

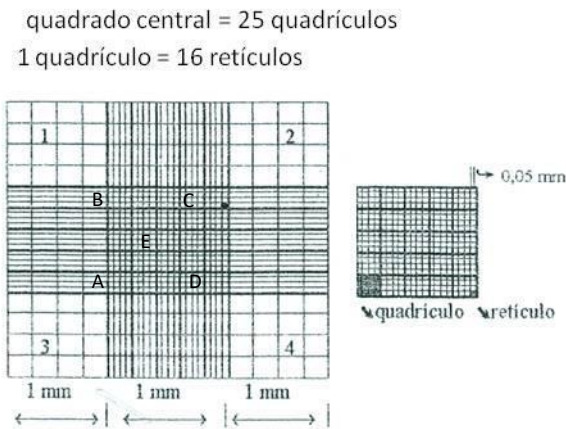
CONTINUAÇÃO: MÉTODOS DE QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS

1- INTRODUÇÃO

1.2 - CONTAGEM DIRETA DE CÉLULAS DE LEVEDURAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

Trata-se de um método utilizado na quantificação direta de amostras líquidas. Uma alíquota de suspensão de células é adicionada no espaço entre a câmara de Neubauer e a lamínula que a recobre. A câmara é retangular, sendo atravessada por dois sulcos que delimitam 3 plataformas (Figura 1). Na plataforma central encontra-se uma área reticulada, exatamente 0,1 mm mais baixa que as duas laterais. A lamínula se adapta perfeitamente sobre as duas plataformas laterais, deixando um espaço de 0,1mm de profundidade entre ela e a plataforma central. A área reticulada mede 3mm X 3mm, ou seja, 9 mm². O quadrado central é dividido em 25 quadrículos, novamente dividido em 16 retículos. Portanto o quadrado central contém 400 retículos.

Figura 1: Esquema representando a câmara de Neubauer, seguida de informações sobre suas dimensões



Profundidade: 0,1mm

Área do retículo: $1/400 = 0,025\text{mm}^2$

Volume do retículo: $0,025\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm} = 0,00025\text{mm}^3$

Volume do quadrículo: $16 \times 0,00025\text{mm}^3 = 0,004 \text{mm}^3$

Após contagem no microscópio do número de células, aplica-se o cálculo descrito a seguir para o número total de células na amostra.

1- Contagem pelos quadrados 1, 2, 3 e 4.

Nº de células /mL = $n \times 10^4 / 4$;

n = número de células nos quadrados 1, 2, 3 e 4.

2- Contagem pelos quadrículos A, B, C, D e E

Nº de células /mL = $n \times 5 \times 10^4$;

n = número de células nos quadrículos A, B, C, D e E.

2- OBJETIVOS:

Montar curva padrão Abs X Concentração (mg/mL) para quantificação de células de leveduras utilizando o método de turbidimetria.

Realizar a quantificação de células de leveduras pelo método de contagem direta em câmara.

3-PROCEDIMENTO

Será entregue tubo com suspensão de células de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*), balão volumétrico e 4 tubos para a realização das diluições.

3.1- RELAÇÃO DO PESO SECO E TURBIDIMETRIA

1. Pesar cada cadinho com a amostra. Determinar o peso seco em 10mL de amostra de células de *Saccharomyces cerevisie*.
2. Preparar uma diluição 1:10 da suspensão de células de *Saccharomyces cerevisie* em balão volumétrico.
3. Em seguida, retire alíquotas de 1mL, 2mL,3mL,4mL da primeira diluição em balão. Completar cada tubo com água para o volume final de 5mL.
4. Fazer a leitura da Densidade Óptica (D.O) do branco seguido por cada uma das diluições.
5. Traçar a curva correspondente entre o peso de células e turvação (Abs X mg/mL), determinado a equação da reta e o valor de R^2

3.2- CONTAGEM DIRETA DE CÉLULAS DE LEVEDURAS EM CÂMARA DE NEUBAUER

1. Colocar a lamínula sobre a área marcada na câmara de contagem
2. Homogeneizar a suspensão de células com concentração desconhecida e retirar uma alíquota de 0,1 mL com a pipeta.
3. Encostando a ponta da pipeta na borda da lamínula, preencher cuidadosamente a câmara de contagem. O líquido deve preencher apenas um lado da câmara.
4. Colocar a câmara no microscópio e ajustar o aumento para 400X.
5. Contar as células nas 4 áreas de um lado da câmara de contagem. Dividir o valor por 4 para obter a média dos quadrados. Ou contar pelos quadrículos A, B, C, D e E e multiplicar por 5.
6. Critérios para a contagem: contar células isoladas; contar grumos constituídos por células facilmente distinguíveis contando cada célula; grumos, cujas células são difíceis de serem distinguidas umas das outras, devem ser contados como um único grupo.