VBNC – “viable but non-culturable”), tornando assim difícil a classificação das células como viáveis ou não viáveis devido a muitos factores, como por exemplo, o meio de incubação no laboratório não corresponder exactamente ao meio em que as células se encontram durante o processo industrial, entre outros [16].

Este método na indústria é usado normalmente na procura de problemas de contaminação em vários pontos do processo e não na contagem de células propriamente dito.

3.2. MICROSCOPIA

Um dos métodos mais utilizados para a contagem de células é a contagem directa de células de levedura com recurso ao microscópio e à câmara de contagem de Neubauer, também conhecida por hemacitómetro.

De uma forma geral, neste método utiliza-se uma suspensão diluída da amostra a analisar que vai ser colocada na câmara de contagem de Neubauer e observada ao microscópio. O que torna possível efectuar a contagem neste método é o facto do hemacitómetro se encontrar dividido em quadrados de dimensões bem definidas, sendo assim o seu volume conhecido. Uma figura representativa do hemacitómetro encontra-se na figura 14.

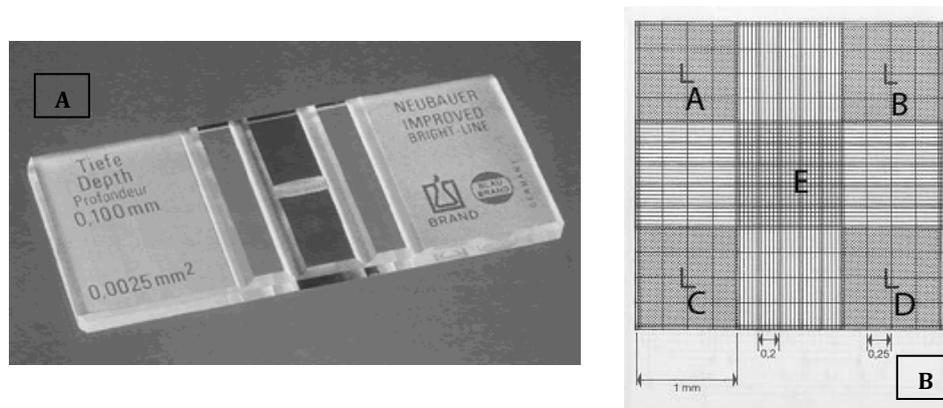


Figura 14 - (A) Câmara de contagem de Neubauer. (B) Observação ao microscópio da câmara de contagem de Neubauer (retirada de <http://analgesi.co.cc/html/t25246.html> [17]).

Embora seja um método fácil e simples de aplicar, a este estão associadas algumas limitações tais como: a não distinção das células vivas das células mortas, a dificuldade de contagem de células no microscópio devido ao fraco contraste entre as células e o meio que as circunda, e a baixa precisão que o método apresenta, sendo esta dependente da técnica do experimentalista [18]. Outras das desvantagens associadas a este método passam pela susceptibilidade de contaminação da amostra que é depositada no hemacitómetro e, ainda relativamente à amostra, esta pode não ser homogénea e, desta forma, levar a um desvio nos resultados da contagem de células de levedura [12].

O método que seguidamente se apresenta é muito utilizado industrialmente, inclusive na Unicer, para a determinação da viabilidade da levedura e uma evolução do método acima descrito.

De uma forma muito geral, o grau de viabilidade da levedura é determinado recorrendo ao uso de um corante vital, baseando-se no princípio em que as células de

levedura viáveis não absorvem o corante enquanto as células não viáveis, ou seja, as células de levedura mortas, assumem a cor do corante utilizado. Com recurso a um microscópio e a um hemacitómetro, as centenas de células são contadas e, de seguida é calculada a razão entre as células coradas e o número total de células (vivas e mortas), sendo desta forma o resultado expresso em % de viabilidade.

O corante mais utilizado industrialmente é o azul de metileno. Outros corantes utilizados são, por exemplo, o azul de tripano e o violeta de metileno, que se baseiam no mesmo princípio de exclusão, ou seja, as células não viáveis vão apresentar coloração quando observadas ao microscópio [20].

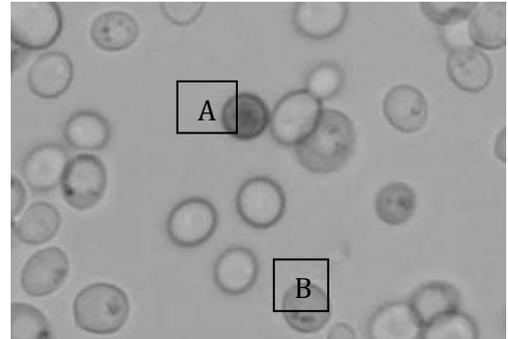


Figura 15 - (A) Célula de levedura não viável corada com azul de metileno. (B) Células de levedura viáveis (retirada de <http://www.umce.cl> [19]).

As vantagens e limitações deste método são semelhantes às acima referidas para a contagem directa de células de levedura com recurso ao microscópio e ao hemacitómetro. No entanto, ao contrário do método anterior, este apresenta como vantagem a distinção entre as células vivas e mortas. É ainda importante referir, que no caso do corante utilizado ser o azul de tripano, este pode causar a morte de células viáveis durante a preparação da amostra para a contagem e, desta forma, obtém-se um resultado incorrecto, sendo esta uma desvantagem inerente a este método [20].

Os métodos atrás descritos, embora de grande simplicidade, apresentam uma característica comum: o facto de serem morosos e de precisão limitada. Ora nos dias de hoje, o uso de métodos expeditos e precisos que permitam a tomada de decisões imediata é uma mais-valia para o processo e, desta forma, também para a redução de custos numa empresa. A citometria de fluxo e os métodos electroquímicos, baseados no princípio de Coulter, surgem então como resposta à demanda por métodos mais expeditos e precisos na contagem de células de levedura.

3.3. CITOMETRIA DE FLUXO

A citometria de fluxo (CF) é uma das técnicas mais utilizadas para a análise de células. Resultou da evolução dum primeira descrição feita por Coulter na década de 50 (séc. XX) dum equipamento que permitia a contagem e análise de células que passavam em corrente através de um feixe luminoso. Com o desenvolvimento de novos marcadores de

fluorescência, esta técnica estendeu-se a muitas áreas de investigação no campo da biotecnologia. É utilizada na actualidade no processo cervejeiro para a contagem de células de levedura e determinação da sua viabilidade, no entanto, as suas aplicações podem ir mais além [16].

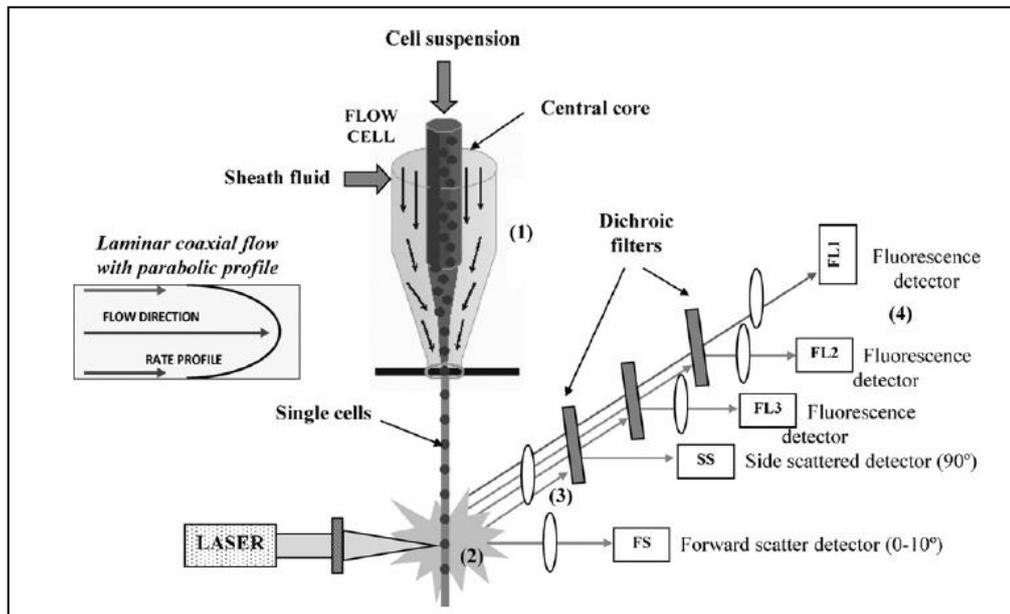


Figura 16 - Representação esquemática dum citómetro de fluxo (retirada de Díaz *et al.* [16]).

A figura 16, que se trata dum esquema do citómetro de fluxo, pretende ajudar a compreender o princípio de funcionamento da técnica de CF. De uma forma geral, a suspensão celular a ser analisada é injectada neste equipamento, seguindo para o núcleo central (“central core”) que se encontra rodeado por um fluido envolvente (“sheath fluid”) e que apresenta uma velocidade muito superior à da suspensão líquida. Através de um fenómeno físico designado por focagem hidrodinâmica, as partículas são forçadas assim a formar um fluxo laminar, de forma a assegurar que as células passam alinhadas uma a uma em frente ao feixe luminoso (“laser beam”) (1). Os diferentes sinais produzidos devido à interacção das células com o feixe luminoso (2) vão ser reconhecidos por diferentes detectores. Os diferentes tipos de sinais gerados podem dividir-se essencialmente em dois tipos: os sinais gerados pela dispersão de luz e os sinais de fluorescência, obtidos quando a amostra é corada com fluorocromos e estes são excitados pela fonte de luz. Estes dois tipos de emissões são separados por um conjunto de filtros e de espelhos, de acordo com determinados comprimentos de onda (3), e os sinais recolhidos por detectores de dispersão de luz (FS - “forward scatter detector” e SS - “side scatter detector”) e detectores de fluorescência (FL1, FL2 e FL3) (4). Estes sinais são posteriormente reencaminhados para

um computador, sendo assim possível obter representações gráficas, por exemplo sob a forma de histogramas, dos diferentes parâmetros avaliados na amostra [16].

As emissões colectadas pelos detectores de dispersão de luz dão informação sobre: o tamanho da célula, no caso do detector FS que se encontra colocado no sentido da direcção do feixe luminoso; e a complexidade da mesma, para o caso do detector SS que se encontra a 90°C da direcção do feixe. A dispersão da luz nestes dois casos é visível na figura 17. Para informações adicionais, como por exemplo a viabilidade das células duma amostra, utilizam-se os detectores de fluorescência e a amostra é corada com fluorocromos, como o oxonol [11, 16].

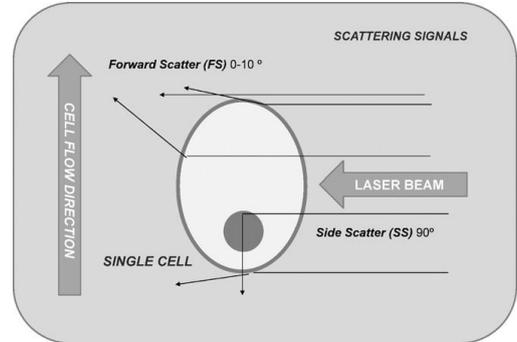


Figura 17 – Dispersão da luz por uma célula (retirada de Díaz *et al.* [16]).

Uma das maiores vantagens associadas a este tipo de método é o facto de possibilitar a determinação de um número significativo de células rapidamente, uma vez que o citómetro é capaz de analisar células a uma taxa de centenas por segundo. Outras vantagens são a possibilidade de determinar a viabilidade da levedura sem interferência de partículas do mosto, com recurso a corantes de fluorescência e, por último, de analisar célula a célula. De uma forma global, é uma técnica que permite uma análise rápida, objectiva e quantitativa de células em suspensão [11].

3.4. MÉTODOS ELECTROQUÍMICOS

Muitos dos equipamentos que utilizam métodos electroquímicos baseiam-se no princípio de Coulter, estes métodos podem também ser designados por “Aperture Impedance method” ou medições por impedância. Na figura 18 encontra-se representado um esquema que tem como objectivo ajudar a clarificar o princípio de Coulter.

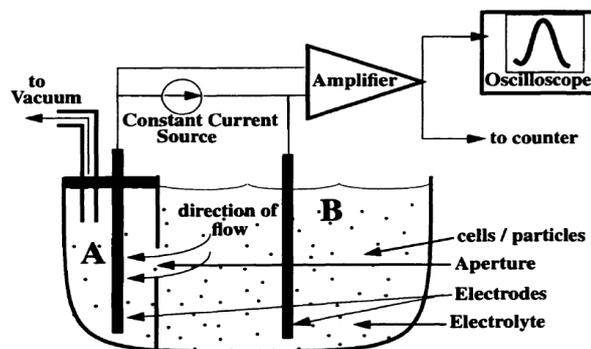


Figura 18 – Representação esquemática do princípio de Coulter (retirado de Roberts [21]).

De uma forma geral, os equipamentos que se baseiam neste princípio são constituídos por dois eléctrodos, um externo (B) e outro interno (A), mergulhados num electrólito que possibilita a manutenção de um fluxo de corrente constante. As células que vão ser analisadas, ou seja, as células que vão ser contadas, encontram-se suspensas no electrólito.

Quando se inicia a medição, os dois eléctrodos encontram-se imersos na suspensão de levedura. Para que a amostra seja sugada pelo orifício (“aperture”), é utilizado vácuo. Este orifício tem um tamanho específico, permitindo assim que a análise seja sempre efectuada ao mesmo volume de amostra. Quando uma célula passa por esse orifício, a resistência total aumenta porque a célula não condutora substitui o electrólito que é bom condutor de corrente. Tendo como base a lei de Ohm, que pode ser definida pela equação (1), onde R é a resistência eléctrica, V é a tensão (ou diferença de potencial eléctrico) e I é a intensidade da corrente eléctrica, podemos então concluir que o aumento da resistência num meio em que a intensidade de corrente é constante vai resultar num aumento de tensão.

$$R = \frac{V}{I} \quad (1)$$

Estas alterações na tensão são amplificadas como pulsos eléctricos. O número de pulsos eléctricos obtidos durante a contagem corresponde ao número de células contadas e quanto maior a intensidade do pulso eléctrico maior será o volume da célula [21].

A contagem de células de levedura efectuada na Unicor, recorrendo para isso ao Sysmex F-520, baseia-se no princípio acima descrito. Na figura 19 encontra-se uma foto deste equipamento.

Embora o Sysmex permita efectuar uma contagem de células de levedura em pouco tempo e obter resultados precisos, não permite a distinção entre células vivas e mortas. Assim, na Unicor utiliza-se, como acima referido, o método de coloração com azul de metileno para a determinação da viabilidade da levedura.

Novos desenvolvimentos têm vindo a surgir para ultrapassar esta limitação dos métodos electroquímicos. Existem já dispositivos “lab-on-chip” (figura 20A) que



Figura 19 – Sysmex F-520.

conciliam o princípio de Coulter com a dielectroforese, sendo que esta última técnica permite a separação de células. Estes dispositivos permitem que se efectue a contagem de células bem como a determinação da sua viabilidade, devido ao facto de as células serem separadas em diferentes canais devido às diferentes propriedades dieléctricas destas quando submetidas a determinadas frequências, como visível na figura 20B. Após a separação das células, a contagem de células é efectuada por medições de impedância, como descrito pelo princípio de Coulter [22].

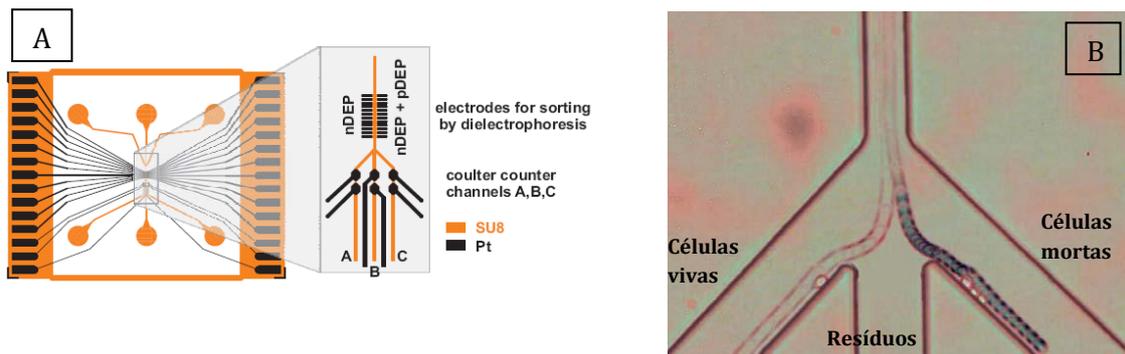


Figura 20 - (A) Design do chip. (B) Trajectória das células vivas não coloradas e das células mortas coloradas separadas por dielectroforese (retirado de Mernier *et al.* [22]).

As vantagens deste tipo de dispositivos passam pela possibilidade de efectuar análises em tempo real e pela rapidez na obtenção de resultados. Este equipamento alia a capacidade de contagem de células com a determinação da viabilidade de forma automática e precisa [22].

Existem também já implementadas tecnologias de medição “online” que envolvem a avaliação do potencial da membrana celular, baseando-se em determinações de impedância de rádio-frequência.

O sistema de medição por impedância de rádio-frequência, ilustrado pela figura 21, engloba uma sonda constituída por quatro eléctrodos. Os dois eléctrodos exteriores produzem um campo eléctrico de rádio-frequência, enquanto os outros dois eléctrodos medem a corrente. A produção de um campo eléctrico tem como objectivo forçar os iões do meio e do citoplasma da célula de levedura a

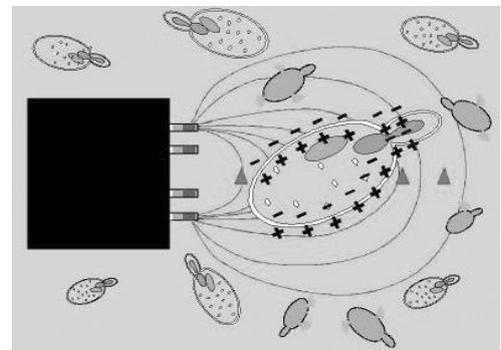


Figura 21 - Comportamento das células de levedura quando sujeitas a um campo eléctrico de rádio-frequência (retirado de Carvell *et al.* [23]).

moverem-se para os eléctrodos de cargas opostas. Uma vez que a membrana plasmática das células não é condutiva e, desta forma, os iões não podem passar através dela, as células de levedura vão ficar rodeadas de iões, ou seja, vão ficar polarizadas. As células mortas, as células danificadas, e outros sólidos não interferem com o sinal, uma vez que não ficam polarizados. Desta forma, a corrente eléctrica medida é directamente proporcional à quantidade de células viáveis [23].

Para efectuar este tipo de medições utiliza-se uma sonda ligada a um instrumento principal denominado de “Yeast Monitor”, como visível na figura 22A. Esta sonda pode situar-se, por exemplo, na tubagem, como representado na figura 22B, enquanto o instrumento principal pode situar-se próximo do local de medição ou mesmo numa sala de controlo. As aplicações deste tipo de equipamento na indústria cervejeira encontram-se no controlo e monitorização “online” de: levedura a ser semeada; levedura recolhida das cubas cilindro cónicas; fermentações, designadamente na medição do crescimento da levedura durante a fermentação; levedura em propagação.

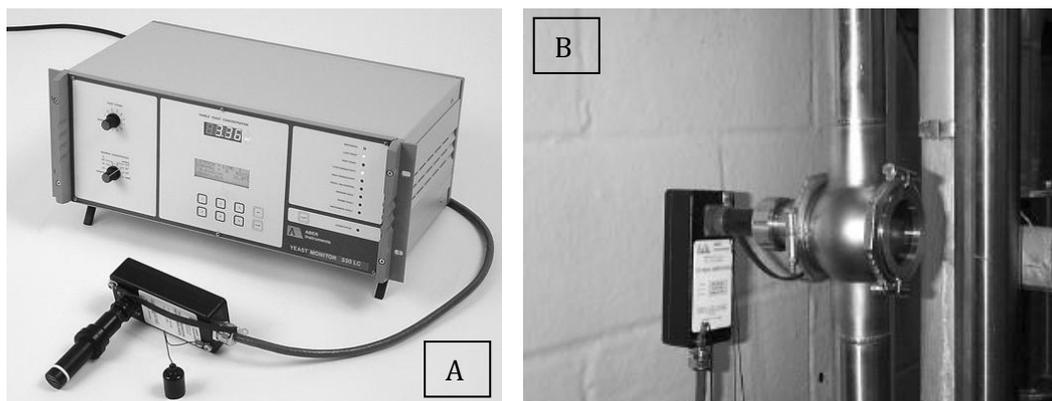


Figura 22 - (A) “Yeast Monitor” constituído pela sonda e equipamento principal. (B) Sonda do “Yeast Monitor” instalada numa tubagem (retirado de Carvell *et al.* [23]).

As vantagens associadas a este tipo de medições relativamente aos métodos clássicos passam por se tratar de um método não invasivo, por não se basear na coloração de células e por diminuir os erros associados aos métodos laboratoriais tradicionais. O facto de tornar possível o controlo “online” do processo, permite também que sejam tomadas medidas imediatas no caso de algo não correr conforme o previsto [23].

