



INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA

Técnico em Biotecnologia

Módulo IV

Cultivo de Células Animais

Aula 3 – Esterilização de materiais para a
Cultura de Células

Prof. Leandro Parussolo



Trabalhar com cultura de células



Ambiente Estéril



Cells cultivadas em meios ricos em nutrientes → **micro-organismos contaminantes**



Agentes físicos comumente utilizados:

- Aquecimento por autoclavação;
- Radiação Ultravioleta;
- Radiação Ionizante
- Filtração



Aplicação de Calor para Esterilização

Calor – muito utilizado para esterilização de materiais (condições úmida ou secas);

Calor úmido:

→ Desnaturação e coagulação das proteínas vitais;

Calor seco:

→ Oxidação dos constituintes orgânicos das cells.



Calor úmido (mais eficiente)

→ desnaturação de proteínas exige temperaturas e tempos de exposição menores;

→ Propagação calor em ambiente úmido – mais rápido.

Ex: endosporos de *Bacillus anthracis*
destruídos 2 – 15 min à 100°C (c. úmido)
180 min à 140°C (c. seco)



Calor seco

– materiais impermeáveis ou danificáveis pela umidade (óleos, vidrarias, metais, etc).



AUTOCLAVE

→ 121°C – 15 min;

RADIAÇÃO/ IRRADIAÇÃO

→ Aplicação de energia radiante;

→ Processo empregado na esterilização de materiais para cultivo de cells;

→ Chamada esterilização a frio.



Radiação Ionizante

- Incluem raios gama e raios X
- Radiações causam ionização das moléculas em átomos ou grupos de átomos;
- Raios podem penetrar através de materiais empacotados e esterilizam seu interior;
- método muito empregado em cultura de cell



Radiação Gama

- Forma mais barata de radiação;
- Apresenta alto poder de penetração;
- Inicialmente, foi utilizada para esterilização de materiais sensíveis ao calor;
- Atualmente é aplicada sobre algumas reações animais e alguns alimentos (deterioração);
- Grande qtde de material pode ser descontaminado por esse processo.



Radiação UV

- Forma efetiva de esterilizar ou reduzir flora microbiana em quase todas as substâncias;

- atinge DNA bacteriano;

- Útil para desinfecção de superfícies (pequeno poder de penetração)

Ex: salas com lâmpadas germicidas
câmaras de fluxo laminar

- Cuidados: agressivo ao olho e pele



Álcool

- Etanol – mais aceito para desinfecção em ambientes de cultivo de cells;
- Desnaturação das proteínas (rapidamente na presença de água);
- Etanol absoluto menos ativo que 70%.



Ação germicida de várias concentrações de etanol em solução aquosa *Streptococcus pyogenes*

Concentração de Etanol	Tempo (segundos)				
	10	20	30	40	50
100	-	-	-	-	-
95	-	-	+	+	+
90	-	+	+	+	+
80	+	+	+	+	+
70	+	+	+	+	+
50	-	-	+	+	+
40	-	-	-	-	-



Filtração

- Descontaminação ar ambiente (fluxo laminar)
- Esterilização de líquidos com componentes termossensíveis;
- Não há morte de micro-organismos;
- Processo consiste na passagem de líquido ou gás por material com pequenos poros.



INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA





Câmara de fluxo laminar

- Principal equipamento para manutenção da esterilidade e contenção de agentes infecciosos
- Permite a remoção de partículas do ar na área de trabalho
- Permite a proteção da contaminação cruzada
- Proteção do experimento e não do manipulador



INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA





INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA

Como utilizar a Câmara de fluxo laminar??



- 1- Câmara deve ser instalada em área livre de corrente de ar e contaminação excessiva;
- 2- Deve ser limpa com álcool 70% antes e após a utilização;
- 3- Luz UV deve ficar ligada 20-30 min;
- 4- Todos frascos de soluções e materiais que entrarão na câmara devem ser higienizados com álcool 70%
- 5- Descartes devem ser mantidos dentro da câmara durante o trabalho



- 6- Nunca abrir o visor frontal durante o uso;
- 7- Reduzir o n. de materiais dentro da câmara durante o procedimento;
- 8- Evitar o uso do bico de bunsen aceso dentro da câmara (ar quente danifica filtros);
- 9- Trânsito atrás do operador deve ser evitado;
- 10- Fluxo deve continuar em funcionamento por pelo menos 5 min após o término do procedimento.



INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA

Técnico em Biotecnologia

Módulo IV

Cultivo de Células Animais

Aula 4 – Contagem de células

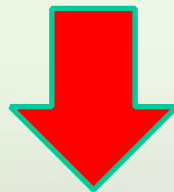
Prof. Leandro Parussolo



Introdução:

-Contagem de cells geralmente é realizada antes de sua utilização em experimentos;

- **Câmara de Neubauer** → instrumento utilizado para tal fim;



Método mais simples, barato para contagem de células



INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA





Preparação das cells em suspensão:

-Solução deve estar homogênea para contagem em Câmara de Neubauer;



Pequeno volume deve ser retirado e realizada a diluição necessária (depende da concentração de cells)



Preparação das cells em suspensão:

-Para liberação das cells da superfície da o meio de cultura deve ser cuidadosamente retirado para que seja lavado com tripsina-EDTA

-**Tripsina** → age digerindo e clivando proteínas de adesão;

-**EDTA** → quela os divalentes cátions livres.



Câmara de Neubauer

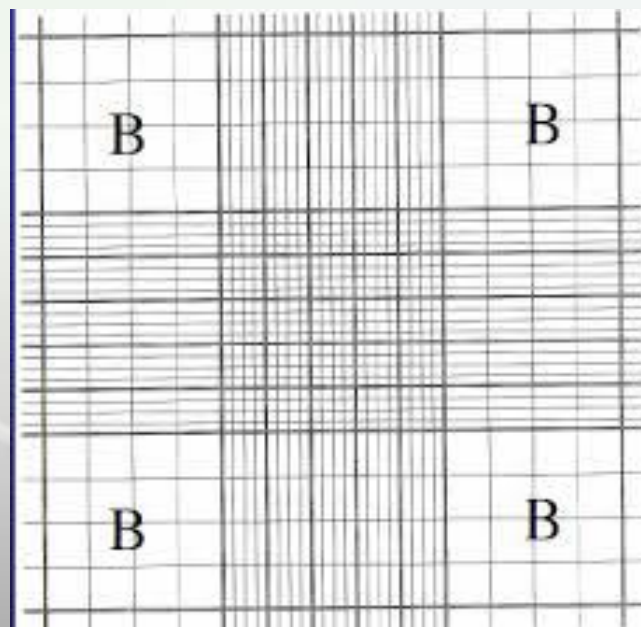
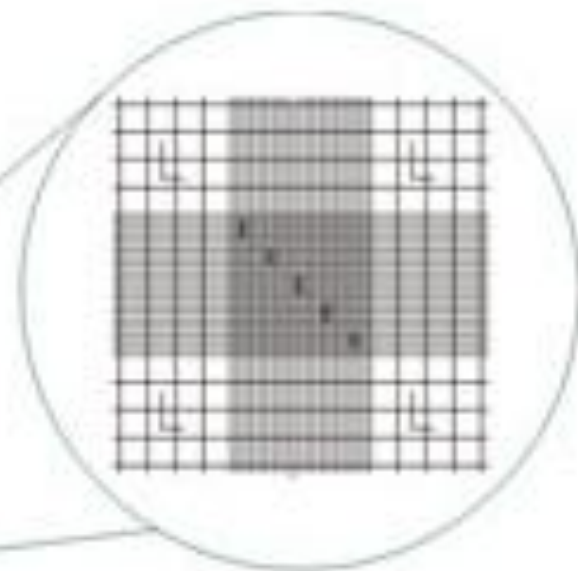
- Definida como um *slide* de vidro que apresenta 2 superfícies separadas:

cada uma é dividida em 1 grid

Grid – composto por 9 quadrados (cada um mede 1mm de lado e é limitado por 3 linhas próximas)



INSTITUTO FEDERAL
SANTA CATARINA





Câmara de Neubauer

Cells → observadas utilizando-se objetiva de 10X;

Lamínula de vidro é posicionada na área central da câmara

Espaço entre lâmina – lamínula = 0,1 mm



Muito importante para a contagem de cells → aumentos maiores (de imersão) não devem ser utilizados, pois pressionam a lamínula



Câmara de Neubauer

Assim, o volume determinado por cada quadrado quando coberto por lamínula é de:

$$1\text{mm} \times 1\text{mm} \times 0,1\text{ mm} = 0,1\text{ mm}^3$$

Que corresponde a $0,1\mu\text{L}$

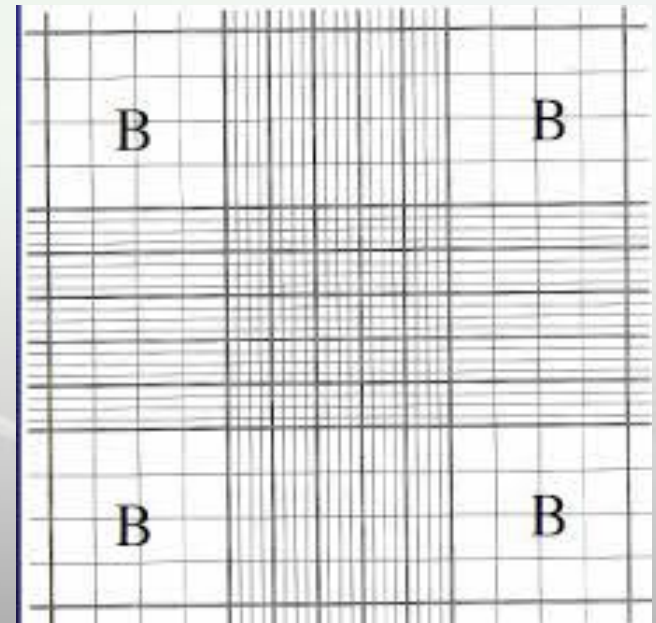


Para obter número de cells/mL → corrigir o valor multiplicando por 10^4 (10.000)



Câmara de Neubauer

- Contagem de cells: utilizar o quadrado central ou os 4 quadrados dos cantos;
- A escolha depende da concentração de cells na suspensão





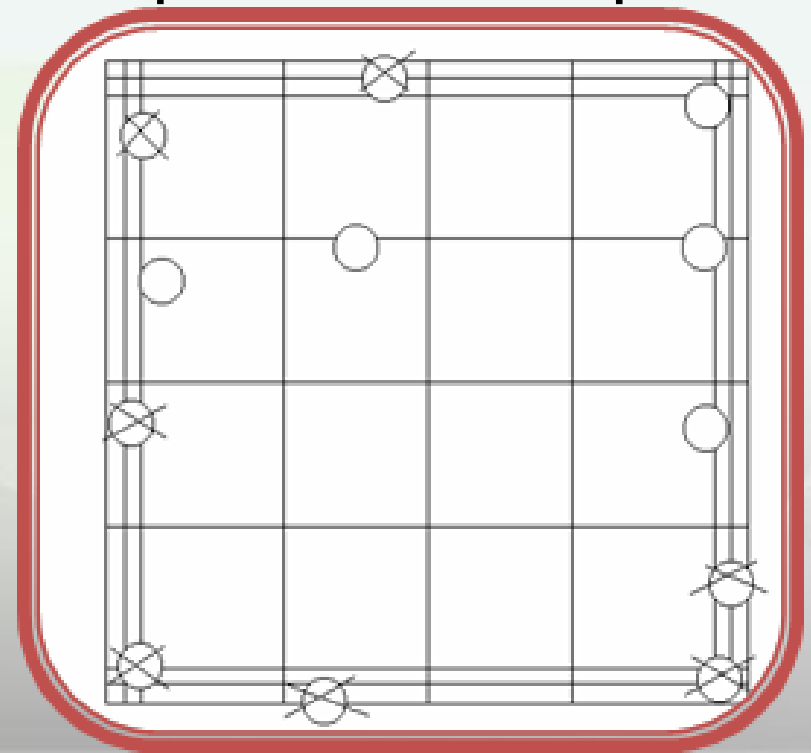
Câmara de Neubauer

- Se contar 4 quadrados → fazer a média;
- Contagem de mais de um quadrado garante resultado mais confiável;



Câmara de Neubauer

- Existem 3 linhas ao redor de cada quadrante
- Excluir as cells que estiverem sobre as linhas inferiores e da direita;
- Excluir as das linhas superiores e esquerda.





Câmara de Neubauer

-Cálculo da concentração total de cells na suspensão original:

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ total cells contadas} \times 10^4 \times \text{Fator diluição}}{\text{N}^\circ \text{ quadrados contadas}} = \text{n. cells/mL}$$

-Quando cells estão muito concentradas → realizar diluição no meio de cultura ou solução salina



Viabilidade de Cells

-Viabilidade celular → **reagente azul de tripan**

Cells viáveis → **excluem o corante do citoplasma;**

Cells mortas → **aparecem azuis.**

Ao observar, a proporção dentre o n. de cells vivas e o total (vivas e mortas) fornecerá uma porcentagem de viabilidade celular, qual deve ser superior que 90%



-EX:

Realizou-se a contagem de uma suspensão de cells (diluição 1:2) e obteve-se um n. de 160 cells ao todo. Foram contados os 4 quadrad os do *grid*. Deste total de cells, foram contada s 10 cells azuis (mortas) e 150 cells sem color ação (vivas). Qual a porcentagem de via bilidade celular?



$$\frac{160 \times 2 \times 10^4}{4} = 320 \times 10.000 = 32.000.000 \quad (320 \times 10^4) = 80 \times 10^4$$

total cells

$$\frac{150 \times 2 \times 10^4}{4} = 300 \times 10.000 = 30.000.000 \quad (300 \times 10^4) = 75 \times 10^4$$

cells vivas

$$\frac{75 \times 10^4}{80 \times 10^4} = 0,93 = 93\% \text{ cells viáveis}$$