A tabela 2 tem como intuito efectuar uma comparação entre os diferentes métodos/tecnologias encontradas na literatura e os métodos utilizados na Unicer para a contagem de células de levedura e de determinação da viabilidade das mesmas.

Tabela 2 – Comparação dos diferentes métodos/tecnologias de contagem de células de levedura e determinação da viabilidade.

Tecnologias/ Características	Alvo de análise	Propriedades medidas	Precisão	Avaliação	Vantagens	Desvantagens
Visual ou Lupa	Células imobilizadas numa placa	Número de unidades formadoras de colónias	Baixa	Qualitativa e quantitativa	Simplicidade.	Tempo de incubação muito elevado; Estados intermediários das células.
Microscopia	Células imobilizadas no hemacitómetro	Número de células e viabilidade	Baixa	Qualitativa e quantitativa	Simplicidade e facilidade.	Moroso; Possibilidade de contaminação; Resultados sobrestimados.
Citometria de fluxo	Células em suspensão	Número de células e viabilidade	Elevada	Quantitativa	Análise efectuada célula a célula e a uma quantidade significativa.	Não permite a observação das características morfológicas das células.
Métodos electroquímicos	Células em suspensão	Número de células e viabilidade (alguns)	Elevada	Quantitativa	Medição efectuada em tempo real (alguns).	Não permitem a observação das características morfológicas das células.
Sysmex F-520 (Unicer)^(a)	Células em suspensão	Número de células	Elevada	Quantitativa	Contagem dum elevado número de células em pouco tempo.	Não distingue entre células viáveis e não viáveis.

^(a) Método electroquímico.

Através duma análise dos dados apresentados na tabela 2 e de tudo o que foi anteriormente referido, podemos concluir que o método de contagem de células por Sysmex utilizado na Unicer apresenta características favoráveis em termos de tempo para a obtenção de resultados e na precisão dos mesmos. Contudo, este equipamento não permita a distinção entre células viáveis e não viáveis, mas tal facto é compensado pela utilização de um método de determinação da viabilidade da levedura tido como referência para muitas indústrias cervejeiras – o método de coloração com azul de metileno.

Seria, no entanto, vantajoso para a empresa avaliar a aplicação de métodos mais avançados tecnologicamente como por exemplo, os métodos electroquímicos, donde se salientam os dispositivos “lab-on-chip” ou mesmo o “Yeast Monitor”. A aplicação destes métodos permite a contagem de células e determinação da viabilidade das mesmas em tempo real, facilitando assim a tomada de decisões, a correcção de possíveis problemas detectados durante a fermentação e o aumento da produtividade do processo.

CAPÍTULO 4: CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX

Um dos objectivos principais deste trabalho é a definição de procedimentos e criação de instruções de trabalho para o método analítico. Neste capítulo serão definidos os procedimentos do método e a partir destes serão elaboradas as instruções de trabalho.

Como referido no capítulo anterior, a contagem de células de levedura na Unicel é feita recorrendo ao Sysmex F-520. Este equipamento é constituído na sua zona de leitura por um transdutor com um orifício – opérculo, pelo qual passa um volume exacto de suspensão de levedura, e dois eléctrodos, um interno e outro externo. Estes encontram-se imersos numa solução de electrólito que permite a existência de um fluxo de corrente constante. A figura 23 pretende mostrar o equipamento e a sua zona de leitura, bem como alguns dos seus constituintes.

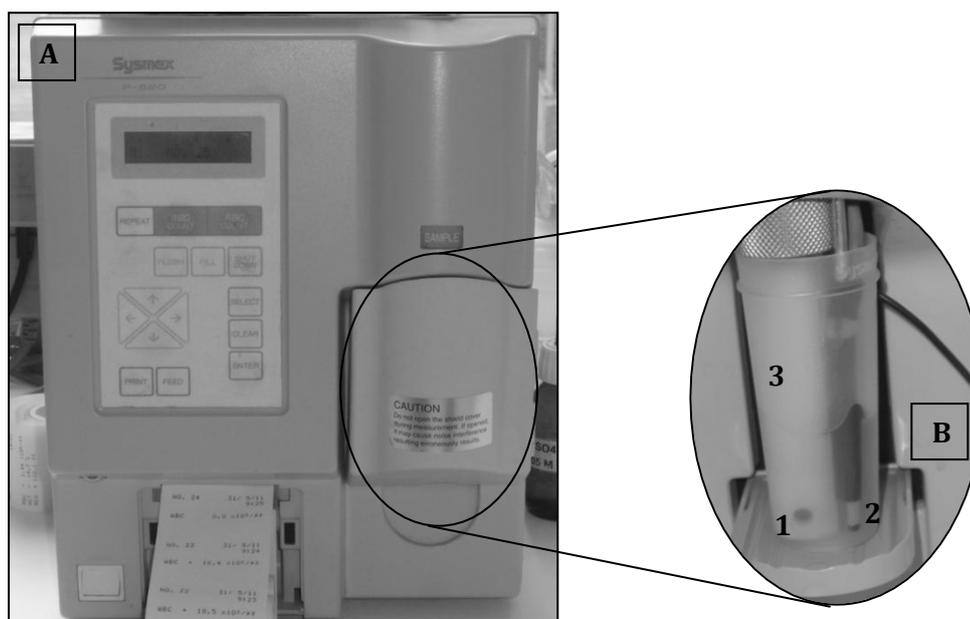


Figura 23 - (A) Sysmex F-520. (B) Zona de leitura do Sysmex. Legenda: 1 - Opérculo; 2 - Eléctrodo externo; 3 - Transdutor.

As células de levedura para análise encontram-se também em suspensão no electrólito. Iniciado o ciclo de contagem, quando uma célula de levedura passa através do opérculo ocorre uma alteração na resistência entre os dois eléctrodos, o que provoca um impulso de tensão que tem uma amplitude proporcional ao volume da partícula. Estes impulsos vão sendo registados electronicamente pelo equipamento.

4.1. AMOSTRAGEM

Existem duas estirpes de levedura a serem analisadas – a levedura US e a levedura CB. As análises a estas leveduras são efectuadas em diferentes fases do processo. Assim, as amostras dividem-se em: mosto semeado e levedura de sementeira. Uma amostra de mosto semeado é retirada quando a levedura se encontra em fermentação ou em propagação, enquanto uma amostra de levedura de sementeira é colhida quando a levedura se encontra em stockagem.

4.2. PROCEDIMENTO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX

O conjunto de procedimentos que é efectuado para que seja possível efectuar a contagem de células de levedura divide-se em:

- 4.2.1. Preparação dos frascos de recolha de amostras;
- 4.2.2. Recolha de amostras;
- 4.2.3. Preparação das soluções de leitura;
- 4.2.4. Execução da análise no sysmex;
- 4.2.5. Tratamento dos resultados.

4.2.1. PREPARAÇÃO DOS FRASCOS DE RECOLHA DE AMOSTRAS

É necessário ter alguns cuidados no caso dos frascos para a recolha do mosto semeado, uma vez que a estes é necessário adicionar 5 ml de sulfato de cobre. O sulfato de cobre funciona como inibidor do crescimento da levedura, impedindo desta forma a alteração da amostra com o tempo. Os frascos de recolha da levedura de sementeira não necessitam de nenhum cuidado em particular, mas a análise desta amostra deve ser feita o mais rapidamente possível.

4.2.2. RECOLHA DE AMOSTRAS

Os dois tipos de amostras a serem recolhidas já foram acima referidos. Assim, uma amostra de levedura em fermentação (mosto semeado) é recolhida duas horas após a cuba de fermentação se encontrar completa. A amostragem relativa à levedura em propagação (mosto semeado) divide-se em cinco fases. Na primeira fase a amostra é colhida uma hora após a inoculação da levedura no propagador industrial de menor volume. Na segunda fase a recolha de amostra é efectuada antes da passagem da levedura do tanque de propagação de

menor volume para o tanque de propagação de maior volume. A terceira fase de colheita de amostras é também efectuada antes da passagem da levedura do tanque de propagação para a cuba de fermentação e, por último, as seguintes fases de recolha já são efectuadas na cuba de fermentação. Relativamente à recolha de amostras da levedura em stockagem (levedura de sementeira), esta é efectuada cerca de duas horas após a levedura ter sido recolhida para o tanque de stockagem e ter sido sujeita a agitação mecânica. Os procedimentos de higienização são comuns para as diversas recolhas de amostragem. Desta forma, antes de se efectuar a colheita de amostras, é necessário efectuar uma purga da tubagem para remover impurezas e, após a recolha, é necessário higienizar a torneira de recolha de amostras com água destilada e álcool.

4.2.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Uma vez que temos dois tipos de amostras, a preparação das soluções diluídas para análise será distinta consoante o tipo de amostra.

4.2.3.1. MOSTO SEMEADO (amostra retirada nos tanques de fermentação e propagação):

- 4.2.3.1.1. Recolher a amostra num frasco de plástico com 5 ml de sulfato de cobre; o volume final no frasco deve ser de 100 ml;
- 4.2.3.1.2. Homogeneizar e desgaseificar a amostra;
- 4.2.3.1.3. Pipetar 5 ml (com pipeta ou micropipeta de 5 ml) da amostra bem homogeneizada para um balão de 50 ml, perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;
- 4.2.3.1.4. Pipetar 1 ml (com pipeta ou micropipeta de 1 ml) da diluição anterior bem homogeneizada para um balão de 50 ml, perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;
- 4.2.3.1.5. Colocar a diluição anterior no copo de leitura do Sysmex;
- 4.2.3.1.6. Efectuar a leitura três vezes.

4.2.3.2. LEVEDURA DE SEMENTEIRA (amostra retirada nos tanques de stockagem):

- 4.2.3.2.1. Recolher a amostra em frasco de vidro;
- 4.2.3.2.2. Com a ajuda de uma colher, homogeneizar a amostra;
- 4.2.3.2.3. Colocar um copo de vidro (100 ml) na balança e tarar, pesar 1.00 g de levedura, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur ou de uma colher (conforme a consistência da levedura);

4.2.3.2.4. Adicionar CELLPACK e 2 gotas de ácido sulfúrico 0,05 M, agitar e passar para um balão de 100 ml, perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;

4.2.3.2.5. Repetir os passos de 4.2.3.1.3. a 4.2.3.1.6.

4.2.4. EXECUÇÃO DA ANÁLISE NO SYSMEX

O Sysmex é um equipamento originalmente usado para a análise de células sanguíneas e posteriormente adaptado para a contagem de células de levedura. Os parâmetros hematológicos normalmente determinados por este equipamento são: contagem de glóbulos brancos (WBC Count - “White Blood Cell or Leukocyte Count”), contagem de glóbulos vermelhos (RBC Count - “Red Blood Cell or Erythrocyte Count”), concentração de hemoglobina (HGB - “Hemoglobin Concentration”), entre outros.

Uma vez que na Unicer se utilizam duas estirpes de levedura - US e CB, que apresentam características morfológicas distintas, também a sua contagem será diferenciada no Sysmex.

É importante referir que este equipamento apresenta dois métodos de análise, isto é, dois tipos distintos de calibração em memória. Consoante o tipo de levedura que se pretende analisar, é necessário proceder à selecção da calibração referente ao tipo de levedura que vai ser analisada.

Desta forma, quando a amostra é proveniente de uma Super Bock (SB) ou Cristal (CR), então a levedura é da estirpe US, e a calibração que lhe corresponde é a M1 (WBC COUNT). No caso de amostras originárias de Carlsberg (CB), ou seja, levedura da estirpe CB, então a calibração correspondente é M2 (RBC COUNT).

Para ser possível uma melhor compreensão dos passos necessários à execução da análise do Sysmex, encontra-se representado na figura 24 um esquema das teclas de operação do Sysmex.

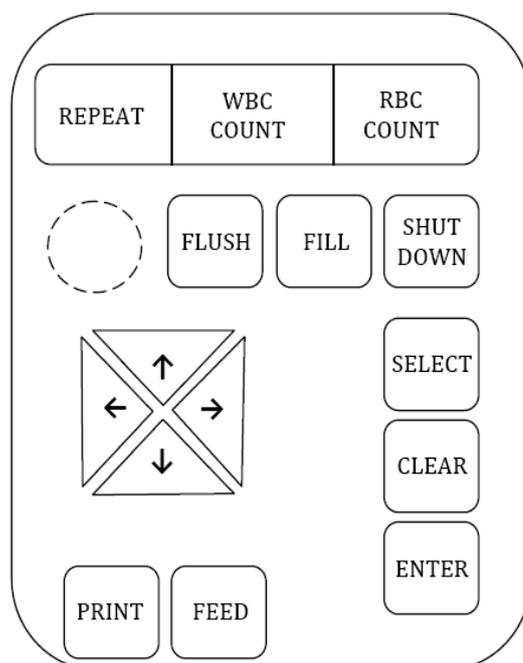


Figura 24 - Representação esquemática das teclas de operação do Sysmex.

De uma forma geral, para a execução duma análise no Sysmex, efectua-se os seguintes passos:

- 4.2.3.3. Ligar o equipamento no interruptor ON/OFF, e desactivar HGB;
- 4.2.3.4. Seleccionar o tipo de calibração correspondente à amostra a analisar;
- 4.2.3.5. Efectuar a determinação do branco da amostra, ou seja, efectuar uma leitura com CELLPACK e verificar se o resultado é zero. Caso tal não se verifique consultar a instrução de trabalho;
- 4.2.3.6. Colocar um copo de leitura Sysmex com suspensão de levedura (\pm meio copo) e efectuar a leitura pressionando as teclas WBC COUNT ou RBC COUNT, consoante a calibração seleccionada. Repetir a leitura mais duas vezes pressionando a tecla REPEAT;
- 4.2.3.7. Encerrar o equipamento (no final do dia).

Na tabela 3, encontram-se as funções necessárias para executar uma análise no Sysmex e os correspondentes passos e teclas de operação necessárias à execução de determinada função.

Tabela 3 - Funções do Sysmex e respectivas teclas.

FUNÇÃO	TECLAS
Desactivar HGB	Pressionar as teclas CLEAR, \uparrow , \downarrow , ENTER; Pressionar a tecla SELECT; Pressionar a tecla \downarrow para escolher o submenu 4.SETTINGS. Em seguida pressionar a tecla ENTER; Pressionar a tecla \downarrow para escolher o submenu 5.WBC, HGB ON/OFF e pressionar a tecla ENTER. O equipamento imprime a lista dos “settings”: **WBC, HGB ON/OFF** 0 WBC, HGB ON 1 HGB OFF 2 WBC OFF Seleccionar 1 HGB OFF com as setas (\uparrow , \downarrow). Pressionar a tecla ENTER para validar a opção. O equipamento volta novamente ao modo READY.
Seleccionar o tipo de calibração	Pressionar o BOTÃO SECRETO (círculo a tracejado na figura 24) para seleccionar o tipo de calibração consoante a amostra que se quer analisar. M1 \Rightarrow amostra SB / CR; M2 \Rightarrow amostra CB
Determinação do branco da amostra	Colocar o copo de leitura Sysmex com CELLPACK na zona de leitura e pressionar as teclas WBC COUNT ou RBC COUNT consoante a calibração seleccionada anteriormente. M1 \Rightarrow pressionar tecla WBC COUNT; M2 \Rightarrow pressionar tecla RBC COUNT
Encerrar	Pressionar a tecla SHUTDOWN e desligar o equipamento na tecla ON/OFF quando aparece a seguinte mensagem no visor: *TURN POWER OFF*

4.2.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Para que seja possível obter o número de células de levedura numa amostra é necessário efectuar o tratamento dos dados obtidos no Sysmex. De referir que existem determinados factores de correcção a aplicar para obter os resultados finais, os quais se encontram abaixo referenciados.

- ↪ No caso da levedura em fermentação ou em propagação, é necessário aplicar um factor de correcção devido à adição de sulfato de cobre à amostra. Este factor toma o valor de 1,05.
- ↪ Quando a amostra é proveniente de uma levedura Carlsberg, é necessário multiplicar o resultado do número de células, quer no caso do mosto semeado quer no caso da levedura de sementeira, por 10.
- ↪ Por último, amostras provenientes de levedura de sementeira são multiplicadas por um factor de correcção que toma o valor de 100.
- ↪ Os factores correctivos 10 e 100 são aplicados para a conversão dos resultados obtidos no Sysmex para as unidades adequadas dos diferentes tipos de amostra.
- ↪ Outros factores de correcção são aplicados quando se trata de levedura em propagação, que são explicados em mais detalhe nas equações presentes na tabela 4.

Assim, a tabela 4 apresenta um resumo de todas as equações de cálculo utilizadas consoante o tipo de amostra e levedura que está a ser analisada. De referir que todas as equações apresentadas têm em comum a média dos resultados obtidos por Sysmex. Isto significa que dos três valores obtidos no equipamento deve ser calculada a média e este resultado deve ser apresentado com 3 algarismos significativos – o mesmo número de algarismos significativos que obtemos do equipamento. Após efectuado este cálculo utilizamos esse valor nas equações da tabela abaixo.

Nas equações apresentadas na tabela 4, podemos ver a aplicação dos factores correctivos acima referidos. Podemos também verificar que no caso da levedura em propagação numa amostra de mosto semeado temos dois tipos de equações de cálculo. A primeira equação apresentada é utilizada quando a amostra corresponde à fase 1, enquanto a segunda equação se utiliza no caso das amostras de fases subsequentes. O factor correctivo aplicado na primeira equação corresponde a um ajuste do volume do propagador laboratorial para o propagador industrial.

Capítulo 4: Contagem de células de levedura por Sysmex

Tabela 4 – Equações de cálculo utilizadas para obter os resultados finais da contagem de células de levedura por Sysmex.

		Amostragem		
		Mosto Semeado [10 ⁶ /ml]		Levedura de sementeira [10 ⁶ /g]
		Levedura em fermentação	Levedura em propagação	
Levedura US (Super Bock ou Cristal)			$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05$	
	$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05$		$\times \frac{900}{15}$	$n \text{ células} = \text{média} \times 100$
			$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05$	
Levedura CB (Carlsberg)			$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05$	
	$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05$ $\times 10$		$\times \frac{900}{15} \times 10$	$n \text{ células} = \text{média} \times 100$ $\times 10$
			$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05 \times 10$	

CAPÍTULO 5: ERROS EXPERIMENTAIS

A existência de erros associados a um processo de medição é aceite por toda a comunidade científica. Uma vez que, mesmo que as experiências sejam conduzidas em condições tão próximas quanto possível, existem sempre factores que fazem com que os resultados obtidos não sejam idênticos [24,25]. Essas flutuações nos resultados obtidos a partir de determinado processo analítico de medição são denominadas de erro experimental. Estando então assente que os erros experimentais são inevitáveis, não se deve desprezar o seu controle e estudo, recorrendo para isso à Estatística.

5.1. PROCESSO DE MEDIÇÃO

O processo de medição pode ser definido, de uma maneira muito geral, como um conjunto de procedimentos efectuados com o intuito de determinar uma grandeza física. Dentro desses procedimentos podemos incluir o processo de medição propriamente dito, o projecto da experiência, a calibração de equipamentos e a análise e o tratamento dos erros, que se relacionam entre eles, permitindo assim ao experimentalista apresentar um resultado com um elevado grau de confiança [26].

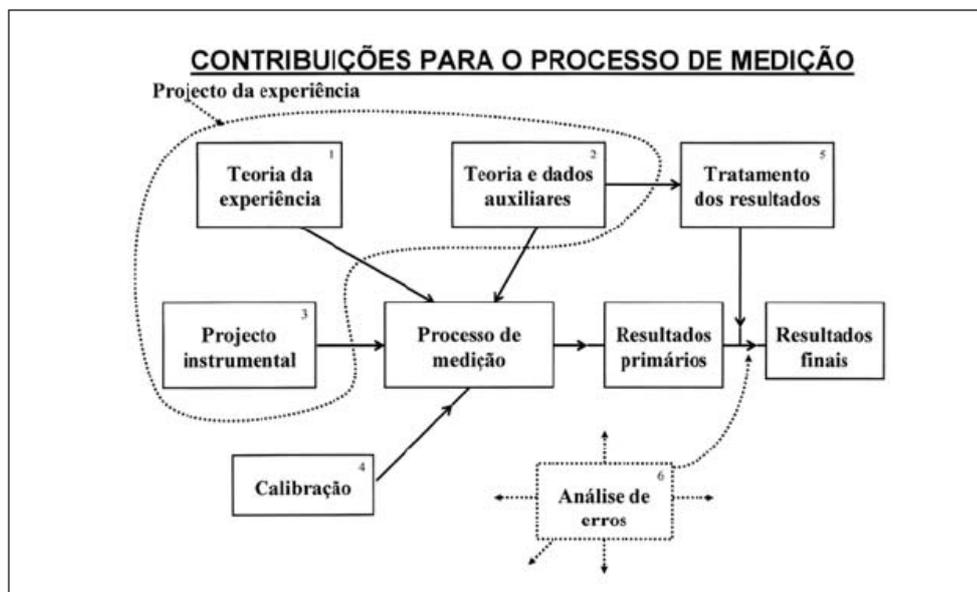


Figura 25 - Contribuições dos diferentes procedimentos num processo de medição (retirado de Fonseca [26]).

Na figura 25 encontram-se representadas esquematicamente as contribuições dos diferentes procedimentos dum processo de medição, permitindo assim uma melhor percepção das relações entre os diversos procedimentos.

Para que seja possível ao experimentalista obter resultados o mais próximo possível do verdadeiro valor é necessário que este conheça a exactidão e a precisão do método analítico utilizado e ainda as principais fontes de erros que podem afectar os resultados [27].

Os termos empregues para definir a incerteza associada à medição são usualmente erro ou incerteza. À partida podem ser tidos como conceitos semelhantes, no entanto, segundo normas de organismos reguladores estes são distintos. O primeiro diz respeito à diferença entre um valor medido e o verdadeiro valor, que pode ou não ser conhecido, enquanto o segundo se refere ao conceito geral de dúvida [28].

É importante ainda clarificar os conceitos de exactidão e precisão do método analítico. A exactidão pode definir-se como a proximidade do resultado experimental do verdadeiro valor, enquanto a precisão pode ser definida como a concordância entre os resultados obtidos independente de se encontrarem próximos ou não do verdadeiro valor [26]. Estes conceitos serão relacionados mais à frente com os erros sistemáticos e aleatórios.

5.2. ERROS

Os erros experimentais dividem-se essencialmente em dois tipos: os erros aleatórios e sistemáticos.

Os erros aleatórios são erros de origem indeterminada e reflectem-se nos valores obtidos de determinada grandeza, isto é, quando se efectuam várias repetições de uma medição, os resultados obtidos apresentam flutuações. Alguns autores defendem que tais flutuações podem ser devido a variações na própria grandeza física que está a ser medida ou devido a flutuações introduzidas pelo sistema de medição que podem ter origem em diversos factores, como por exemplo alterações no ambiente envolvente (temperatura, pressão, etc.) onde está a ser efectuada a medição. Para ser possível determinar qual a origem de tais oscilações nos resultados seria necessário efectuar outro tipo de investigações. Qualquer que sejam as causas para tais oscilações, a média dos resultados obtidos é tida normalmente como o verdadeiro valor ou como o valor obtido, de elevada significância, a partir de determinado processo de medição [25].

Os erros sistemáticos, cuja origem pode ser determinada, reflectem-se como um desvio sistemático do verdadeiro valor. Os erros sistemáticos subdividem-se geralmente em: operacionais, instrumentais e de reagentes e método. Os primeiros são da responsabilidade do experimentalista, não estando relacionados com o método analítico

utilizado. Os erros instrumentais e de reagentes referem-se, por exemplo, a erros de calibração de instrumentos ou ao uso de reagentes impuros, relacionando-se desta forma com os instrumentos e/ou reagentes utilizados no processo analítico. Por último, os erros de método referem-se a erros decorrentes do método analítico utilizado.

Embora os erros aleatórios e sistemáticos possam parecer semelhantes, existe uma diferença muito importante entre estes dois tipos de erros: efectuando repetições das medições os resultados obtidos não revelam os erros sistemáticos, revelam sim os erros aleatórios, que podem assumir a forma da distribuição Normal ou de Gauss [25].

Os conceitos de precisão e exactidão, acima definidos, relacionam-se com os erros aleatórios e sistemáticos, na medida em que a precisão é uma medida dos erros aleatórios enquanto a exactidão se trata de uma medida dos erros sistemáticos [26].

5.3. ANÁLISE E TRATAMENTO DE ERROS

Uma vez que os erros aleatórios e os erros sistemáticos se distinguem entre si, também a metodologia empregue para a sua análise e tratamento será diferente. Desta forma, e com o intuito de reduzir ou se possível eliminar a incerteza associada à medição, será levada a cabo a análise e tratamento dos erros experimentais.

De uma forma muito geral, o tratamento dos erros sistemáticos é feito pela sua identificação e correcção, já no caso dos erros aleatórios será efectuado o tratamento estatístico destes. Ainda assim, a redução dos erros aleatórios pode ser conseguida pelo aumento do número de medições, enquanto a redução dos erros sistemáticos pode ser alcançada recorrendo aos seguintes procedimentos: calibração dos equipamentos; determinação do branco da amostra, ou seja, efectuar uma análise nas mesmas condições experimentais mas na ausência do constituinte de interesse; análise de controlo com um padrão, isto é, fazer uma análise nas mesmas condições experimentais mas com uma substância padrão; uso de métodos de análise independentes; determinações paralelas, permitindo assim o controlo do resultado obtido em apenas uma determinação; entre outros [27].

5.4. ANÁLISE DOS ERROS SISTEMÁTICOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX

Para que seja possível identificar e corrigir todas as fontes de erros sistemáticos é necessário que o experimentalista tenha um profundo conhecimento do processo analítico.

Nesse sentido foi efectuado um acompanhamento de todas as etapas do processo analítico de contagem do número de células de levedura.

Já foi referido que o processo analítico se define num conjunto de procedimentos que tem como intuito a obtenção de um resultado final para a grandeza física que está a ser medida, que neste caso em particular se trata da obtenção do número de células de levedura numa amostra. Como já anteriormente referido no Capítulo 4, as etapas que fazem parte do processo de contagem de células de levedura são:

- Preparação dos frascos de recolha de amostras;
- Recolha de amostras;
- Preparação das soluções de leitura;
- Execução da análise no sysmex;
- Tratamento dos resultados.

Todos os procedimentos acima se englobam no processo de medição propriamente dito e no tratamento dos resultados. Os procedimentos anteriores ao processo de medição, tais como, o projecto da experiência e a verificação de instrumentos auxiliares e do aparelho experimental não serão abordados neste trabalho uma vez que o método já se encontra devidamente validado no laboratório da Unicer. É importante ainda referir que o Sysmex não requer calibração frequente, sendo apenas necessário efectuar a determinação do branco da amostra no início e entre as análises realizadas.

Podemos dividir as amostras a serem analisadas pelo método de contagem de células em dois grandes tipos: mosto semeado – levedura que se encontra em fermentação ou propagação, e levedura de sementeira – levedura que se encontra em stockagem. Desta forma, consoante a amostra que está a ser analisada vamos utilizar um procedimento diferente e obter também um resultado distinto. Por esta razão, a identificação e correcção dos erros sistemáticos será efectuada para cada tipo de amostra.

Ainda relativamente à amostragem é necessário assegurar que esta é aleatória, para desta forma ser representativa da população de origem e assim garantir a independência estatística, isto é, para que todas as observações sejam idêntica e independentemente distribuídas [24]. O processo de amostragem aleatória assegura assim uma probabilidade semelhante de todos os elementos da população serem incluídos na amostra [29].

Nas tabelas 5 e 6 encontra-se um resumo do levantamento de erros sistemáticos do processo analítico de contagem de células de levedura para os dois casos de amostragem de

mosto semeado e levedura de sementeira. Para cada erro sistemático identificado encontra-se também devidamente especificadas as causas desse erro e quais as acções correctivas a aplicar para que seja possível eliminá-lo.

A organização das tabelas foi feita segundo a evolução das etapas do processo de medição. Tal deve-se ao facto de estas constituírem o ponto de partida para a formação dos técnicos, sendo por isso essencial que seja visível ao longo de todo o processo de medição quais as etapas mais problemáticas e erros que daí possam advir.

Tabela 5 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas ao método analítico de contagem de células de levedura em fermentação e propagação.

ETAPA PROCESSO ANALÍTICO	ERRO DETECTADO/FONTE DE ERRO	CAUSA	ACÇÃO CORRECTIVA	ESTADO DA ACÇÃO CORRECTIVA	TIPO DE ERRO
Preparação dos frascos de recolha de amostras	1 Quantidade de sulfato de cobre abaixo dos 5 ml, no frasco de recolha de amostras. ¹	Manuseamento incorrecto do frasco (podem ocorrer perdas de material);	Manter o frasco sempre na vertical;	Formação	Operacional
		Frasco mal preparado (volume incorrecto dentro do frasco ou mesmo ausência de sulfato de cobre);	Verificar sempre se o frasco tem sulfato de cobre;	Formação	
		Local de armazenamento do frasco;	Armazenar os frascos dentro de uma grade junto à bancada da produção, no local dos frascos para amostras;	Ok	
		Forma de guardar as garrafas (horizontal ou vertical).	Armazenar os frascos na grade, ficando assim numa posição vertical.	Ok	
Recolha de amostras	2 Quantidade de amostra recolhida encontra-se acima ou abaixo dos 100 ml.	Falta de sensibilidade dos técnicos;	Sensibilização e treino dos técnicos para a importância da recolha do volume de amostra correcto;	Formação	Operacional
		Formação de espuma durante a recolha da amostra;	Retirar a amostra 2h após a cuba estar cheia (durante a “lag phase”);	Formação	
		Dificuldade em estabilizar o frasco da amostra durante a recolha;	Sensibilização e treino dos técnicos;	Formação	
		Ângulo de leitura de escala errado;	Manter a garrafa de recolha de amostras ao nível dos olhos;	Formação	
		Marca dos 100 ml não identificada.	Identificar a marca dos 100 ml.	Formação	
	3 Impurezas na amostra, devido a purga mal efectuada.	Percepção errada do comprimento do tubo, recolhendo desta forma impurezas também.	Colocar a mão sobre o tubo durante a purga, o abaixamento da temperatura indica que a purga foi efectuada correctamente.	Ok	Operacional
	4 Torneira de recolha mal higienizada. ²	Esquecimento;	Sensibilização e treino dos técnicos;	Formação	
Procedimentos incorrectos de higienização;		Limpar a torneira de recolha de amostras com água destilada e álcool;	Ok	Operacional	
	Falta de produtos para efectuar a higienização.	Levar para a zona de recolha de amostras água destilada e álcool.	Ok		

¹ O sulfato de cobre funciona como inibidor do crescimento da levedura, logo uma quantidade incorrecta de sulfato de cobre no frasco de recolha da amostra pode acarretar que a inibição do crescimento da levedura não seja eficiente.

² A incorrecta higienização da torneira de recolha de amostras pode potenciar o desenvolvimento de leveduras selvagens ou outro tipo de microrganismos e desta forma afectar a contagem de células de levedura.

Tabela 5 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas ao método analítico de contagem de células de levedura em fermentação e propagação (continuação).

ETAPA PROCESSO ANALÍTICO	ERRO DETECTADO/FONTE DE ERRO	CAUSA	ACÇÃO CORRECTIVA	ESTADO DA ACÇÃO CORRECTIVA	TIPO DE ERRO
Recolha de amostras	5 Amostra recolhida não representativa da população.	Amostras recolhidas muito tempo após a cuba estar cheia ($t > 2h$);	Retirar a amostra 2h após a cuba estar completa;	Formação	Operacional
		Tempo de enchimento das cubas elevado.	Recolha de amostras logo após o enchimento da cuba e após as 2h usuais, para comparação de resultados.	Formação	Método
Preparação das soluções de leitura	6 Material com humidade.	Falta de material seco.	Adquirir mais material.	Preparação da formação	Instrumental e de reagentes
	7 Material (balões volumétricos, pipetas, etc.) mal calibrado.	Uso indevido do material;	Uso do material exclusivo para a contagem de células;	Ok	Instrumental e de reagentes
		Falta de cuidado durante o seu manuseamento.	Sensibilização e treino dos técnicos para o uso cuidadoso do material.	Formação	
	8 Reagentes contaminados (CELLPACK, ácido sulfúrico e sulfato de cobre).	Expiração do prazo de validade;	Verificação frequente das boas condições do CELLPACK (prazo de validade, leituras efectuadas no sysmex);	Formação	Instrumental e de reagentes
		Preparação incorrecta de soluções (ácido sulfúrico e sulfato de cobre).	Preparação rigorosa das soluções de ácido sulfúrico e sulfato de cobre;	Ok	
	9 Fraca homogeneização da amostra. ³	Falta de prática.	Agitar a amostra de forma vigorosa e durante algum tempo, de acordo com a instrução de trabalho;	Formação	Método
	10 Pipetação incorrecta.	Leitura incorrecta da escala da pipeta.	Aquisição de micropipetas para a preparação das soluções de leitura.	Preparação da formação	Operacional
11 Diluição incorrecta. ⁴	Leitura incorrecta do menisco.	Aquisição de frascos com um dispensador de líquidos doseado com a quantidade de electrólito necessária para as diluições.	Preparação da formação	Operacional	
12 Fraca homogeneização das soluções de leitura.	Falta de prática.	Agitar a amostra de forma vigorosa e durante algum tempo, de acordo com a instrução de trabalho;	Formação	Método	
Execução da análise no Sysmex	13 Selecção errada do método de contagem de células de levedura no Sysmex.	Distracção;	Identificação no local, onde se encontra o sysmex, dos métodos;	Preparação da formação	Operacional
		Falta de prática.	Treino e sensibilização dos técnicos para a execução rigorosa da instrução de trabalho.	Formação	

³ A fraca homogeneização da amostra pode implicar que a análise seja efectuada a uma amostra não representativa da população.

⁴ Soluções diluídas utilizadas na análise não devem ser muito concentradas, pois pode ocorrer o erro de coincidência, ou seja, a contagem de duas ou mais células como apenas uma.

Tabela 5 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas no método analítico de contagem de células de levedura em fermentação e propagação (continuação).

ETAPA PROCESSO ANALÍTICO	ERRO DETECTADO/FONTE DE ERRO	CAUSA	ACÇÃO CORRECTIVA	ESTADO DA ACÇÃO CORRECTIVA	TIPO DE ERRO
Execução da análise no Sysmex	14 Ruído.	Sysmex próximo de fontes de ruído durante a análise;	Colocar o aparelho num local isento ou com poucas fontes de ruído;	Ok	Instrumental e de reagentes
		Conversas ou movimentos bruscos junto ao local de leitura.	Manter a serenidade junto ao aparelho durante a execução das leituras.	Formação	Operacional
	15 Determinação do branco da amostra não efectuada.	Falta de prática.	Treino e sensibilização dos técnicos para a execução rigorosa da instrução de trabalho.	Ok	Operacional
	16 Flutuações nas condições ambiente, designadamente temperatura. Aparece uma mensagem de erro no visor do Sysmex: *TEMP LOW*.	Temperatura baixa da amostra;	Retirar as amostras guardadas em câmaras refrigeradoras com alguma antecedência antes de efectuar a análise;	Formação	Operacional
		Temperatura baixa no local de armazenamento dos reagentes;	Manter a temperatura do local de armazenamento (é também o local onde se efectua a contagem) dentro da gama adequada (regular o ar condicionado para uma temperatura superior aos 18 °C);	Formação	
		Baixas temperaturas no local onde se efectua a contagem.	Manter a temperatura do local dentro da gama adequada (regular o ar condicionado para uma temperatura superior aos 18 °C).	Formação	
	17 Entupimento do opérculo, local por onde a amostra é sugada. Aparece uma mensagem de erro no visor do Sysmex: *CLOG ERROR*.	Existência de resíduos no opérculo.	Pressionar a tecla FLUSH várias vezes (3 a 4 vezes) e efectuar de novo leitura; se o erro persistir, efectuar uma limpeza do opérculo com o pincel (ver manual do equipamento ou instrução de trabalho) e efectuar nova leitura para verificar se o erro foi resolvido (no caso de estar resolvido, a mensagem de erro não voltará a aparecer).	Formação	Instrumental e de reagentes
	18 Fronteira entre o ruído e as células não detectada. Aparece uma mensagem de erro no visor do Sysmex: *PLATEAU ERROR*. ⁵	Solução de leitura preparada incorrectamente;	Efectuar nova preparação de soluções de leitura e efectuar nova análise;	Formação	Método
Ruído.		Reanalisar a solução de leitura.	Formação	Operacional	

⁵ O equipamento não consegue efectuar a distinção entre o ruído e as células na curva cumulativa de distribuição de tamanho das células.

Tabela 5 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas no método analítico de contagem de células de levedura em fermentação e propagação (continuação).

ETAPA PROCESSO ANALÍTICO	ERRO DETECTADO/FONTE DE ERRO	CAUSA	ACÇÃO CORRECTIVA	ESTADO DA ACÇÃO CORRECTIVA	TIPO DE ERRO
Execução da análise no Sysmex	19 Entrada de ar no equipamento.	O elevado número de análises efectuadas provoca o enchimento frequente do reservatório destinado aos resíduos. Durante o procedimento de despejo ocorre a entrada de ar.	Aumentar o volume do reservatório destinado à deposição dos resíduos; Após o despejo efectuar leituras com CELLPACK até que o resultado obtido seja zero.	Formação	Instrumental e de reagentes
Tratamento dos resultados	20 Erros de arredondamento.	Arredondamentos à casa das unidades ao longo dos diversos passos de cálculo.	Criação de uma folha de resultados com a indicação dos cálculos e arredondamentos a efectuar.	Ok	Operacional

Tabela 6 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas no método analítico de contagem de células de levedura em stockagem⁶.

ETAPA PROCESSO ANALÍTICO	ERRO DETECTADO/FONTE DE ERRO	CAUSA	ACÇÃO CORRECTIVA	ESTADO DA ACÇÃO CORRECTIVA	TIPO DE ERRO
Recolha de amostras	21 Entrada de ar no frasco de amostra. ⁷	A entrada de ar é devida ao tempo necessário para que seja possível recolher a amostra.	Recolha de amostra efectuada o mais rapidamente possível.	Formação	Método
	22 Entrada de ar no frasco de amostra.	Amostra em espera para que seja efectuada a análise.	Análise imediata (possibilitada pela implementação do autocontrolo).	Formação	Método
Preparação das soluções de leitura	23 Pesagem incorrecta da amostra de levedura.	Pesagem superior ou inferior a um grama de levedura;	Sensibilização e treino dos técnicos para a pesagem rigorosa.	Formação	Operacional
		Distracção;	Sensibilização e treino dos técnicos para a execução rigorosa da instrução de trabalho;	Formação	
		Falta de prática.	Sensibilização e treino dos técnicos para a execução rigorosa do método analítico.	Formação	

⁶ Na tabela 6 estão apenas os erros referentes ao processo de medição efectuado para a levedura de sementeira. Uma vez que grande parte do processo de medição é semelhante quer se trate de uma amostra de mosto semeado ou de levedura de sementeira, há que adicionar a esta tabela outros erros como os erros 3 e 4 e ainda os erros 6 a 20 da tabela 5.

⁷ A entrada de ar potencia o crescimento da levedura, falseando assim os resultados da contagem de células.

Tabela 6 – Erros e respectivas acções correctivas aplicadas no método analítico de contagem de células de levedura em stockagem (continuação).

ETAPA PROCESSO ANALÍTICO	ERRO DETECTADO/FONTE DE ERRO	CAUSA	ACÇÃO CORRECTIVA	ESTADO DA ACÇÃO CORRECTIVA	TIPO DE ERRO
Preparação das soluções de leitura	24 Não adição de ácido sulfúrico. ⁸	Distracção;	Sensibilização dos técnicos para a importância da adição de ácido sulfúrico;	Formação	Operacional
		Falta de prática.	Sensibilização e treino dos técnicos para a execução rigorosa do método analítico.	Formação	
	25 Perda de material.	Falta de cuidado;	Transferência cuidadosa, seguida de sucessivas lavagens do copo com cellpack;	Formação	Operacional
		Falta de prática.	Sensibilização e treino dos técnicos para a execução rigorosa do método analítico.	Formação	
	26 Balança mal calibrada.	Equipamento não calibrado.	Calibrar o equipamento.	Ok	Instrumental e de reagentes.

⁸ O ácido actua como desfloculante. Na sua ausência formam-se flocos que podem ser contados como um tipo de levedura que não a que está ser analisada ou pode mesmo ocorrer perda de material por sedimentação dos flocos.

Efectuando agora uma análise às tabelas 5 e 6 acima apresentadas é facilmente perceptível que a grande maioria dos erros são corrigidos treinando e sensibilizando os técnicos responsáveis pelo processo de medição. Tal vai de encontro ao objectivo principal deste trabalho que se trata de formar os técnicos de produção no processo analítico de contagem de células de levedura. Outras das correcções a efectuar passam também por procedimentos encontrados na literatura, como é o caso da calibração frequente dos equipamentos, a determinação do branco da amostra, amostragens aleatórias e boas práticas laboratoriais.

5.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS ERROS ALEATÓRIOS NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX

Como anteriormente referido, os erros aleatórios podem quantificar-se através de repetições da medição de uma determinada grandeza, sendo assim possível a sua minimização através da análise estatística. Efectuando assim um elevado número de repetições, em condições tão semelhantes quanto possível, esse conjunto de observações irá seguir uma distribuição Normal ou de Gauss [30]. É importante ainda frisar o facto de que a distribuição Normal é um modelo matemático, sendo desta forma apenas uma aproximação. Assim não existe nenhum conjunto de observações que siga exactamente esta distribuição[24].

A distribuição Normal ou de Gauss (em homenagem ao matemático alemão Carl F. Gauss) é das mais utilizadas para caracterizar uma distribuição aleatória, no entanto existem outras distribuições que também podem ser utilizadas na descrição de fenómenos de natureza aleatória [25]. A importância da distribuição Normal passa por esta descrever distribuições de erros aleatórios em muitos tipos de medições e por demonstrar que, mesmo que as medições individuais não sigam esta distribuição, para medições constituídas por um vasto número de observações, ou seja, vários grupos de medições individuais, verifica-se que a tendência destas é seguir a distribuição de Gauss [31]. Esta distribuição pode ser definida a partir dos seus parâmetros característicos: o seu valor esperado ou média populacional – μ , que pode tomar qualquer valor real, e a variância populacional – σ^2 , que toma um valor positivo. A sua forma funcional é dada pela equação (2), para todo o valor real de x :

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma} e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2} \quad (2)$$

Pode ainda ser representada simbolicamente por $[X \sim N(\mu, \sigma^2)]$, indicando-nos assim que uma determinada variável aleatória X segue uma distribuição Normal caracterizada pelos parâmetros μ e σ^2 [29].

A caracterização dos dados amostrais é normalmente efectuada pelo cálculo de estatísticas, a partir das quais é possível então descrever esse conjunto de valores. As estatísticas são diferentes dos parâmetros utilizados para caracterizar distribuições, como por exemplo, os parâmetros acima definidos para caracterizar distribuição de Gauss – valor esperado e variância, uma vez que para uma dada população os parâmetros são fixos, enquanto as estatísticas variam de amostra para amostra. Os parâmetros apresentam normalmente a mesma designação que as estatísticas, contudo, a sua distinção pode passar por designar o parâmetro de populacional e a estatística de amostral, por exemplo. A sua notação é também diferente, os parâmetros e estatísticas são denotados por letras do alfabeto grego e letras do nosso alfabeto, respectivamente [29]. Estas estatísticas podem ser também denominadas de estimadores, uma vez que estas são estimativas dos parâmetros.

As distribuições definidas a partir de estatísticas são designadas por distribuições por amostragem. Ora, no seguimento da caracterização das distribuições por amostragem interessa referir o teorema do limite central que diz que a soma de muitas variáveis aleatórias independentes e com mesma distribuição, e que se admite ter variância finita, tende para uma distribuição normal. Para uma amostra suficientemente grande, a distribuição de probabilidade da média amostral pode ser aproximada por uma distribuição normal, com média e variância iguais às da população [29].

Ora, de acordo com o anteriormente referido vamos agora definir as estatísticas que serão utilizadas para caracterizar os dados.

A média amostral e a variância amostral são definidos pelas equações (3) e (4), respectivamente.

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (3)$$

$$s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1} \quad (4)$$

A média amostral é considerada uma medida de localização da amostra, e quando o conjunto de observações é muito elevado, trata-se de uma medida de localização da população. Relativamente à variância amostral, trata-se de uma medida da dispersão da amostra ou uma medida de dispersão da população, quando o conjunto de observações é

muito elevado. Em conjunto, estas duas medidas, localização e dispersão, ajudam-nos a ter uma melhor percepção do comportamento da população [24].

A média é então considerada a melhor estimativa para o valor da grandeza que está a ser determinada. O erro associado a cada medição individual é dado pelo desvio-padrão da amostra – s . Este parâmetro é definido de acordo com a equação (5).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (5)$$

Desta forma, cada observação individual apresenta o mesmo erro e pode ser definida por $x_i \pm s$. Ora, neste sentido também a média amostral, que caracteriza a amostra, deve vir acompanhado do erro que lhe está associado. Este erro é denominado de desvio padrão da média amostral ou desvio médio amostral, e pode ser definido através da equação (6).

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad (6)$$

Assim a média acompanhada do respectivo erro pode ser representado da seguinte forma $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

O coeficiente de variação amostral é uma medida de dispersão da amostra e permite quantificar dispersão dos resultados face à média. É definido através da equação (7) e pode vir sob a forma de percentagem quando multiplicado por 100, sendo assim denominado de percentagem de erro [24].

$$\text{coeficiente de variação amostral} = \frac{s}{\bar{x}} \quad (7)$$

O inverso do coeficiente de variação também designado por rácio “signal-to-noise” é uma medida de quanto o sinal está a ser adulterado pelo ruído. Pode ser calculado pela equação (8) [24].

$$\text{signal to noise} = \frac{\bar{x}}{s} \quad (8)$$

Para averiguar a ocorrência de erros aleatórios durante o processo analítico de contagem de células de levedura foram recolhidas quatro amostras distintas: levedura de sementeira US e CB e mosto semeado US e CB, em princípio representativas da população de origem. De cada uma das amostras recolhidas foram preparadas as respectivas soluções para análise e efectuada a sua leitura no Sysmex. O número de medições efectuada é distinto

no caso da levedura de sementeira por razões de conservação da amostra, isto é, pelo facto do contacto com o ar potenciar o seu crescimento e desta forma alterar os resultados, e também devido à disponibilidade de material na altura em que foram efectuadas as análises.

Antes de efectuar o cálculo das estatísticas necessárias para a caracterização da distribuição é comum representarem-se os resultados obtidos experimentalmente sob a forma de um histograma. Esta representação gráfica, que também pode ser denominada de distribuição de frequências, representa no eixo das abcissas o conjunto de intervalos em que os valores medidos foram divididos, geralmente o valor de cada intervalo é semelhante, e no eixo das ordenadas a frequência de medições correspondente a cada intervalo, dando desta forma origem a um gráfico constituído por um grupo de barras justapostas [24]. A partir desta representação é possível fazer algumas considerações sobre os resultados obtidos, como por exemplo, verificar se a distribuição dos dados se aproxima da distribuição Normal. As figuras 26 a 29 correspondem aos histogramas obtidos para cada amostra em estudo e as respectivas distribuições normais.

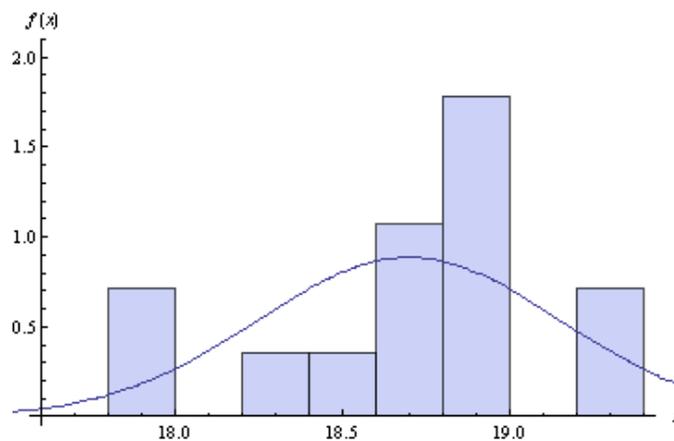


Figura 26 – Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (18, 7; 0, 20)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente à levedura de sementeira US.

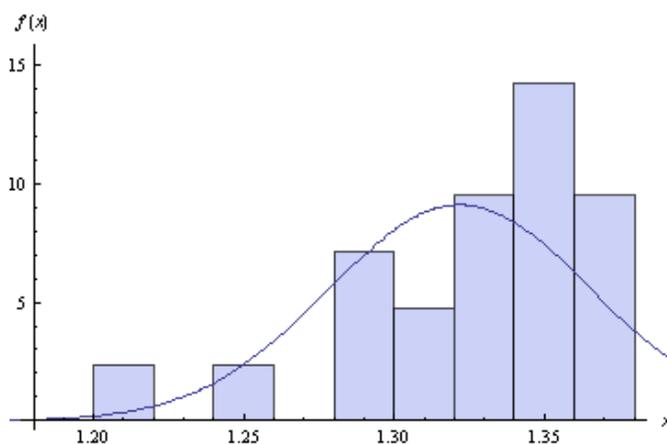


Figura 27 - Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (1,32; 0,002)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente à levedura de sementeira CB.

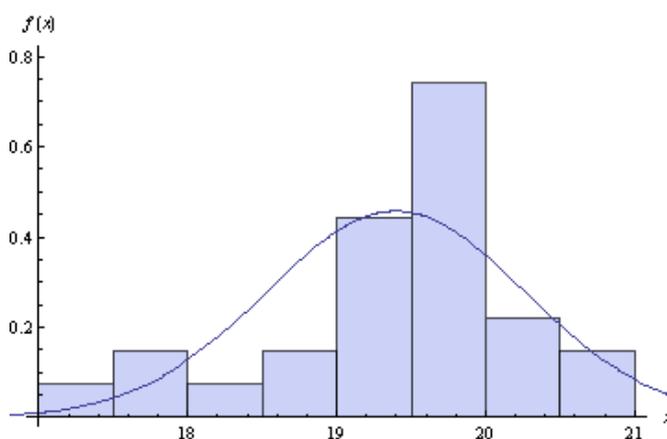


Figura 28 - Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (19,4; 0,76)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente ao mosto semeado US.

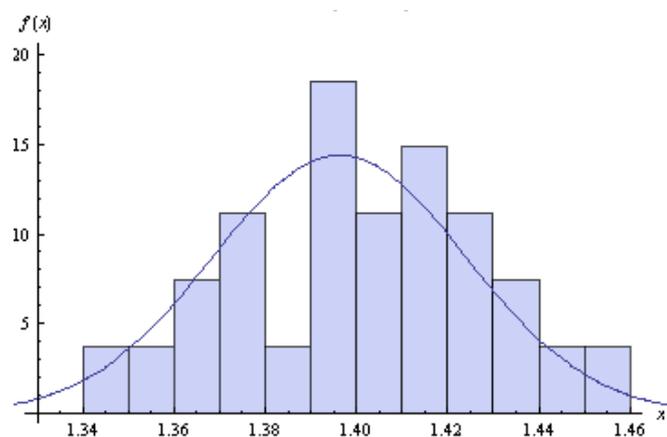


Figura 29 - Histograma e respectiva distribuição normal, representada simbolicamente por $X \sim (1,4; 0,001)$, para o conjunto de resultados da amostra correspondente ao mosto semeado CB.

Efectuando uma análise aos histogramas atrás representados, podemos rapidamente verificar que todas as distribuições aparentam seguir uma distribuição Normal, embora este comportamento se apresente mais marcado no caso dos histogramas correspondentes às figuras 28 e 29. Tal pode ser devido ao baixo número de resultados utilizados para construir os histogramas correspondentes às figuras 26 e 27. Podemos também observar a distribuição de dados correspondente a cada amostra, designadamente inferir sobre a localização e dispersão de cada conjunto de resultados.

Efectuando ainda uma análise aos gráficos de distribuição também representados nas figuras 26 a 29, podemos verificar que os resultados obtidos de todas as amostras analisadas seguem uma distribuição Normal, caracterizada por apresentar uma forma semelhante à forma de um sino. Todas as distribuições normais representadas se encontram devidamente caracterizadas em termos da média e do desvio-padrão. Este último parâmetro mede a distância da média até ao ponto de inflexão da curva [24]. Outra das particularidades da distribuição Normal que se pode observar é que a probabilidade de ocorrerem desvios da média vai diminuindo à medida que esses desvios são maiores. Ou seja, ao valor esperado, no qual depositamos maior confiança, corresponde a maior probabilidade de ocorrências, enquanto a valores muito superiores ou muito inferiores a esse valor esperado correspondem probabilidades muito baixas. Devido à simetria da curva é também observável, que a probabilidade de ocorrer um desvio da mesma ordem de grandeza é semelhante quer seja um desvio negativo ou positivo da média.

A tabela 7 resume os resultados obtidos para as estatísticas das quatro amostras em estudo. Nesta tabela abaixo apenas estão apresentados os resultados obtidos para as estatísticas acima definidos, não se apresentando os resultados obtidos pelo Sysmex por uma questão de simplificação, encontrando-se estes no Anexo I.

Tabela 7 – Valores das estatísticas das distribuições aleatórias para as quatro amostras em estudo.

	Levedura sementeira US	Levedura sementeira CB	Mosto semeado US	Mosto semeado CB
Observações	15	21	27	27
Média amostral \bar{x}	18,70	1,32	19,40	1,40
Desvio-padrão amostral s	0,45	0,04	0,87	0,03
Desvio-padrão da média amostral $s_{\bar{x}}$	0,12	0,01	0,19	0,01
Variância amostral σ^2	0,20	0,002	0,76	0,001
Coefficiente de variação amostral	0,024	0,030	0,045	0,021
Porcentagem de erro	2,4	3,0	4,5	2,1
Rácio “signal-to-noise”	41,6	33	22,3	46,7

Os resultados apresentados na tabela 7 evidenciam algumas das considerações feitas anteriormente. A cada observação individual está associado um erro que é dado pelo desvio-padrão da amostra, sendo que neste caso o conjunto de medições que apresenta maior erro é o relativo à amostra de mosto semeado US. O desvio-padrão da média amostral representativo do erro associado ao valor da média é inferior ao erro de cada observação individual, o que indica que com o aumento do número de medições diminuímos a incerteza no resultado obtido. A variância amostral ajuda a caracterizar a amostra em termos de dispersão, uma vez que se trata do quadrado dos desvios da média da amostra. Verifica-se uma maior dispersão dos resultados para a amostra de mosto semeado US. Relativamente ao coeficiente de variação amostral e porcentagem de erro, que possibilitam uma avaliação da dispersão dos resultados em relação à média, podemos concluir que a amostra referente ao mosto semeado US é também a que apresenta maior dispersão relativamente à média, no entanto, a amostra referente à levedura de sementeira CB também apresenta um coeficiente de variação elevado e, conseqüentemente, uma porcentagem de erro relativamente elevada. Os resultados do rácio “signal-to-noise” vêm confirmar as conclusões anteriores, uma vez que as amostras de mosto semeado US e levedura de sementeira CB são as que apresentam resultados mais baixos, o que nos indica que ocorreram maiores interferências do ruído nestes resultados.

5.6. TESTES NÃO-PARAMÉTRICOS – TESTES DE QUALIDADE DE AJUSTE

Os testes de hipóteses são também denominados de testes paramétricos quando satisfazem determinadas condições como: incidir sobre um parâmetro de uma ou mais populações e pressupor uma forma particular das distribuições populacionais, tal como a distribuição normal. Já no caso dos testes não-paramétricos, as condições acima referidas podem não ser satisfeitas [29]. Desta forma, serão utilizados os testes não-paramétricos, uma vez que apenas se dispõe de estimativas dos parâmetros. Dentro dos testes não-paramétricos serão utilizados os testes de qualidade de ajuste, que possibilitam a verificação de hipóteses acerca da forma da distribuição da população de onde uma amostra derivou [29]. Mais concretamente o teste a utilizar será o teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S).

O teste K-S efectua a análise do ajuste entre as funções de distribuição populacional, $F_0(x)$, que é admitida como hipótese nula (H_0), e de distribuição empírica ou da amostra, $S(x)$. A estatística teste (D) é dada pelo supremo da diferença em módulo entre $S(x)$ e $F_0(x)$, que pode ser representado pela equação (9) [29].

$$ET = D = \sup_x |S(x) - F_0(x)| \quad (9)$$

Seguidamente será descrita a metodologia utilizada para o cálculo do teste K-S de qualidade de ajuste.

✓ Formulação das hipóteses

$H_0: F(x) = F_0(x)$, que significa que a variável aleatória X, ou seja, o número de células numa amostra de levedura de sementeira US, segue a distribuição $N(18,7; 0,45)$. Mais concretamente, os parâmetros – média e variância populacional, são iguais aos estimadores – média e variância amostral, respectivamente.

$$H_1: F(x) \neq F_0(x)$$

✓ Nível de significância do teste

$$\alpha = 5\%$$

✓ Cálculo da estatística teste

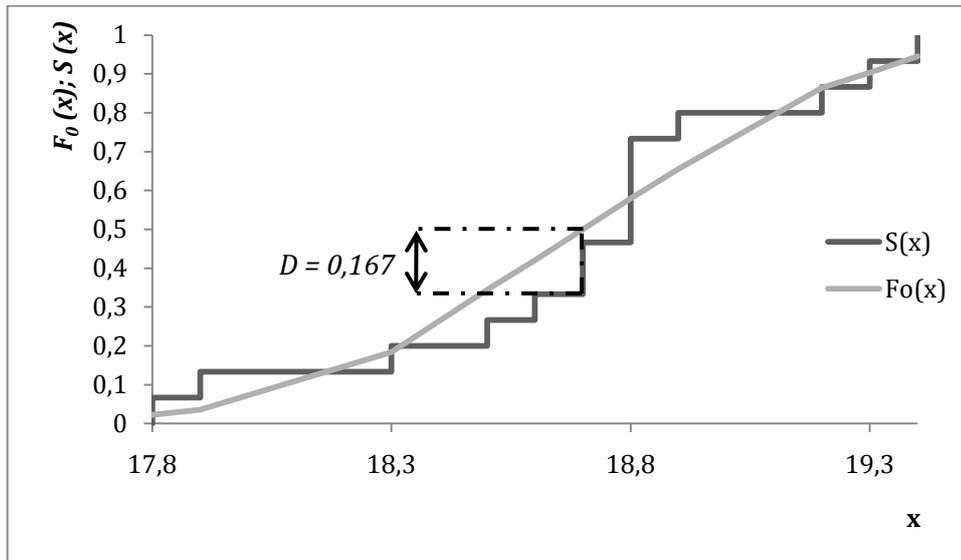


Figura 30 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de levedura de sementeira US.

A função de distribuição empírica ou da amostra, $S(x)$, é dada pela frequência relativa acumulada. Enquanto a função de distribuição populacional, $F_0(x)$, pode ser obtida a partir de dados tabelados (tabelas no Anexo II). Como exemplo ilustrativo, para $x = 17,8$ temos

$$\frac{x - \bar{x}}{s} = \frac{17,8 - 18,7}{0,45} = -2$$

para a distribuição $N(0,1)$, $F(-2) = 0,0227$, logo $F_0(17,8) = 0,0227$. Os valores de D foram calculados na vizinhança de cada valor de x , e o valor supremo calculado, ou seja, o valor máximo toma o valor de $D = 0,167$ e encontra-se representado na figura 30. Todos os valores obtidos encontram-se no Anexo II.

✓ Decisão estatística

O valor crítico de D para $\alpha = 5\%$ e $N = 15$ é obtido a partir de dados tabelados (tabelas no Anexo II) e toma o valor de $D_{15}(\alpha = 0,05) = 0,22$.

Uma vez que $D = 0,167 < D_{15}(\alpha = 0,05) = 0,22$, a hipótese nula é aceite, o que nos indica que, para um nível de significância de 5%, X segue uma distribuição $N(18,7; 0,45)$.

Os testes K-S para as restantes amostras foram efectuados de forma análoga pelo que apenas se apresentam os cálculos da estatística teste, nas figuras 31 a 33, e a decisão estatística para as restantes amostras, na tabela 8.

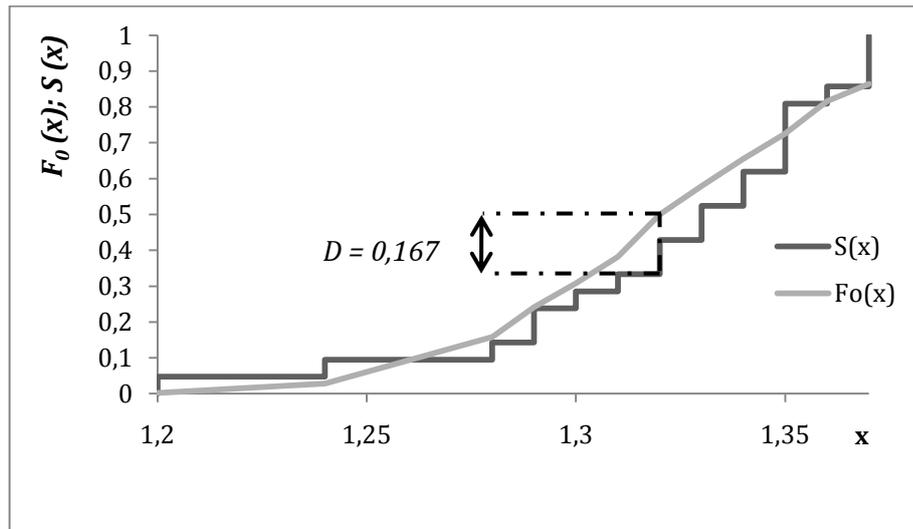


Figura 31 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de levedura de sementeira CB.

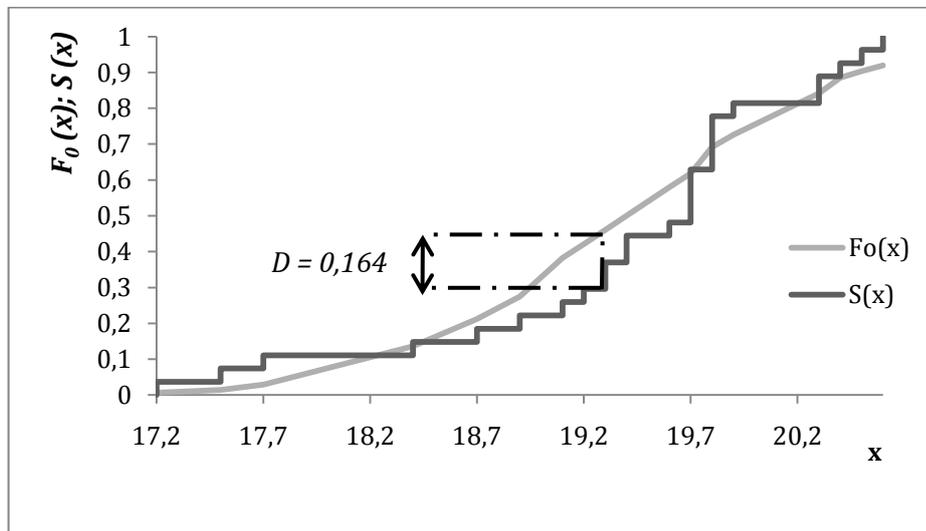


Figura 32 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de mosto semeado US.

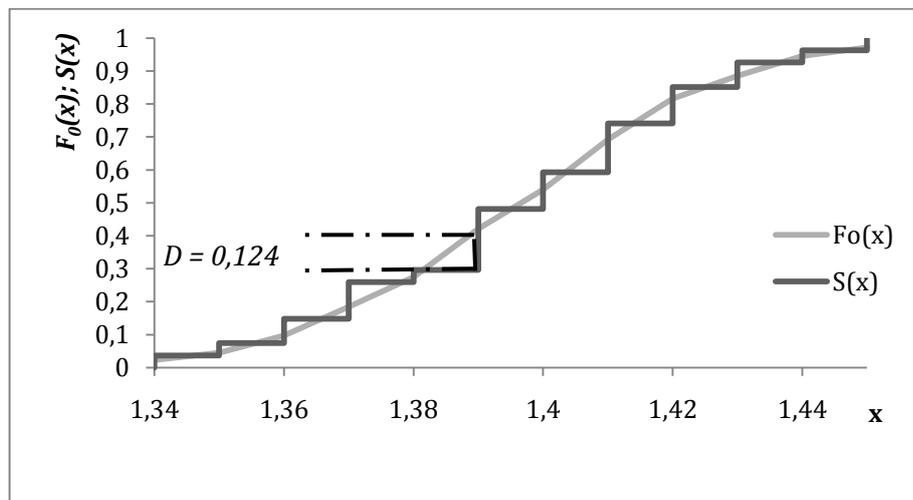


Figura 33 – Teste K-S efectuado aos resultados obtidos para a amostra de mosto semeado CB.

Tabela 8 - Resultados obtidos no teste K-S para as diferentes amostras em estudo, para um nível de significância de 5%.

Amostras	D	N	$D_N(\alpha)$	Hipótese nula
Levedura de sementeira US	0,167	15	0,220	Aceite
Levedura de sementeira CB	0,167	21	0,189	Aceite
Mosto semeado US	0,164	27	0,171	Aceite
Mosto semeado CB	0,124	27	0,171	Aceite

Segundo os dados da tabela 8, podemos concluir que, para um nível de significância de 5%, o número de células numa amostra de:

- ✓ levedura de sementeira US, segue a distribuição $N(18,7; 0,45)$;
- ✓ levedura de sementeira CB, segue a distribuição $N(1,32; 0,04)$;
- ✓ mosto semeado US, segue a distribuição $N(19,4; 0,87)$;
- ✓ mosto semeado CB, segue a distribuição $N(1,40; 0,03)$.

Desta forma, para o nível de significância adoptado, podemos constatar que os parâmetros valor esperado – μ , e desvio-padrão – σ são iguais às estimativas obtidas a partir dos dados amostrais, ou seja, são iguais à média amostral e desvio-padrão amostral.

5.7. PROPAGAÇÃO DOS ERROS NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX

Os resultados obtidos no Sysmex não são os resultados finais que se procuram, pois ainda é necessário efectuar cálculos para obter o número de células numa amostra. Estamos então perante um caso em que a medição é seguida de um tratamento de resultados, ou seja, o processo de medição engloba mais do que um passo e, desta forma, também a análise dos erros deverá ser um processo com mais de um passo. Assim recorre-se à lei da propagação dos erros, para averiguar, como o próprio nome indica, de que forma os erros se propagam através dos cálculos e afectam o resultado final [30].

Os erros aleatórios associados ao processo de medição já foram anteriormente avaliados. Portanto segue-se agora a aplicação da lei da propagação dos erros aos resultados experimentais obtidos para as quatro amostras em estudo, pelas razões anteriormente referidas.

As equações de cálculo utilizadas no método de contagem de células de levedura enquadram-se no caso de um função de apenas uma variável – $f(x)$, que se trata da média das medições efectuadas no Sysmex. Neste caso, a forma analítica da lei da propagação dos erros é dada pela equação (10), que pode ser aproximada à equação (11), se o erro em x for suficientemente pequeno [30].

$$\lim_{\Delta x \rightarrow 0} \frac{\Delta f}{\Delta x} = \frac{df}{dx} \quad (10)$$

$$\Delta f \approx \frac{df}{dx} \Delta x \quad (11)$$

As equações de cálculo utilizadas no método em estudo variam de amostra para amostra. As equações (12) e (13) são as equações de cálculo utilizadas no caso da levedura de sementeira para um amostra US e CB, respectivamente, enquanto as equações (14) e (15) são utilizadas para amostras US e CB de mosto semeado, respectivamente.

$$n \text{ células} = \mu \times 100 \quad (12)$$

$$n \text{ células} = \mu \times 100 \times 10 \quad (13)$$

$$n \text{ células} = \mu \times 1,05 \quad (14)$$

$$n \text{ células} = \mu \times 1,05 \times 10 \quad (15)$$

Por aplicação da equação (11), as equações de cálculo acima tomam as formas das equações (16) a (19), respectivamente.

$$\Delta n \text{ células} = 100 \Delta \mu \quad (16)$$

$$\Delta n \text{ células} = 1000 \Delta \mu \quad (17)$$

$$\Delta n \text{ células} = 1,05 \Delta \mu \quad (18)$$

$$\Delta n \text{ células} = 10,5 \Delta \mu \quad (19)$$

Recorrendo aos dados da tabela 7, o cálculo das equações (16) a (19) é relativamente simples. Os dados obtidos encontram-se na tabela 9.

Tabela 9 – Resultados obtidos pela aplicação da lei da propagação dos erros para as quatro tipo de amostras em estudo.

	Levedura de sementeira US	Levedura de sementeira CB	Mosto semeado US	Mosto semeado CB
Média μ	18,7	1,32	19,4	1,40
Erro $\Delta\mu$	0,12	0,01	0,19	0,01
Δn células	12	10	0,1995	0,105
n células	1870	1320	20,37	14,7
	1870 ± 12 ($10^6/g$)	1320 ± 10 ($10^6/g$)	$20,4 \pm 0,2$ ($10^6/ml$)	$14,7 \pm 0,1$ ($10^6/ml$)

Efectuando uma análise aos dados da tabela 9 facilmente se verifica que, como era esperado, o erro propagado para o resultado final é directamente proporcional ao erro da medição. Tal também podia ser constatado pelas fórmulas resultantes (equações (16) a (19)) pela aplicação da lei da propagação dos erros. É assim possível apresentar o resultado final acompanhado do erro que lhe está associado.

CAPÍTULO 6: IMPLEMENTAÇÃO DO AUTOCONTROLO NA CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX

Como referido anteriormente um dos objectivos específicos deste trabalho é a passagem da contagem de células de levedura para autocontrolo pelo método Sysmex.

O autocontrolo é entendido, numa perspectiva industrial, como o controlo de variáveis importantes, neste caso, a contagem de células de levedura em diferentes etapas do processo, pelos técnicos de produção encarregues da condução e supervisão do processo industrial. A necessidade da implementação do autocontrolo deve-se essencialmente ao facto de nem sempre estarem disponíveis os resultados referentes à contagem de células, nomeadamente, fora do horário de trabalho dos responsáveis pelo controlo de qualidade. Ora, tal facto é uma limitação, uma vez que a Unicer opera em laboração contínua, que tem como consequência o atraso de decisões importantes para o processo.

Neste sentido, é necessário primeiramente identificar as ferramentas necessárias à passagem do método para autocontrolo. Estas ferramentas passam pela criação de instruções de trabalho que garantam os procedimentos operacionais adequados e pela criação das condições adequadas à formação dos técnicos.

Esta formação irá assentar em três bases: a base teórica, com a exposição de conceitos teóricos relativos à levedura cervejeira, ao método analítico e aos erros experimentais; a base teórico-prática, com a exemplificação de todas as etapas do processo analítico; e a base prática, com a realização do método analítico pelos técnicos de produção e avaliação da performance dos mesmos durante a execução da análise.

Fica então assente que a formação dos técnicos de produção se divide essencialmente em formação teórica, formação teórico-prática e formação prática. Na tabela 10 estão resumidos os objectivos específicos da formação, bem como a dinamização e o suporte a utilizar em cada sessão de formação. A apresentação power-point bem como a instrução de trabalho encontram-se no Anexo III.

A implementação do autocontrolo conduz a benefícios como a redução do tempo de espera das análises laboratoriais, e deste modo, conduz também a um aumento na rapidez de decisão e, por último, com a correcção dos erros aumenta-se também a fiabilidade dos resultados do método analítico.

Tabela 10 – Plano de formação dos técnicos de produção para a implementação do autocontrolo na contagem de células de levedura por Sysmex.

FORMAÇÃO	OBJECTIVOS ESPECÍFICOS	DINAMIZAÇÃO	SUPORTE A USAR NA SESSÃO
Teórica	Familiarização com a levedura cervejeira.	O que é a levedura cervejeira? Qual a sua importância no processo de produção de cerveja?	Apresentação power-point.
	Familiarização com a importância da contagem de células.	Qual a importância da contagem de células de levedura para o processo?	Apresentação power-point.
	Dar a conhecer o equipamento.	Informação sobre o princípio de funcionamento do equipamento. Mostrar os elementos de medição no equipamento.	Apresentação power-point. Equipamento Sysmex.
	Familiarização com as teclas do Sysmex.	Mostrar e explicar as funções das teclas do Sysmex.	Apresentação power-point. Equipamento Sysmex.
	Familiarização com o método analítico.	Dar a conhecer todas as etapas do processo analítico. Explicar detalhadamente cada etapa do processo analítico.	Apresentação power-point.
	Familiarização com os erros experimentais.	Distinção entre erros aleatórios e sistemáticos.	Apresentação power-point.
	Familiarização com as acções correctivas dos erros e com o efeito destes no método analítico.	Apresentação das acções correctivas. Apresentação dos efeitos dos erros no método analítico.	Apresentação power-point.
Teórico-prática	Técnico de produção visualiza a execução de todas as etapas do método analítico de contagem de células de levedura.	Exemplificação de todas as etapas do método analítico, no laboratório, ao técnico de produção em formação. Destaque das etapas mais problemáticas e dos erros que daí possam advir.	Equipamento e material de laboratório necessário à execução do método analítico.
	Técnico de produção realiza todas as etapas do método analítico.	O técnico de produção efectua no laboratório as etapas do método analítico de contagem de células de levedura, com supervisão.	Equipamento e material de laboratório necessário à execução do método analítico.
Prática	Técnico de produção executa sozinho o método de contagem de células de levedura por Sysmex.	O técnico de produção executa, sozinho, todas as etapas do método analítico.	Equipamento e material de laboratório necessário à execução do método analítico.
	Técnico de produção é avaliado na execução do método analítico.	Avaliação da capacidade do técnico de produção efectuar sozinho o método de contagem de células de levedura.	Equipamento e material de laboratório necessário à execução do método analítico.

CAPÍTULO 7: CONCLUSÃO E TRABALHOS FUTUROS

Antes de mais, é importante frisar a mais-valia que é para a aprendizagem de um aluno o contacto com um ambiente profissional, possibilitando o confronto do conhecimento adquirido durante a formação académica com a aplicação prática em questão.

Para que a etapa de fermentação do processo de produção de cerveja ocorra sem problemas, de forma a não prejudicar economicamente a empresa, são necessários resultados exactos e expeditos do número de células de levedura. Assim, a implementação do autocontrolo surge para as empresas como uma mais-valia para a obtenção mais rápida de resultados referentes a variáveis processuais importantes, quando estas não dispõem de tecnologias mais avançadas que permitam a determinação dessas mesmas variáveis “online”, uma vez que esta acarreta custos financeiros menores e é, de uma forma geral, de mais simples implementação.

As ferramentas necessárias à implementação do autocontrolo que foram identificadas resumem-se: à criação de instruções de trabalho de forma a garantir-se que as contagens são efectuadas correctamente e de acordo com os procedimentos adequados, e à criação de condições necessárias à formação dos técnicos, que passam pela preparação da formação teórica e da formação prática.

O conhecimento do método analítico e da metodologia do tratamento de erros permite aos experimentalistas, numa primeira fase, a correcção e conseqüente eliminação dos erros sistemáticos, pela aplicação de acções correctivas ou mesmo pela realização de procedimentos considerados padrão e muitas vezes encontrados na literatura. Numa segunda fase, permite efectuar o tratamento estatístico dos erros aleatórios, possibilitando inferir sobre a incerteza associada ao resultado experimental e ainda caracterizar a distribuição dos resultados em termos de localização e dispersão. Com tudo isto, atribui-se uma maior confiança aos resultados experimentais.

Após efectuada a identificação dos erros sistemáticos do processo de medição e quais as causas que lhes deram origem, foram encontradas acções correctivas que, de uma forma global, passam pelo treino e sensibilização dos técnicos de produção e, como referido anteriormente, pela adopção de procedimentos padrão como a leitura do branco de uma amostra ou determinações paralelas. A análise estatística dos erros aleatórios foi possível após a caracterização das distribuições obtidas para os diferentes tipos de amostra –

levedura de sementeira US e CB e mosto semeado US e CB. Estes resultados indicam que a amostra referente ao mosto semeado US apresenta uma dispersão de resultados superior às restantes amostras, uma vez que a variância amostral que lhe corresponde é superior às restantes. O cálculo de outras estatísticas, tais como o coeficiente de variação amostral, a percentagem de erro e o rácio "signal-to-noise", demonstrou que as amostras de levedura de sementeira CB e mosto semeado US apresentam uma elevada dispersão de resultados em relação à média e, conseqüentemente, uma percentagem de erro também superior à das restantes amostras. Tais conclusões são também apoiadas pelos baixos resultados obtidos por estas amostras quando efectuado o cálculo do rácio "signal-to-noise", o que nos indica que o sinal obtido para estas estava a ser mais corrompido pelo ruído que para as outras amostras.

Os testes de qualidade de ajuste, mais propriamente o teste Kolmogorov-Smirnov (K-S), permitiu concluir que os parâmetros – valor esperado e variância populacional, são iguais às estatísticas – média e variância amostral, para um nível de significância de 5%, uma vez que a hipótese nula não foi rejeitada. Por último, a aplicação da lei da propagação dos erros permitiu concluir que o erro propagado para o resultado final é directamente proporcional ao erro de medição e, que a incerteza associada ao resultado final é, em todos os casos analisados, inferior a 1% do resultado final.

Associado ao conhecimento do número de células de levedura deve estar também o conhecimento da viabilidade da mesma, permitindo desta forma efectuar uma correcta sementeira de levedura no processo. A análise efectuada aos diferentes tipos de métodos utilizados para efectuar a contagem de células e também para a determinação da viabilidade da levedura permitiu concluir que, embora o método electroquímico utilizado na Unicer - Sysmex, se apresente como um método vantajoso em termos de tempo para obtenção de resultados e precisão dos mesmos, existem outros métodos mais expeditos e que permitem a determinação do número de células e ainda da viabilidade da levedura em tempo real, como é o caso dos métodos electroquímicos mais avançados, dos quais se destacam os dispositivos "lab-on-chip" e o "Yeast Monitor".

Neste sentido, seria interessante para trabalhos futuros avaliar a viabilidade da aplicação destes métodos no processo cervejeiro, efectuando uma comparação em termos de custo-benefício entre os dispositivos "lab-on-chip" e o "Yeast Monitor", uma vez que estes se revelaram os mais vantajosos de entre os métodos electroquímicos e os restantes

métodos encontrados na literatura para a determinação do número de células e ainda viabilidade da levedura.

A par com o estudo necessário à implementação destes métodos automatizados, deveria também ser efectuada uma análise aos erros de natureza experimental para desta forma ser possível verificar que, pelo facto de se diminuir ou mesmo anular a intervenção humana com estes equipamentos, a incerteza associada ao resultado experimental seria menor. Tal também pode ser comprovado pelas características da distribuição, localização e dispersão dos resultados obtidos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Meussdoerffer, F. (2009). *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*. Wiley, Weinheim.
- [2] *Cervejas do mundo*. [Online] [Acedido em: 22 de Março de 2011.] <http://www.cervejasdomundo.com/EraModerna.htm>.
- [3] Linko, L., Haikara, A., Ritala, A., Penttillä, M. (1998). Recent advances in the malting and brewing industry. *Journal of Biotechnology*, 65: 85-98.
- [4] *Unicer - KIT ESTUDANTES*. [Online] [Acedido em: 2 de Maio de 2011.] http://www.unicer.pt/fotos/gca/1118251879brochura_cerveja.pdf.
- [5] Lodolo, E., Kock, J., Axcell, B., Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, 8: 1018-1036.
- [6] *APTCM – Associação Portuguesa dos Técnicos de Cerveja e Malte*. [Online] [Acedido em: 18 de Março de 2011.] <http://aptc.org/asp/index.asp>.
- [7] Rodrigues, P. (2003) *Desenvolvimento de Métodos Electroanalíticos para a Determinação de Biomarcadores. Diacetilo e Vitalidade de Levedura em Indústria Cervejeira e Metalotioneínas em Estudos Ambientais*. Dissertação para Doutoramento em Química. Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- [8] Burnie, D. (1994). *Dicionário da Natureza*. Bessa, M. (tradução), Civilização Editora, Porto.
- [9] Kuřec, M., Baszczyński, M., Lehnert, R., Mota, A., Teixeira, J., Brányik, T. (2009). Flow Cytometry for Age Assessment of a Yeast Population and its Applications in Beer Fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 115: 253-258.
- [10] Brandão, G., Bento, C., Silva, J. (2006). Elementos Biotecnológicos fundamentais no processo cervejeiro: 1ª parte – as leveduras. *Revista Analytica*, 25: 36 – 42.
- [11] Boyd, A., Gunasekera, T., Attfield, P., Simic, K., Vicent, S., Veal, D. (2003) A flow-cytometric method for determination of yeast viability and cell number in a brewery. *FEMS Yeast Research*, 3: 11-16.
- [12] Son, S., Choi, Y., Lee, S. (2008). An efficient cell count method using a lattice molded on indents of a culture dish. *Sensors and Actuators A: Physical*, 147: 665-671.

- [13] Endo, H., Hayashi, T., Nakayama, J., Mukada, Y., Watanabe, E. (1998). Rapid Determination of the Number of Viable Yeast Cells During Fermentation by Flow Cytometry. *Journal of Tokyo University of Fisheries*, 85: 65-72.
- [14] e-escola – Instituto Superior Técnico. *Contagem de células viáveis*. [Online] [Acedido em: 25 de Maio de 2011] <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=235&ordem=3>.
- [15] McLean, D., Holcomb, J., Maxwell, K., Somes, J. (2001) A Novel Method for Quantitation of Active Yeast Cells. *Technical Report*, 2: 1-5.
- [16] Díaz, M., Herrero, M., García, L., Quirós, C. (2010) Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48: 385-407.
- [17] *Contagem de leucócitos*. [Online] [Acedido em: 26 de Maio de 2011.] <http://analgesi.co.cc/html/t25246.html>.
- [18] e-escola – Instituto Superior Técnico. *Contagem de células totais*. [Online] [Acedido em: 25 de Maio de 2011] <http://www.e-escola.pt/topico.asp?id=235&ordem=2>.
- [19] *Del Gen a la Proteína – Módulos experimentales* [Online] [Acedido em: 26 de Junho de 2011.] <http://www.umce.cl/delgenalaproteina/modulos/modulo05.php>.
- [20] Felice, D., Sun, J., Liu, R. (2009) A modified methylene blue assay for accurate cell counting. *Journal of Functional Foods*, 1: 109-118.
- [21] Roberts, K. (1999). *A silicon microfabricated aperture for counting cells using the aperture impedance technique*. Master Thesis in Applied Science. School of Engineering Science – Simon Fraser University, Canada.
- [22] Mernier, G., Piacentini, N., Tornay, R., Buffi, N., Renaud, P. (2009) Label-free Sorting and Counting of Yeast Cells for Viability Studies. *Procedia Chemistry*, 1: 385-388.
- [23] Carvell, J., Turner, K. (2003) New Applications and Methods Utilizing Radio-Frequency Impedance Measurements for Improving Yeast Management. *Master Brewers Association of the Americas*, 40: 30-38.
- [24] Box, G., Hunter, J., Hunter, W. (2005). *Statistics for Experimenters – Design, Innovation, and Discovery*, 2nd edition, Wiley-Interscience, New Jersey.

- [25] Dietrich, C. (1991). *Uncertainty, Calibration and Probability: The Statistics of Scientific and Industrial Measurement*, 2nd edition, Adam Hilger, Bristol.
- [26] Fonseca, I. (2004). Erros experimentais – uma abordagem pedagógica – Parte I, *Sociedade Portuguesa de Química*, 95: 37-41.
- [27] Mendham, J., Denney, R., Barnes, J., Thomas, M. (Eds.). (2002) *Vogel – Análise Química Quantitativa*, 6^a edição, LTC Editora, Rio de Janeiro.
- [28] Williams, A., Ellison, S., Roesslein, M. (Eds.). (2000). Eurachem/CITAC guide: *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, 2nd edition, LGC Limited, London.
- [29] Guimarães, R., Cabral, J. (1997). *Estatística*, McGraw-Hill, Lisboa.
- [30] Fonseca, I. (2005). Erros experimentais – uma abordagem pedagógica – Parte II, *Sociedade Portuguesa de Química*: 23-29.
- [31] Young, H. (1962). *Statistical Treatment of Experimental Data*. McGraw-Hill, New York.

ANEXO I: RESULTADOS OBTIDOS POR SYSMEX E CÁLCULO DE ESTADÍSTICAS

Na tabela I.1 encontram-se os valores obtidos por Sysmex para as diferentes amostras em análise. Ainda nesta tabela se encontram os resultados obtidos para as estatísticas utilizadas para a caracterização das diferentes distribuições.

Tabela I.1 – Resultados obtidos por Sysmex e cálculo das estatísticas.

Observações	Levedura de sementeira US	Levedura de sementeira CB	Mosto semeado US	Mosto semeado CB
1	17,8	1,2	17,2	1,34
2	17,9	1,24	17,5	1,35
3	18,3	1,28	17,7	1,36
4	18,5	1,29	18,4	1,36
5	18,6	1,29	18,7	1,37
6	18,7	1,3	18,9	1,37
7	18,7	1,31	19,1	1,37
8	18,8	1,32	19,2	1,38
9	18,8	1,32	19,3	1,39
10	18,8	1,33	19,3	1,39
11	18,8	1,33	19,4	1,39
12	18,9	1,34	19,4	1,39
13	19,2	1,34	19,6	1,39
14	19,3	1,35	19,7	1,4
15	19,4	1,35	19,7	1,4
16		1,35	19,7	1,4
17		1,35	19,7	1,41
18		1,36	19,8	1,41
19		1,37	19,8	1,41
20		1,37	19,8	1,41
21		1,37	19,8	1,42
22			19,9	1,42
23			20,3	1,42
24			20,3	1,43
25			20,4	1,43
26			20,5	1,44
27			20,6	1,45
Média amostral \bar{x}	18,70	1,32	19,40	1,40
Desvio-padrão amostral s	0,45	0,04	0,87	0,03
Desvio-padrão da média amostral $s_{\bar{x}}$	0,12	0,01	0,19	0,01
Variância amostral σ^2	0,20	0,002	0,76	0,001
Coefficiente de variação amostral	0,024	0,030	0,045	0,021
Percentagem de erro	2,4	3,0	4,5	2,1
Rácio <i>signal-to-noise</i>	41,6	33	22,3	46,7

ANEXO II: CÁLCULOS DA ESTATÍSTICA TESTE DO TESTE K-S. TABELAS AUXILIARES.

Nas tabelas II.1 a II.4 encontram-se os valores obtidos para a função de distribuição da amostra ($S(x)$), para a função de distribuição populacional ($F_0(x)$) e para a estatística teste ($D = |s(x) - F_0(x)|$), para cada amostra em estudo. Já no caso das figuras II.1 e II.2, estas correspondem às tabelas utilizadas para determinar os valores da função de distribuição populacional ($F_0(x)$), que se encontram também representados nas tabelas abaixo, e o valor crítico de D para determinado nível de significância e número de amostras.

Tabela II.1 - Cálculo da estatística D para a amostra de levedura de sementeira US.

x	$S(x)$	$F_0(x)$	$ S(x) - F_0(x) $
17,8	0,0667	0,0227	0,0227- 0,0440+
17,9	0,1333	0,0359	0,0308- 0,0974+
18,3	0,2000	0,1841	0,0508- 0,0159+
18,5	0,2667	0,3446	0,1446- 0,0779+
18,6	0,3333	0,4207	0,1540- 0,0874+
18,7	0,4667	0,5000	0,1667- 0,0333+
18,8	0,7333	0,5793	0,1126- 0,1540+
18,9	0,8000	0,6554	0,0779- 0,1446+
19,2	0,8667	0,8643	0,0643- 0,0024+
19,3	0,9333	0,9032	0,0365- 0,0301+
19,4	1,0000	0,9452	0,0119- 0,0548+

Tabela II.2 - Cálculo da estatística D para a amostra de levedura de sementeira CB.

x	$S(x)$	$F_0(x)$	$ S(x) - F_0(x) $
1,2	0,0476	0,0026	0,0026 ⁻ 0,0450 ⁺
1,24	0,0952	0,0287	0,0189 ⁻ 0,0665 ⁺
1,28	0,1429	0,1587	0,0635 ⁻ 0,0158 ⁺
1,29	0,2381	0,2420	0,0991 ⁻ 0,0039 ⁺
1,3	0,2857	0,3085	0,0704 ⁻ 0,0228 ⁺
1,31	0,3333	0,3821	0,0964 ⁻ 0,0488 ⁺
1,32	0,4286	0,5000	0,1667 ⁻ 0,0714 ⁺
1,33	0,5238	0,5793	0,1507 ⁻ 0,0555 ⁺
1,34	0,6190	0,6554	0,1316 ⁻ 0,0364 ⁺
1,35	0,8095	0,7257	0,1067 ⁻ 0,0838 ⁺
1,36	0,8571	0,8159	0,0064 ⁻ 0,0412 ⁺
1,37	1,0000	0,8643	0,0072 ⁻ 0,1357 ⁺

Tabela II.3 - Cálculo da estatística D para a amostra de mosto semeado US.

x	$S(x)$	$F_0(x)$	$ S(x) - F_0(x) $
17,2	0,0370	0,0062	0,0062- 0,0308+
17,5	0,0741	0,0139	0,0231- 0,0602+
17,7	0,1111	0,0287	0,0454- 0,0824+
18,4	0,1481	0,1357	0,0246- 0,0124+
18,7	0,1852	0,2119	0,0638- 0,0267+
18,9	0,2222	0,2743	0,0891- 0,0521+
19,1	0,2593	0,3821	0,1599- 0,1228+
19,2	0,2963	0,4207	0,1614- 0,1244+
19,3	0,3704	0,4602	0,1639- 0,0898+
19,4	0,4444	0,5000	0,1296- 0,0556+
19,6	0,4815	0,5793	0,1349- 0,0978+
19,7	0,6296	0,6179	0,1364- 0,0117+
19,8	0,7778	0,6915	0,0619- 0,0863+
19,9	0,8148	0,7257	0,0521- 0,0891+
20,3	0,8889	0,8413	0,0265- 0,0476+
20,4	0,9259	0,8849	0,0040- 0,0410+
20,5	0,9630	0,9032	0,0227- 0,0598+
20,6	1,0000	0,9192	0,0438- 0,0808+

Tabela II.4 - Cálculo da estatística D para a amostra de mosto semeado CB.

x	$S(x)$	$F_0(x)$	$ S(x) - F_0(x) $
1,34	0,0370	0,0227	0,0227 ⁻ 0,0143 ⁺
1,35	0,0741	0,0446	0,0076 ⁻ 0,0295 ⁺
1,36	0,1481	0,0968	0,0227 ⁻ 0,0513 ⁺
1,37	0,2593	0,1841	0,0360 ⁻ 0,0752 ⁺
1,38	0,2963	0,2743	0,0150 ⁻ 0,0220 ⁺
1,39	0,4815	0,4207	0,1244 ⁻ 0,0608 ⁺
1,4	0,5926	0,5398	0,0583 ⁻ 0,0528 ⁺
1,41	0,7407	0,6915	0,0989 ⁻ 0,0492 ⁺
1,42	0,8519	0,8159	0,0752 ⁻ 0,0360 ⁺
1,43	0,9259	0,8849	0,0330 ⁻ 0,0410 ⁺
1,44	0,9630	0,9452	0,0193 ⁻ 0,0178 ⁺
1,45	1,0000	0,9713	0,0083 ⁻ 0,0287 ⁺

$Z(\alpha)=a+b$										
$b \rightarrow$	0.00	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.06	0.07	0.08	0.09
$a \downarrow$										
0.0	0.5000	0.4960	0.4920	0.4880	0.4840	0.4801	0.4761	0.4721	0.4681	0.4641
0.1	0.4602	0.4562	0.4522	0.4483	0.4443	0.4404	0.4364	0.4325	0.4286	0.4247
0.2	0.4207	0.4168	0.4129	0.4090	0.4052	0.4013	0.3974	0.3936	0.3897	0.3859
0.3	0.3821	0.3783	0.3745	0.3707	0.3669	0.3632	0.3594	0.3557	0.3520	0.3483
0.4	0.3446	0.3409	0.3372	0.3336	0.3300	0.3264	0.3228	0.3192	0.3156	0.3121
0.5	0.3085	0.3050	0.3015	0.2981	0.2946	0.2912	0.2877	0.2843	0.2810	0.2776
0.6	0.2743	0.2709	0.2676	0.2643	0.2611	0.2578	0.2546	0.2514	0.2483	0.2451
0.7	0.2420	0.2389	0.2358	0.2327	0.2296	0.2266	0.2236	0.2206	0.2177	0.2148
0.8	0.2119	0.2090	0.2061	0.2033	0.2005	0.1977	0.1949	0.1921	0.1894	0.1867
0.9	0.1841	0.1814	0.1788	0.1762	0.1736	0.1711	0.1685	0.1660	0.1635	0.1611
1.0	0.1587	0.1562	0.1539	0.1515	0.1492	0.1469	0.1446	0.1423	0.1401	0.1379
1.1	0.1357	0.1335	0.1314	0.1292	0.1271	0.1251	0.1230	0.1210	0.1190	0.1170
1.2	0.1151	0.1131	0.1112	0.1093	0.1075	0.1056	0.1038	0.1020	0.1003	0.0985
1.3	0.0968	0.0951	0.0934	0.0918	0.0901	0.0885	0.0869	0.0853	0.0838	0.0823
1.4	0.0808	0.0793	0.0778	0.0764	0.0749	0.0735	0.0721	0.0708	0.0694	0.0681
1.5	0.0668	0.0655	0.0643	0.0630	0.0618	0.0606	0.0594	0.0582	0.0571	0.0559
1.6	0.0548	0.0537	0.0526	0.0516	0.0505	0.0495	0.0485	0.0475	0.0465	0.0455
1.7	0.0446	0.0436	0.0427	0.0418	0.0409	0.0401	0.0392	0.0384	0.0375	0.0367
1.8	0.0359	0.0351	0.0344	0.0336	0.0329	0.0322	0.0314	0.0307	0.0301	0.0294
1.9	0.0287	0.0281	0.0274	0.0268	0.0262	0.0256	0.0250	0.0244	0.0239	0.0233
2.0	0.0227	0.0222	0.0217	0.0212	0.0207	0.0202	0.0197	0.0192	0.0188	0.0183
2.1	0.0179	0.0174	0.0170	0.0166	0.0162	0.0158	0.0154	0.0150	0.0146	0.0143
2.2	0.0139	0.0136	0.0132	0.0129	0.0125	0.0122	0.0119	0.0116	0.0113	0.0110
2.3	0.0107	0.0104	0.0102	0.0099	0.0096	0.0094	0.0091	0.0089	0.0087	0.0084
2.4	0.0082	0.0080	0.0078	0.0075	0.0073	0.0071	0.0069	0.0068	0.0066	0.0064
2.5	0.0062	0.0060	0.0059	0.0057	0.0055	0.0054	0.0052	0.0051	0.0049	0.0048
2.6	0.0047	0.0045	0.0044	0.0043	0.0041	0.0040	0.0039	0.0038	0.0037	0.0036
2.7	0.0035	0.0034	0.0033	0.0032	0.0031	0.0030	0.0029	0.0028	0.0027	0.0026
2.8	0.0026	0.0025	0.0024	0.0023	0.0023	0.0022	0.0021	0.0021	0.0020	0.0019
2.9	0.0019	0.0018	0.0017	0.0017	0.0016	0.0016	0.0015	0.0015	0.0014	0.0014
3.0	0.00135	0.00131	0.00126	0.00122	0.00118	0.00114	0.00111	0.00107	0.00104	0.00100

Figura II.1 – Probabilidades associadas à cauda direita da distribuição normal padronizada (retirado de Guimarães *et al.* [29]).

Dimensão da Amostra	Nível de Significância (α)					
	N	0.20	0.15	0.10	0.05	0.01
4		0.300	0.319	0.352	0.381	0.417
5		0.285	0.299	0.315	0.337	0.405
6		0.265	0.277	0.294	0.319	0.364
7		0.217	0.253	0.276	0.300	0.348
8		0.233	0.244	0.261	0.285	0.331
9		0.223	0.233	0.249	0.271	0.311
10		0.215	0.224	0.239	0.258	0.294
11		0.206	0.217	0.230	0.249	0.284
12		0.199	0.212	0.223	0.242	0.275
13		0.190	0.202	0.214	0.234	0.268
14		0.183	0.194	0.207	0.227	0.261
15		0.177	0.187	0.201	0.220	0.257
16		0.173	0.182	0.195	0.213	0.250
17		0.169	0.177	0.189	0.206	0.245
18		0.166	0.173	0.184	0.200	0.239
19		0.163	0.169	0.179	0.195	0.235
20		0.160	0.166	0.174	0.190	0.231
25		0.149	0.153	0.165	0.180	0.203
30		0.131	0.136	0.144	0.161	0.187
>30		$\frac{0.730}{\sqrt{N}}$	$\frac{0.768}{\sqrt{N}}$	$\frac{0.805}{\sqrt{N}}$	$\frac{0.886}{\sqrt{N}}$	$\frac{1.031}{\sqrt{N}}$

Figura II.2 - Tabela dos valores críticos da distribuição da estatística D (Lilliefors, Populações Normais) (retirado de Guimarães *et al.* [29]).

ANEXO III: INSTRUÇÃO DE TRABALHO E APRESENTAÇÃO DA FORMAÇÃO TEÓRICA

INSTRUÇÃO DE TRABALHO

CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX



1. OBJECTIVO E CAMPO DE APLICAÇÃO

O método que abaixo se define é o de contagem de células de levedura recorrendo ao equipamento Sysmex. Este método é aplicável sempre que se pretenda determinar o número de células de levedura no mosto semeado – levedura em fermentação e propagação – e em levedura de sementeira – levedura em stockagem.

2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

A zona de leitura do Sysmex é constituída essencialmente por um transdutor com um orifício – opérculo, pelo qual passa um volume exacto de suspensão de levedura, e dois eléctrodos, um interno e outro externo. Estes encontram-se imersos numa solução de electrólito que permite a existência de um fluxo de corrente constante.

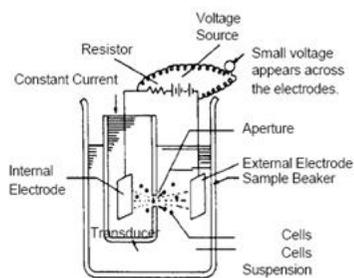


Figura 1 – Sistema de medição do Sysmex [1].

As células de levedura encontram-se também em suspensão no electrólito. Iniciado o ciclo de contagem, quando uma célula de levedura passa através do opérculo ocorre uma alteração na resistência entre os dois eléctrodos, o que provoca um impulso de tensão, de curta duração, que tem uma amplitude

proporcional ao volume da partícula. Estes impulsos vão sendo registados electronicamente pelo equipamento.

3. EQUIPAMENTO E MATERIAL

3.1. REAGENTES

- 3.1.1. Electrólito (CELLPACK);
- 3.1.2. Solução de ácido sulfúrico, $[H_2SO_4] = 0,05 \text{ mol/L}$;
- 3.1.3. Solução de sulfato de cobre pentaidratado a 3,05 g/100 ml.

3.2. EQUIPAMENTO

Sysmex F-520.

3.3. MATERIAL (Todo o material se deve apresentar totalmente seco)

- 3.3.1 Frascos para amostragem (plástico e vidro);
- 3.3.2 Espátula ou colher;
- 3.3.3 Pipetas de Pasteur;
- 3.3.4 Copos de vidro de 50 ml;
- 3.3.5 Balões volumétricos de 50 e 100 ml;
- 3.3.6 Pipetas volumétricas de 1 e 5 ml ou micropipetas;
- 3.3.7 Copos de leitura Sysmex;
- 3.3.8 Frascos com dispensador de líquidos para o CELLPACK;
- 3.3.9 Balança;
- 3.3.10 Pompe.

4. AMOSTRAGEM

4.1. MOSTO SEMEADO

LEVEDURA EM FERMENTAÇÃO

A amostra de levedura em fermentação é recolhida 2 horas após a cuba de fermentação se encontrar completa. A amostra é recolhida para um frasco de plástico com 5 ml de sulfato de cobre e o volume final deve ser de 100 ml.

Antes da colheita da amostra deve ser efectuada uma purga de tubagem (a purga está completa quando a temperatura da tubagem desce) e após a colheita a torneira de amostragem deve ser higienizada correctamente (com água destilada e álcool).

A adição de sulfato de cobre prende-se com o facto de a amostra de levedura se alterar com o tempo, funcionando o sulfato de cobre como inibidor do crescimento da levedura.

LEVEDURA EM PROPAGAÇÃO

A recolha de amostras de levedura em propagação passa por 5 fases. A primeira recolha de amostra é efectuada 1 hora após a inoculação da levedura no tanque de propagação de menor volume. A segunda recolha de amostras é efectuada antes da passagem da levedura do tanque de propagação de menor volume para o tanque de propagação de maior volume. A amostragem que se segue é colhida antes da passagem do tanque de propagação de maior volume para a cuba de fermentação. As restantes recolhas são efectuadas já nas cubas de fermentação.

À semelhança do referido anteriormente para a levedura em fermentação, a amostragem é colhida em frascos de plástico com 5 ml de sulfato de cobre, após purga da tubagem e é seguida dos procedimentos de higienização.

4.2. LEVEDURA DE SEMENTEIRA

A amostragem de levedura em stockagem é recolhida cerca de 2 horas após a levedura ter sido conduzida para o tanque de stockagem e ter sido sujeita a agitação.

À semelhança dos processos de recolha anteriores é inicialmente efectuada uma purga de tubagem e de seguida procede-se à recolha da amostra em frasco de vidro. Por último efectua-se então a higienização da torneira de recolha, com água destilada e álcool.

A contagem de células de levedura deve ser feita com a maior brevidade possível, uma vez que a amostra se altera com o tempo e, neste caso, não é adicionado o inibidor de crescimento de levedura.

IMPORTANTE: Recolher também uma amostra da levedura em stockagem para a determinação da viabilidade da levedura. Esta amostra deve ser colhida dentro do horário do laboratório, para que a amostra não se deteriore com o tempo e o resultado da percentagem de células mortas seja viável.

5. TÉCNICA

5.1. PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO DE LEVEDURA/SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

5.1.1. MOSTO SEMEADO (amostra retirada nos tanques de fermentação e propagação):

5.1.1.1. Recolher a amostra num frasco de plástico com 5 ml de sulfato de cobre, o volume final no frasco deve ser de 100 ml;

5.1.1.2. Homogeneizar e desgaseificar a amostra;

- 5.1.1.3. Pipetar 5 ml (com pipeta ou micropipeta de 5 ml) da amostra bem homogeneizada para um balão de 50 ml e perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;
- 5.1.1.4. Pipetar 1 ml (com pipeta ou micropipeta de 1 ml) da diluição anterior bem homogeneizada para um balão de 50 ml e perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;
- 5.1.1.5. Colocar a diluição anterior no copo de leitura do Sysmex;
- 5.1.1.6. Efectuar a leitura três vezes.

5.1.2. LEVEDURA DE SEMENTEIRA (amostra retirada nos tanques de stockagem):

- 5.1.2.1. Recolher a amostra em frasco de vidro;
- 5.1.2.2. Com a ajuda de uma colher homogeneizar a amostra;
- 5.1.2.3. Colocar um copo de vidro (100 ml) na balança e tarar, pesar 1.00 g de levedura, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur ou de uma colher (conforme a consistência da levedura);
- 5.1.2.4. Adicionar CELLPACK e 2 gotas de ácido sulfúrico 0,05 M, agitar e passar para um balão de 100 ml, perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;
- 5.1.2.5. Pipetar 5 ml (com pipeta de 5 ml) da suspensão bem homogeneizada para um balão de 50 ml e perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;
- 5.1.2.6. Pipetar 1 ml (com pipeta de 1 ml) da diluição anterior bem homogeneizada para um balão de 50 ml e perfazer o volume com CELLPACK e homogeneizar;

- 5.1.2.7. Colocar a diluição anterior no copo de leitura do Sysmex;
- 5.1.2.8. Efectuar a leitura três vezes.

5.2. EXECUÇÃO DA LEITURA NO SYSMEX

⇒ Ver legenda da Figura 2 na última página desta instrução de trabalho.

⇒ Antes de efectuar qualquer tipo de procedimento no equipamento verificar se na zona de leitura se encontra um copo de leitura Sysmex com CELLPACK, de forma a garantir que o transdutor e o eléctrodo externo se encontram imersos no electrólito.

5.2.1. LIGAR O EQUIPAMENTO E DESACTIVAÇÃO DE HGB

Ao ligar o equipamento no interruptor ON, este procede imediatamente a uma auto-lavagem, removendo das linhas hidráulicas ar e fluidos, ficando estas limpas. Enquanto decorre o ciclo de auto-lavagem aparece no visor a mensagem AUTOFILL. Após terminada esta operação, surge no visor a mensagem READY.

Com a desactivação de HGB, o aparelho efectuará só a análise WBC em vez das duas análises.

- 5.2.1.1. Pressionar as teclas CLEAR, ↑, ↓, ENTER;
- 5.2.1.2. Pressionar a tecla SELECT;
- 5.2.1.3. Pressionar a tecla ↓ para escolher o submenu 4.SETTINGS.

Em seguida pressionar a tecla ENTER;

5.2.1.4. Pressionar a tecla ↓ para escolher o submenu 5.WBC, HGB ON/OFF e pressionar a tecla ENTER. O equipamento imprime a lista dos settings:

****WBC, HGB ON/OFF****

0 WBC, HGB ON

1 HGB OFF

2 WBC OFF

5.2.1.5. Seleccionar 1 HGB OFF com as setas (↑, ↓). Pressionar a tecla ENTER para validar a opção. O equipamento volta novamente ao modo READY.

5.2.2. SELECÇÃO DO TIPO DE AMOSTRA A ANALISAR

O Sysmex apresenta dois métodos de análise, isto é, dois tipos distintos de calibração em memória. Consoante o tipo de levedura que se pretende analisar é necessário proceder à selecção da calibração referente ao tipo de levedura que vai ser analisada.

Quando a amostra é proveniente de uma SuperBock (SB) ou Cristal (CR), então a levedura é do tipo US, e a calibração que lhe corresponde é a M1. No caso de amostras originárias de Carlsberg (CB), ou seja, levedura do tipo CB, então a calibração correspondente é M2. Esquematisando:

M1 ⇒ amostra SB / CR

M2 ⇒ amostra CB

5.2.3. ENSAIO BRANCO

O ensaio branco é efectuado colocando um copo com CELLPACK na zona de leitura e pressionando a tecla de contagem correspondente à memória seleccionada. Este procedimento é efectuado com o intuito de verificar se a contagem resultante é nula.

5.2.3.1. Colocar um copo de leitura Sysmex com CELLPACK (± meio copo) na zona de leitura.

5.2.3.2. Pressionar as teclas WBC COUNT, se a memória seleccionada for M1, ou RBC COUNT, se a memória seleccionada for M2. No visor aparece a mensagem WBC COUNTING ou RBC COUNTING, respectivamente.

5.2.3.3. Verificar se a contagem é de $0.0 \times 10^3 / \mu\text{l}$, no caso da memória M1, e $0.0 \times 10^6 / \mu\text{l}$, para a memória M2.

5.2.3.4. Efectuar os passos 5.2.3.1. a 5.2.3.2. até obter os resultados desejados.

5.2.4. EXECUÇÃO DA LEITURA NO SYSMEX

É a execução da leitura no Sysmex que nos fornece os resultados para chegar ao valor do número de células de levedura.

5.2.4.1. Agitar a solução de diluição da amostra de levedura, preparada anteriormente, antes de colocar um pouco desta no copo de leitura Sysmex;

5.2.4.2. Colocar a solução de diluição num copo de leitura Sysmex (± meio copo);

5.2.4.3. Colocar o copo de leitura Sysmex na zona de leitura do equipamento. Pressionar as teclas WBC COUNT ou RBC COUNT, mediante a calibração seleccionada. Durante a execução da leitura aparece a seguinte mensagem no visor WBC COUNTING ou RBC COUNTING, respectivamente. Após efectuada a leitura, o resultado é impresso.

ATENÇÃO: Não colocar as mãos nem a face perto do local de leitura durante a análise, pois pode causar “ruído” provocando contagens elevadas.

5.2.4.4. As leituras seguintes são obtidas pressionando a tecla REPEAT.

5.2.4.5. Retirar o copo de leitura Sysmex com a amostra que foi analisada e colocar no mesmo local um copo de leitura Sysmex com CELLPACK.

5.2.4.6. Efectuar todos os passos do ponto 5.2.3.

5.2.5. ENCERRAR

No final do dia e antes de encerrar o equipamento na tecla ON/OFF é necessário efectuar um SHUTDOWN do Sysmex. De uma forma geral, esta operação introduz detergente (MANORESH) no transdutor e linhas hidráulicas, efectuando assim a limpeza diária do equipamento.

5.2.5.1. Colocar um copo com CELLPACK (\pm meio copo) na zona de leitura;

5.2.5.2. Consoante a memória seleccionada, pressionar a tecla WBC COUNT ou RBC COUNT. Verificar se a contagem é de $0.0 \times 10^3 / \mu\text{l}$ ou $0.0 \times 10^6 / \mu\text{l}$, respectivamente;

5.2.5.3. Pressionar a tecla SHUTDOWN. Aparece no visor a seguinte mensagem:

SHUTDOWN

YES ENTER

5.2.5.4. Pressionar a tecla ENTER. No visor aparece a mensagem SHUTDOWN;

5.2.5.5. Quando surge no visor a mensagem *TURN POWER OFF*, o equipamento está pronto a ser desligado. Desligar na tecla ON/OFF.

5.3. CÁLCULOS

Os resultados que são impressos aquando da execução da análise são, nesta fase, utilizados para proceder à determinação do número de células de levedura em determinada amostra.

De referir que existem determinados factores de correcção a aplicar para obter o número de células de levedura numa amostra.

- ↗ No caso da levedura em fermentação ou em propagação é necessário aplicar um factor de correcção devido à adição de sulfato de cobre à amostra. Este factor toma o valor de 1,05.
- ↗ Quando a amostra é proveniente de uma levedura Carlsberg, é necessário multiplicar o resultado do número de células, quer no caso do mosto semeado quer no caso da levedura de sementeira, por 10.

- ↪ Por último, amostras provenientes de levedura de sementeira são multiplicadas por um factor de correcção que toma o valor de 100.
- ↪ Os factores correctivos 10 e 100 são aplicados para a conversão dos resultados obtidos no Sysmex para as unidades adequadas dos diferentes tipos de leveduras.
- ↪ Outros factores de correcção são aplicados quando se trata de levedura em propagação, que são explicados em mais detalhe no ponto 6.3.2.

5.3.1. MOSTO SEMEADO – LEVEDURA EM FERMENTAÇÃO

- 5.3.1.1. Efectuar o cálculo da média das 3 contagens. Utilizar o resultado arredondado até à casa das décimas no caso de uma amostra SB ou CR, ou arredondado às centésimas no caso de uma amostra CB, nas equações de cálculo seguintes.
- 5.3.1.2. No caso de uma **amostra SB/CR**, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

$$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{ml} \right]$$

- 5.3.1.3. No caso de uma **amostra CB**, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

$$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05 \times 10$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{ml} \right]$$

5.3.2. MOSTO SEMEADO – LEVEDURA EM PROPAGAÇÃO

- 5.3.2.1. Efectuar o cálculo da média das 3 contagens. Utilizar o resultado arredondado até à casa das décimas no caso de uma amostra SB ou CR, ou arredondado às centésimas no caso de uma amostra CB, nas equações de cálculo seguintes.
- 5.3.2.2. No caso de uma **amostra SB/CR na Fase 1**⁹, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

$$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05 \times \frac{900}{15}$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{ml} \right]$$

- 5.3.2.3. No caso de uma **amostra SB/CR nas Fases seguintes (2, 3, 4, ...)**¹⁰, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

$$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{ml} \right]$$

- 5.3.2.4. No caso de uma **amostra CB na Fase 1**, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

⁹ A amostra de levedura US (SB ou CR) correspondente à Fase 1 é a amostra recolhida 1h após a inoculação da levedura no propagador de menor volume.

¹⁰ A amostra de levedura US (SB ou CR) correspondente às Fases 2, 3, 4, ... são as amostras recolhidas posteriormente à amostra correspondente à Fase 1. Concretizando, correspondem às amostras recolhidas antes da passagem da levedura do propagador de menor volume para o propagador de maior volume e assim sucessivamente.

$$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05 \times \frac{900}{15} \times 10$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{ml} \right]$$

5.3.2.5. No caso de uma **amostra CB nas Fases seguintes (2, 3, 4, ...)**, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

$$n \text{ células} = \text{média} \times 1,05 \times 10$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{ml} \right]$$

5.3.3. LEVEDURA DE SEMEITEIRA

5.3.3.1. Efectuar o cálculo da média das 3 contagens. Utilizar o resultado arredondado até à casa das décimas no caso de uma amostra SB ou CR, ou arredondado às centésimas no caso de uma amostra CB, nas equações de cálculo seguintes.

5.3.3.2. No caso de uma **amostra SB/CR**, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

$$n \text{ células} = \text{média} \times 100$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{g} \right]$$

5.3.3.3. No caso de uma **amostra CB**, a equação de cálculo a utilizar é a seguinte:

$$n \text{ células} = \text{média} \times 100 \times 10$$

$$\text{unidades} = \left[\frac{10^6}{g} \right]$$

6. POSSÍVEIS PROBLEMAS/SOLUÇÕES

Problema 1: Ao ligar o equipamento soa o alarme.

Solução:

1. Pressionar a tecla CLEAR para parar o alarme;
2. Desligar o aparelho na tecla ON/OFF;
3. Ligar novamente o equipamento.

Problema 2: Aparece no visor a seguinte mensagem de erro *PRINTER PAPER ERROR*, o que significa que o papel de impressão está no fim.

Solução:

1. Pressionar a tecla CLEAR para parar o alarme;
2. Substituir o papel de impressão.

Problema 3: Aparece na folha onde os resultados são impressos a seguinte mensagem de erro *WASTE FULL*. O recipiente onde se armazenam os esgotos do equipamento necessita de ser despejado.

Solução:

1. Pressionar a tecla CLEAR para parar o alarme;
2. Retirar a ligação (tampa) do recipiente e remover os esgotos;
3. Repor a ligação do recipiente ao equipamento (tampa);
4. Efectuar um SHUTDOWN do equipamento (ver 6.2.6. Encerrar);
5. Voltar a ligar o equipamento;
6. Efectuar uma leitura com CELLPACK e verificar se o resultado é nulo. Caso contrário, repetir os passos 4., 5. e 6., até obter os resultados desejados.

Problema 4: Aparece na folha onde os resultados são impressos a seguinte mensagem de erro *CLOG ERROR*. Tal mensagem indica-nos que o orifício (opérculo) do transdutor se encontra entupido.

Solução:

1. Pressionar a tecla CLEAR para parar o alarme;
2. Pressionar a tecla FLUSH 3 a 4 vezes;
3. Colocar um copo com CELLPACK na zona de leitura e pressionar a tecla FILL;
4. Efectuar uma leitura com CELLPACK e verificar se o resultado é nulo. Se o problema estiver resolvido não voltará a aparecer a mensagem de erro;
5. No caso de o problema não se encontrar resolvido, retirar o copo de leitura Sysmex com CELLPACK e com a ajuda do pincel de limpeza, molhado em CELLPACK, efectuar movimentos rotativos no orifício do transdutor;
6. Efectuar novamente os passos 2., 3. e 4..
7. No final da operação, limpar o pincel de limpeza com água destilada.

Problema 5: Aparece na folha onde os resultados são impressos a seguinte mensagem de erro *PLATEAU ERROR*. Este erro é devido ao facto do equipamento não conseguir detectar a fronteira entre o ruído e as células de levedura na curva cumulativa de distribuição de tamanhos de células.

Solução:

1. Pressionar a tecla CLEAR para parar o alarme;
2. Retirar o copo de leitura Sysmex com a suspensão de levedura;

3. Colocar um copo com CELLPACK e efectuar nova contagem. Verificar se o valor é zero.
4. Preparar novas soluções de diluição (ver 6.1. Preparação da Suspensão de Levedura/Soluções Diluídas para Análise);
5. Efectuar nova contagem.

Problema 6: Aparece na saída de resultados a seguinte mensagem de erro *WBC TEMP LOW*. A temperatura da amostra é menor ou igual a 18°C.

Solução:

1. Pressionar a tecla CLEAR para parar o alarme;
2. Ajustar a temperatura ambiente para o intervalo de 20 a 30°C;
3. Reanalisar a amostra.

Problema 7: Após a leitura da amostra, a leitura com CELLPACK não é zero.

Solução:

1. Efectuar 2 a 3 contagens com apenas CELLPACK no copo de leitura Sysmex;
2. Se os resultados não forem nulos, proceder como no caso do Problema 4.

7. TECLAS DO SYSMEX



Figura 2 - Sysmex.

LEGENDA DA FIGURA 2

- | | | |
|--------------------|------------------------|-------------------------|
| 1. Visor | 7. Tecla SHUTDOWN | 13. Tecla FEED |
| 2. Tecla REPEAT | 8. Tecla SELECT | 14. Zona de leitura |
| 3. Tecla WBC COUNT | 9. Tecla CLEAR | 15. Regular contraste |
| 4. Tecla RBC COUNT | 10. Tecla ENTER | 16. ON/OFF |
| 5. Tecla FLUSH | 11. Setas direccionais | 17. Saída de resultados |
| 6. Tecla FILL | 12. Tecla PRINT | 18. Botão SECRETO |

8. BIBLIOGRAFIA

[1] Sysmex Corporation. (1994). *OPERATOR'S MANUAL Semi-Automated Microcell Counter F-520*, Kobe, Japan.

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA

UNICER CERVEJAS, S.A.
CENTRO DE PRODUÇÃO DE CERVEJA DE SANTARÉM

UNICER

CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA POR SYSMEX



SARA RODRIGUES

2011

ÍNDICE

1. OBJECTIVOS
2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO
3. SYSMEX
4. MÉTODO DE ANÁLISE
5. ERROS EXPERIMENTAIS



1. OBJECTIVOS

FORMAÇÃO TEÓRICA



1. OBJECTIVOS

FORMAÇÃO TEÓRICO-PRÁTICA E FORMAÇÃO PRÁTICA

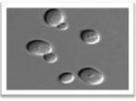


2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. LEVEDURA CERVEJEIRA

O QUE É?

- Microrganismo unicelular;
- Pertence ao reino Fungi;
- A levedura cervejeira pertence ao género *Saccharomyces* onde se incluem também as leveduras de vinificação e panificação



PROCESSOS METABÓLICOS

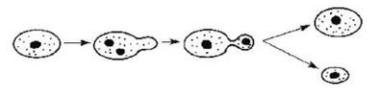
- Metabolismo aeróbio: na presença de O₂ e em meios ricos em açúcares apresentam uma taxa de crescimento elevada;
- Metabolismo anaeróbio: na ausência de O₂ ocorre uma diminuição na taxa de crescimento e os principais produtos deste metabolismo são o etanol e o CO₂ - PROCESSO DE FERMENTAÇÃO ALCÓOLICA.

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. LEVEDURA CERVEJEIRA

REPRODUÇÃO DA LEVEDURA

- As células da levedura reproduzem-se por gemulação, ou seja, parte da célula separa-se e dá origem a duas células geneticamente iguais



2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

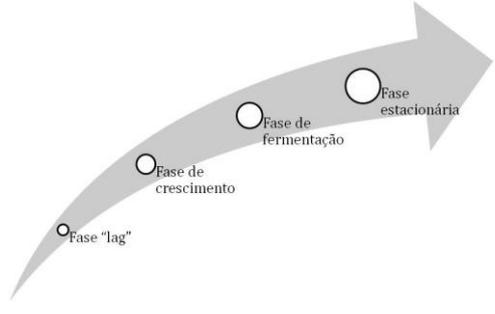
2.1. LEVEDURA CERVEJEIRA

Tabela 1 - Características dos diferentes tipos de levedura utilizadas na indústria cervejeira.

Tipos de levedura utilizada na indústria cervejeira	
Levedura tipo "ale"	Maior rentabilidade fermentativa a temperaturas mais elevadas (18 a 24 °C);
"top fermenting" <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Ascendem ao topo dos fermentadores quando floculam no final da fermentação (membrana com características hidrofóbicas).
Leveduras do tipo "lager"	Maior rentabilidade fermentativa a temperaturas mais baixas (8 a 14 °C);
"bottom fermenting" <i>Saccharomyces uvarum</i> <i>Saccharomyces carlsbergensis</i>	Sedimentam e assentam no fundo dos fermentadores no final da fermentação (membrana com características hidrofílicas).

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO

2.1. LEVEDURA CERVEJEIRA – CICLO DE FERMENTAÇÃO



2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO



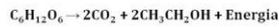
2.1. LEVEDURA CERVEJEIRA – CICLO DE FERMENTAÇÃO

- Fase "lag" ou de respiração – fase de adaptação da levedura ao meio.

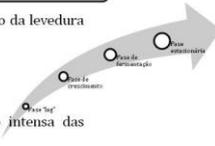


- Fase de crescimento – fase de multiplicação intensa das leveduras.

- Fase de fermentação – fase anaeróbia em que os açúcares são oxidados a etanol e CO₂ e outros produtos secundários.



- Fase estacionária – fase de sedimentação da levedura e redução drástica do seu metabolismo.

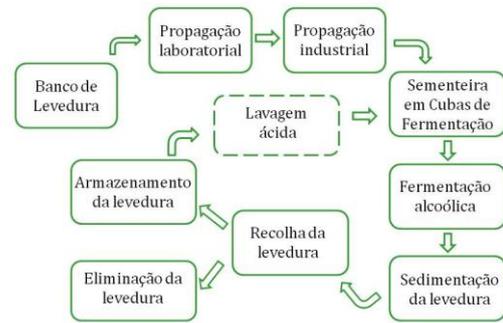


9

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO



2.2. CICLO DA LEVEDURA NO PROCESSO CERVEJEIRO

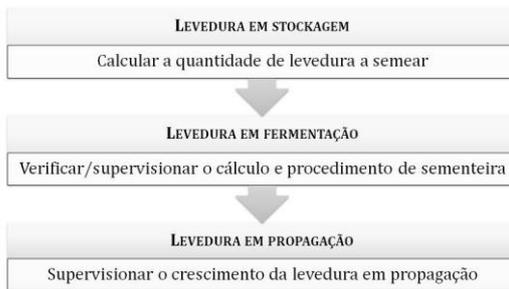


10

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO



2.3. IMPORTÂNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS NO PROCESSO



11

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO



2.3. IMPORTÂNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS NO PROCESSO

Contagem de células permite:

Bom desempenho da fermentação

Produto final de qualidade e boas características organolépticas

Aumento da produtividade do processo

12

2. ENQUADRAMENTO TEÓRICO



2.3. IMPORTÂNCIA DA CONTAGEM DE CÉLULAS NO PROCESSO

Contagem de células evita problemas como:

Fermentações rápidas

- Baixa viabilidade da levedura
- Perda de amargura
- Dificuldades durante a filtração
- Aumento do risco de autólise

Fermentações lentas

Consequências económicas negativas no processo

13

3. SYSMEX



3.1. EQUIPAMENTO

O QUE É?

Equipamento que efectua a contagem de células de levedura



14

3. SYSMEX



3.1. EQUIPAMENTO

ELEMENTOS DE MEDIÇÃO

- Eléctrodos** - Interno e externo
- Transdutor** - Orifício (opérculo)
- Electrólito** - Fluxo de corrente constante entre os eléctrodos



15

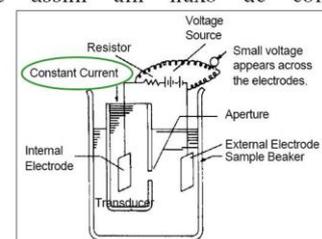
3. SYSMEX



3.2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

- Antes da análise:

Dois eléctrodos mergulhados no electrólito, mantendo-se assim um fluxo de corrente constante.



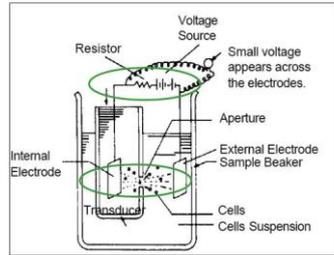
16

3. SYSMEX



3.2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

- Durante a análise: A suspensão de levedura é sugada; Quando uma célula passa pelo opérculo ocorre uma alteração na resistência entre os dois eléctrodos.



17

3. SYSMEX



3.2. PRINCÍPIO DE FUNCIONAMENTO

Segundo a Lei de Ohm:

- ↑ Resistência (R) ↑ Tensão (V)

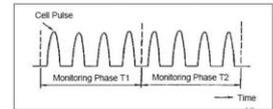
$$R = \frac{V}{I}$$

Lei de Ohm

Alterações na tensão amplificadas como pulsos eléctricos;

O número de pulsos eléctricos obtidos durante a contagem corresponde ao número de células contadas;

Quanto maior a intensidade do pulso eléctrico maior o volume da célula.

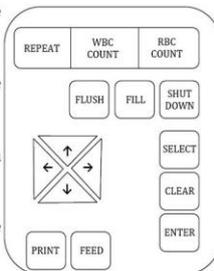


3. SYSMEX



3.3. TECLAS SYSMEX

- **WBC COUNT** - Inicia a análise de uma amostra de SB ou CR.
- **RBC COUNT** - Iniciar a análise de uma amostra de CB.
- **REPEAT** - Efectua a repetição da análise.
- **SHUTDOWN** - Introduce detergente no transdutor e linhas hidráulicas.



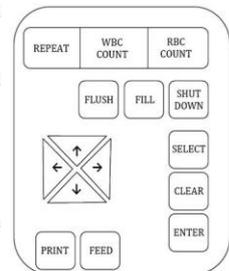
19

3. SYSMEX



3.3. TECLAS SYSMEX

- **FILL** - Enche o transdutor com electrolito.
- **FLUSH** - Aplica contra pressão para remover entupimentos do opérculo.
- **SELECT** - Exibe o menu.
- **CLEAR** - Parar alarmes.
- **ENTER** - Executar o programa seleccionado no menu.

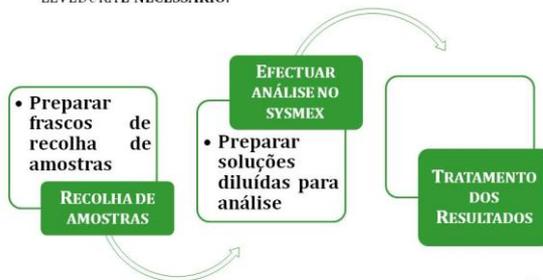


20

4. MÉTODO DE ANÁLISE



- PARA QUE SEJA POSSÍVEL EFECTUAR A CONTAGEM DE CÉLULAS DE LEVEDURA É NECESSÁRIO:

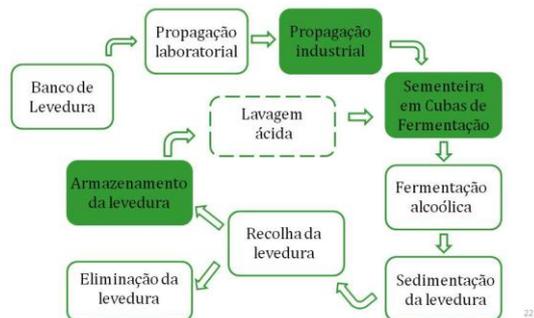


21

4. MÉTODO DE ANÁLISE



AMOSTRAGEM



22

4. MÉTODO DE ANÁLISE



AMOSTRAGEM

- **Levedura em fermentação/ Mosto semeado**
 - Cubas de fermentação
- **Levedura em stockagem/ Levedura de sementeira**
 - Tanques de stockagem
- **Levedura em propagação/ Mosto semeado**
 - Tanques de propagação
 - Cubas de fermentação

23

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.1. PREPARAÇÃO DOS FRASCOS DE RECOLHA DE AMOSTRAS

- Mosto Semeado



c/ 5ml de CuSO₄

- Levedura de Sementeira



24

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.2. RECOLHA DE AMOSTRAS

❑ Mosto semeado

- Tanques de fermentação
- Tanques de propagação

❑ Levedura de sementeira

- Tanques de stockagem

❑ Procedimentos de higienização

- Purga antes da recolha
- Após a recolha limpeza da torneira com água destilada e álcool



4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

• Mosto semeado



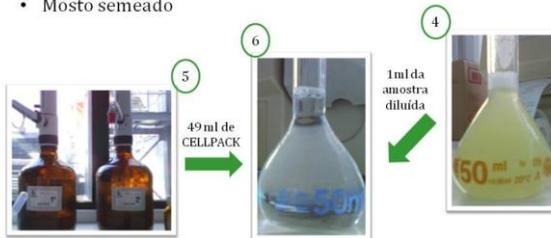
26

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

• Mosto semeado



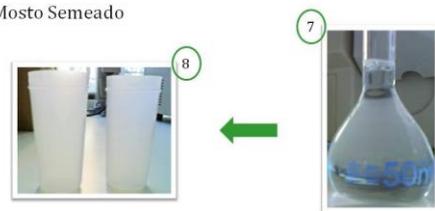
27

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

• Mosto Semeado



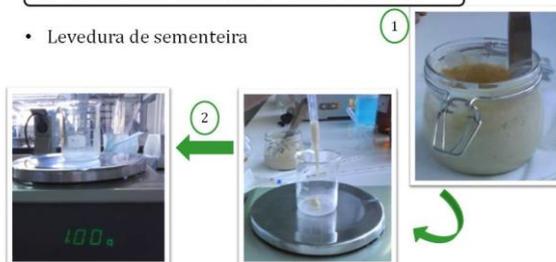
28

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

• Levedura de sementeira



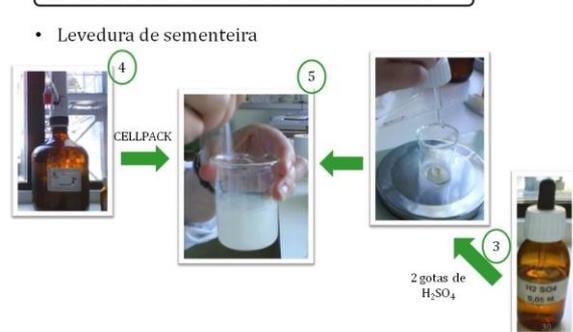
29

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

• Levedura de sementeira

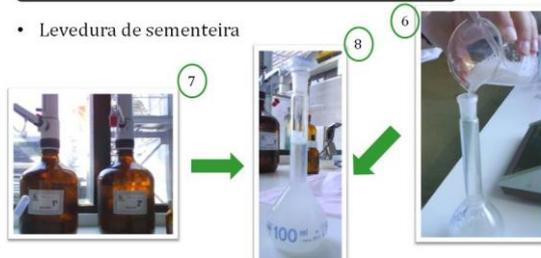


4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

• Levedura de sementeira



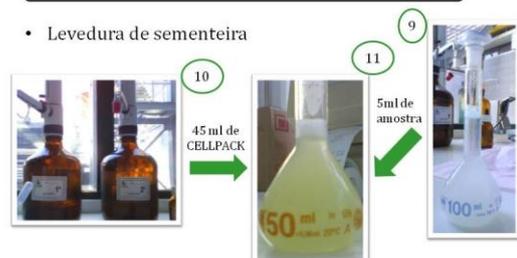
31

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

• Levedura de sementeira



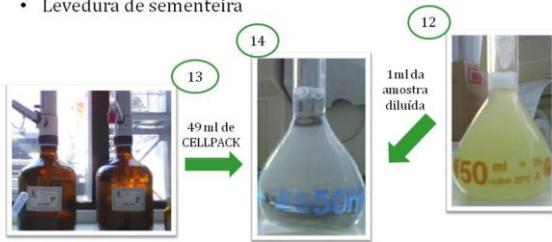
32

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

- Levedura de sementeira



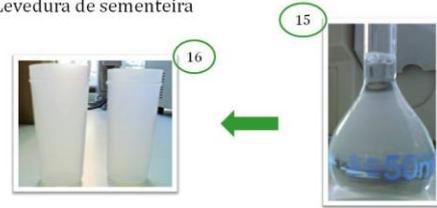
33

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DILUÍDAS PARA ANÁLISE

- Levedura de sementeira



34

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.4. EFECTUAR A LEITURA NO SYSMEX

- Levedura US (Super Bock ou Cristal)



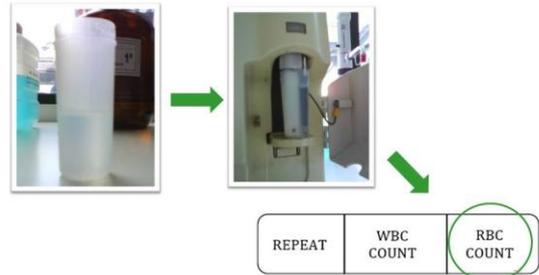
35

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.4. EFECTUAR A LEITURA NO SYSMEX

- Levedura CB (Carlsberg)



36

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

- MOSTO SEMEADO – LEVEDURA EM FERMENTAÇÃO

– SB/CR
 $n \text{ células } [10^6/\text{ml}] = \text{média} \times 1,05$

– CB
 $n \text{ células } [10^6/\text{ml}] = \text{média} \times 1,05 \times 10$



37

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

- LEVEDURA DE SEMEITEIRA – LEVEDURA EM STOCKAGEM

– SB/CR
 $n \text{ células } [10^6/\text{g}] = \text{média} \times 100$

– CB
 $n \text{ células } [10^6/\text{g}] = \text{média} \times 100 \times 10$



38

4. MÉTODO DE ANÁLISE



4.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

- MOSTO SEMEADO – LEVEDURA EM PROPAGAÇÃO

– SB/CR
 $n \text{ células } [10^6/\text{ml}] = \text{média} \times 1,05 \times 900/15$

$n \text{ células } [10^6/\text{ml}] = \text{média} \times 1,05$

– CB
 $n \text{ células } [10^6/\text{ml}] = \text{média} \times 1,05 \times 900/15 \times 10$

$n \text{ células } [10^6/\text{ml}] = \text{média} \times 1,05 \times 10$



39

5. ERROS EXPERIMENTAIS



Nenhuma análise é isenta de erros!

TIPOS DE ERROS

- Sistemáticos
 - Operacionais
 - Método
 - Instrumental e de reagentes
- Aleatórios



É necessário eliminar/reduzir os erros para diminuir a incerteza no resultado obtido.

40

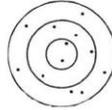
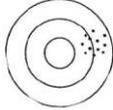
5. ERROS EXPERIMENTAIS



DISTINÇÃO ENTRE ERROS SISTEMÁTICOS E ALEATORIOS

Tabela 2 – Distinção entre os erros sistemáticos e aleatórios.

Erros Sistemáticos	Erros Aleatórios
Podem ser determinados	Não podem ser determinados devido à sua origem subjectiva
Ocorrem apenas num sentido (aparecendo um desvio sistemático do valor medido)	Podem ocorrer nos dois sentidos
Não detectáveis pela repetição da experiência	Detectáveis pela repetição da experiência
A sua eliminação pode ser feita introduzindo acções correctivas ou procedimentos padrão	Não podem ser eliminados, mas podem ser minimizados através da análise estatística



41

5. ERROS EXPERIMENTAIS



ERROS SISTEMÁTICOS

Operacionais

- Erros da responsabilidade do experimentalista, não estando relacionados com o método analítico utilizado.

Método

- Erros decorrentes do método analítico utilizado.

Instrumental e de reagentes

- Erros de calibração de instrumentos ou uso de reagentes impuros, relacionando-se desta forma com os instrumentos e/ou reagentes utilizados no processo analítico.

42

5. ERROS EXPERIMENTAIS



5.1. PREPARAÇÃO DOS FRASCOS DE RECOLHA DE AMOSTRAS – MOSTO SEMEADO



5. ERROS EXPERIMENTAIS



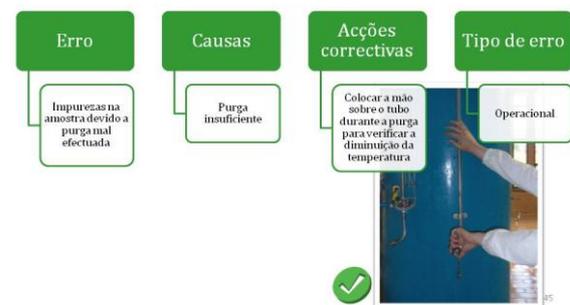
5.2. RECOLHA DE AMOSTRAS – MOSTO SEMEADO



5. ERROS EXPERIMENTAIS



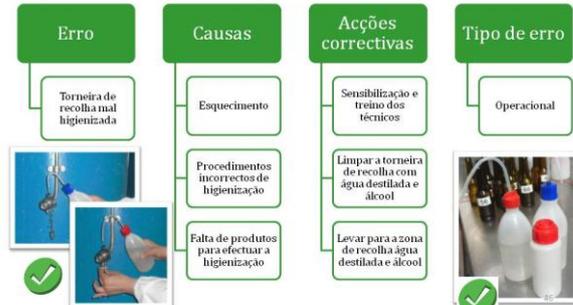
5.2. RECOLHA DE AMOSTRAS – MOSTO SEMEADO



5. ERROS EXPERIMENTAIS



5.2. RECOLHA DE AMOSTRAS



5. ERROS EXPERIMENTAIS



5.2. RECOLHA DE AMOSTRAS – MOSTO SEMEADO

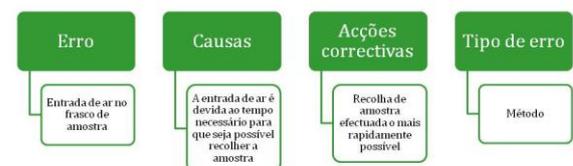


47

5. ERROS EXPERIMENTAIS



5.2. RECOLHA DE AMOSTRAS – LEVEDURA DE SEMENTEIRA



48

5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Material com humidade	Falta de material	Adquirir mais material	Instrumental e de reagentes



5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Material (balões volumétricos, pipetas, etc.) mal calibrado	Uso indevido do material	Uso do material exclusivo para a contagem de células	Instrumental e de reagentes
	Falta de cuidado durante o seu manuseamento	Sensibilização e treino dos técnicos para o uso cuidadoso do material	



5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Reagentes contaminados (CELLPACK, ácido sulfúrico e sulfato de cobre)	Expiração do prazo de validade	Verificação frequente das boas condições do CELLPACK (prazo de validade, leituras efectuadas no system)	Instrumental e de reagentes
	Preparação incorrecta de soluções (ácido sulfúrico e sulfato de cobre)	Preparação rigorosa das soluções de ácido sulfúrico e sulfato de cobre	

51

5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Fraca homogeneização da amostra	Falta de prática	Agitar a amostra de forma vigorosa e durante algum tempo, de acordo com a instrução de trabalho	Método

52

5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Pipetação incorrecta	Leitura incorrecta da escala da pipeta	Aquisição de micropipetas para a preparação das soluções de leitura	Operacional



53

5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Diluição incorrecta	Leitura incorrecta do menisco	Aquisição de frascos com um dispensador de líquidos dosado com a quantidade de electrólito necessária para as diluições	Operacional



54

5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Fraca homogeneização das soluções de leitura	Falta de prática	Agitar a amostra de forma vigorosa e durante algum tempo, de acordo com a instrução de trabalho	Método



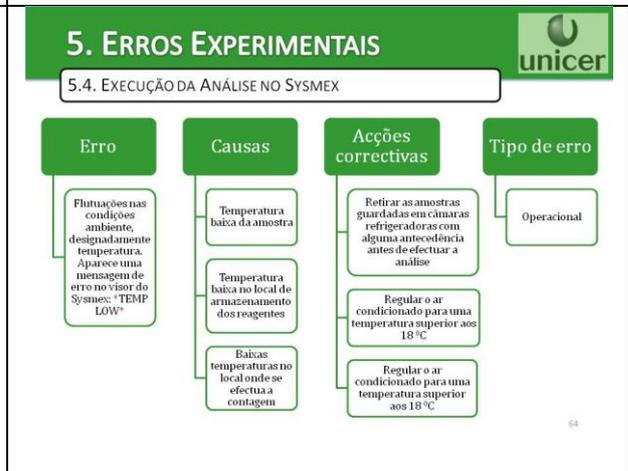
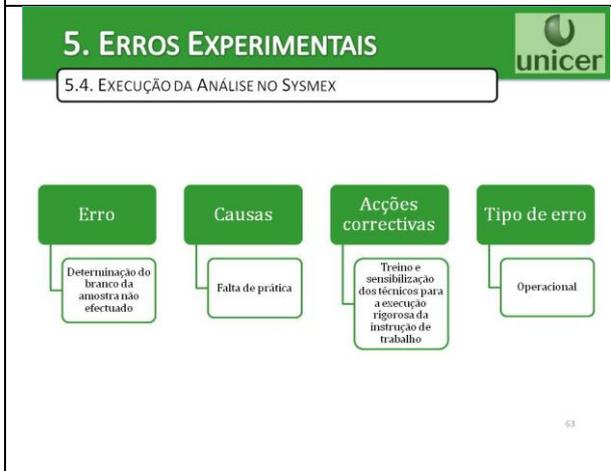
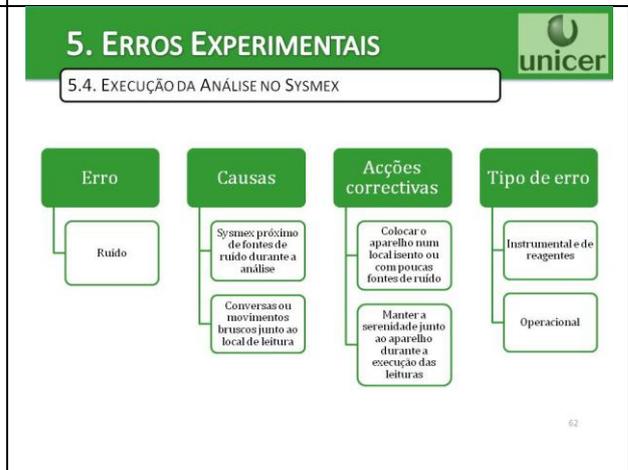
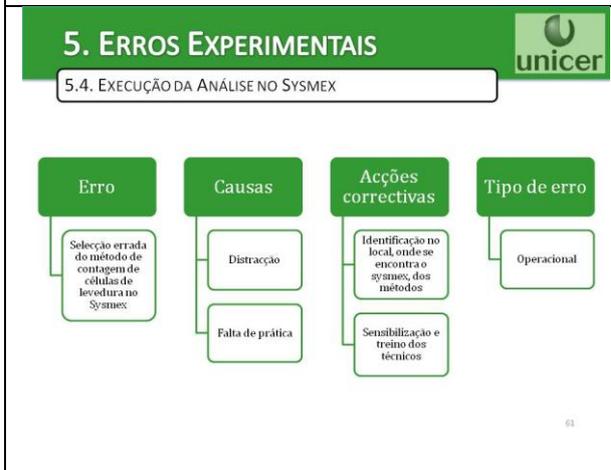
55

5. ERROS EXPERIMENTAIS 

5.3. PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DE LEITURA – LEVEDURA DE SEMEITEIRA

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Entrada de ar no frasco de amostra	Amostra em espera para que seja efectuada a análise	Análise imediata	Método

56



5. ERROS EXPERIMENTAIS unicer

5.4. EXECUÇÃO DA ANÁLISE NO SYSMEX

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Entupimento do opérculo, local por onde a amostra é sugada. Aparece uma mensagem de erro no visor do Sysmex: "CLOG ERROR"	Existência de resíduos no opérculo	Pressionar a tecla FLASH várias e efectuar de nova leitura; se o erro persistir, efectuar uma limpeza do opérculo com o pincel, efectuar nova leitura para verificar se o erro foi resolvido	Instrumental e de reagentes



65

5. ERROS EXPERIMENTAIS unicer

5.4. EXECUÇÃO DA ANÁLISE NO SYSMEX

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Fronteira entre o ruído e as células não detectada. Aparece uma mensagem de erro no visor do Sysmex: "PLATEAU ERROR"	Solução de leitura preparada incorrectamente Ruído	Efectuar nova preparação de soluções de leitura e efectuar nova análise Reactualizar a solução de leitura	Método Operacional

66

5. ERROS EXPERIMENTAIS unicer

5.4. EXECUÇÃO DA ANÁLISE NO SYSMEX

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Entrada de ar no equipamento	Durante o procedimento de despejo dos resíduos do equipamento ocorre a entrada de ar	Após o despejo efectuar leituras com CELLPACK até que o resultado obtido seja zero	Instrumental e de reagentes



67

5. ERROS EXPERIMENTAIS unicer

5.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Erro	Causas	Acções correctivas	Tipo de erro
Erros de arredondamento	Arredondamentos à casa das unidades ao longo dos diversos passos de cálculo	Criação de uma folha de resultados com a indicação dos cálculos e arredondamentos a efectuar	Operacional

68

5. ERROS EXPERIMENTAIS unicer

5.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS - EXEMPLOS

- Mosto semeado
 - RBC $1,68 \times 10^6 / \mu\text{l}$
 - Levedura CB
 - RBC $1,65 \times 10^6 / \mu\text{l}$
 - RBC $1,68 \times 10^6 / \mu\text{l}$

$$\frac{1,68 + 1,65 + 1,68}{3} = 1,67$$

$1,67 \times 1,05 \times 10 = 17,5 \Rightarrow 18$ ✓

$$\frac{1,68 + 1,65 + 1,68}{3} = 2$$

$2 \times 1,05 \times 10 = 21$ ✗

69

5. ERROS EXPERIMENTAIS unicer

5.5. TRATAMENTO DOS RESULTADOS - EXEMPLOS

- Levedura de sementeira
 - WBC $20,3 \times 10^3 / \mu\text{l}$
 - Levedura US
 - WBC $20,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$
 - WBC $20,6 \times 10^3 / \mu\text{l}$

$$\frac{20,3 + 20,2 + 20,6}{3} = 20,4$$

$20,4 \times 100 = 2040$ ✓

$$\frac{20,3 + 20,2 + 20,6}{3} = 20$$

$20 \times 100 = 2000$ ✗

70

5. ERROS EXPERIMENTAIS unicer

OBRIGADO PELA ATENÇÃO!

71